

Filipa Alexandra Almeida Silva

Autofagia: Mecanismos e Funções na Imunidade

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Autofagia: Mecanismos e Funções na Imunidade

Filipa Alexandra Almeida Silva

Autofagia: Mecanismos e Funções na Imunidade

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Autofagia: Mecanismos e Funções na Imunidade

Filipa Alexandra Almeida Silva

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Professora Doutora Amélia Assunção.

Sumário

A autofagia é um processo catabólico, caracterizada pela digestão intracelular de organelos e estruturas da própria célula. Assim, podem ser eliminados organelos que deixaram de ser essenciais à atividade celular. Apesar da autofagia ser usualmente considerada um mecanismo de sobrevivência, nos últimos anos tem sido implicada em numerosos outros aspectos biológicos, tais como, defesa do hospedeiro, imunidade inata e adaptativa, remodelação celular e até mesmo em cenários clínicos, como doenças neurodegenerativas, doenças infecciosas, neoplasias, entre outras.

Nesta revisão serão descritos os mecanismos moleculares, regulação e funções imunológicas da autofagia, bem como implicações patológicas da desregulação do mecanismo autofágico.

Abstract

Autophagy is a catabolic process, characterized by the digestion of intracellular organelles and cell structures, resulting in elimination of organelles that are no longer essential for cellular activity. Autophagy is usually regarded as a survival mechanism. Nevertheless, in recent years autophagy has been implicated in several other biological processes, such as host defense, innate and adaptative immunity, cellular remodeling and even in clinical settings, such as neurodegenerative disorders, infectious diseases and neoplasias.

In this review, the molecular mechanisms of autophagy, its regulation and immune functions will be described. It will also be addressed how autophagy deregulation may lead to pathology.

Agradecimentos

Ao terminar esta etapa quero agradecer a todos que me acompanharam e incentivaram ao longo deste meu percurso académico.

À Professora Doutora Amélia Assunção, por ser não apenas uma orientadora, mas por todo o apoio, atenção, disponibilidade, paciência e dedicação mostrada ao longo da realização desta dissertação.

Aos meus pais, pelo amor, apoio, ensinamentos e exemplos de vida. Sem eles nada disto seria possível!

À minha irmã Raquel, pelo apoio incondicional sempre presente. É a minha vida!

Ao Leandro, por todo o carinho, conforto, apoio e incentivo que sempre demonstrou ao longo desta etapa, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos, à Sara e ao Rui, pela amizade, solidariedade e companheirismo presentes ao longo do nosso percurso académico.

À Universidade Fernando Pessoa.

Muito Obrigada!

Índice

Sumário	V
Abstract	VI
Agradecimentos	VII
Índice.....	VIII
Índice de Figuras.....	XI
Abreviaturas	XII
Introdução.....	1
Desenvolvimento	2
Capítulo I – As vias da autofagia.....	2
1.1 Conceito	2
1.2 Macroautofagia	3

1.3	Microautofagia.....	3
1.4	Autofagia mediada por chaperones.....	3
	Capítulo II - Mecanismos moleculares da autofagia.....	5
	Capítulo III - Regulação da autofagia	9
	Capítulo IV – Funções da Autofagia	14
4.1	Função inicial	14
4.2	Stress	14
4.3	Exercício Físico	16
	Capítulo V- Funções imunológicas.....	18
	Capítulo VI - Autofagia na imunidade inata e adaptativa	20
	Capítulo VII - Autofagia e Apoptose.....	23
	Capítulo VIII - Autofagia na proteção contra bactérias	26
8.1	Mycobacterium tuberculosis	26

8.2	Listeria monocytogenes	27
Capitulo IX - Autofagia em potenciais aplicações terapêuticas		29
9.1	Doença inflamatória intestinal – Crohn	29
9.2	Cancro	31
Conclusão		33
Bibliografia.....		34

Índice de Figuras

Figura 1 - Diferentes processos autofágicos.....	4
Figura 2 - Etapas gerais da autofagia.....	8
Figura 3 – Vias de regulação da autofagia.	13

Abreviaturas

AMP – Adenosine monophosphate

Atg - Autophagy related protein

ATP – Adenosine triphosphate

APCs - Antigen-presenting cells

ATF – Activating transcription factor

BCG- Bacillus Calmette-Guérin

Bcl2 – B-cell lymphoma 2

Bec1 – Beclin-1

Bcl-XL – B-cell lymphoma extra large

BH3 – Bcl2 homology 3

Caspases – Cystein aspartic acid proteases

CMA – Autofagia mediada por chaperones

CU – Colite ulcerosa

DC- Doença de Crohn

DNA – Deoxyribonucleic acid

eIF2 α – Eukaryotic Translation Iniciation facto 2, alpha subunit

ESCRT - Endosomal sorting complex required for transport

GABARAP - Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein

GTPase – Guanosina Trifosfatase

IFNs - Interferons

IRE1 α - Inositol-requiring protein 1 α

IRF - IFN regulatory factor

IRGM – Immunity related GTPase family M

LAMP - 2A – Lysosome-associated membrane protein type 2A

LC3 – Light chain 3 protein

LLO - Listeriolysin O

LRS – LC3 recognition sequence

MAPK - p38 mitogen-activated protein-kinase

MHC - Complexo major de histocompatibilidade

miRNAs – microRNAs

mRNA – Messenger Ribonucleic acid

MTOC - Microtubule organizing center

MyD88 - Myeloid differentiation primary response protein 88

NF- κ B - Nuclear factor- κ B

NK – Natural killer cells

NO - Óxido nítrico

NOS-2 - Nitric-oxide synthase

O - Oxigênio

PAS - Phagophore Assembly Site

PCD – Programmed Cell Death

PRR - Pattern recognition receptors

PERK – PKR-like ER kinase

PI3K - Fosfatidilinositol 3-cinase

Rheb - Ras homologue enriched in brain

RIP1 - Receptor-interacting protein

RNI - Reative Nitrogen Intermediates

ROS – Reactive oxygen species

SNAREs - Soluble NSF attachment protein receptors

TDM – Trehalose dimycolate

TIR - Toll-IL-1 receptor

TIRAP - TIR domain containing adaptor protein

TLR – Toll like receptors

TNF α - Tumour necrosis factor- α

TOR - Target of Rapamycin

TRAF2 - Receptor-associated factor 2

TRIF - Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor-inducing interferon- β

TRAM – TRIF related adaptor molecule

TSC - Tuberous sclerosis complex

UPR - Unfolded protein response

Vps - Vacuolar protein sorting

Introdução

Este trabalho de revisão bibliográfica surgiu com o intuito de perceber e estabelecer a importância da autofagia, expondo os seus mecanismos e funções, particularmente as suas funções na imunidade. Pretendeu-se também descrever o papel da autofagia em determinadas patologias e, assim, em potenciais aplicações terapêuticas.

Esta revisão baseou-se na pesquisa de informação científica que permitisse a compreensão do tema e seus fundamentos teóricos. Para tal, foi realizada uma extensa busca de artigos científicos experimentais e de revisão para que a dissertação refletisse o atual estado da arte.

Assim sendo, esta dissertação inicia-se com uma abordagem ao conceito inicial da autofagia. Posteriormente, serão avaliados os mecanismos moleculares, sua regulação, suas vias e funções. Por último, e não menos importante, serão abordadas as suas funções na imunidade, de que forma a autofagia confere proteção contra determinadas bactérias (como, *Mycobacterium tuberculosis*) e a sua relevância clínica.

Finalizando, o conhecimento dos processos e funções da autofagia é de extrema importância, pois é uma via central que interfere com inúmeros processos celulares e particularmente com a imunidade, estando envolvida em processos de inflamação e infecção. Como tal, a autofagia apresenta um elevado potencial interesse terapêutico, sendo atualmente alvo de intensos estudos.

Desenvolvimento

Capítulo I – As vias da autofagia

1.1 Conceito

O termo Autofagia é derivado do grego "Auto" (auto) e "fagia" (comer) e refere-se à via de degradação lisossômica que é essencial para a sobrevivência, desenvolvimento, diferenciação e homeostase. Foi em 1963, que Christian de Duve (vencedor do Prémio Nobel de Fisiologia e Medicina, em 1974) “inventou” a palavra autofagia, com a descoberta de lisossomas em células eucarióticas e o envolvimento destes na reciclagem celular (Klionsky 2008).

A autofagia é uma via catabólica essencial que degrada componentes celulares dentro do lisossoma, onde os organelos celulares que já não se encontram funcionais são abrangidos por uma membrana, sendo decompostos. Existem três vias principais de degradação, as quais diferem essencialmente nos meios de entrega de carga para o lisossoma, que são: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperones (CMA) (Murrow & Debnath 2013).

1.2 Macroautofagia

A macroautofagia (vulgarmente conhecida por autofagia) é iniciada pela formação de uma membrana em torno de proteínas e organelos, designada de fagóforo. Este pode ser originado a partir da membrana citoplasmática, do retículo endoplasmático ou da membrana mitocondrial externa. A fusão das extremidades do fagóforo origina a formação de uma estrutura fechada com dupla membrana, o autofagossoma. A membrana exterior do autofagossoma funde-se com um lisossoma, originando o autolisossoma. O seu conteúdo, é posteriormente degradado por enzimas lisossomais (Van Limbergen et al. 2009).

1.3 Microautofagia

A microautofagia, é uma via conservada desde leveduras a mamíferos, tal como a macroautofagia. Na microautofagia, os componentes citosólicos são incorporados diretamente em lisossomas através de invaginações da membrana lisossomal (Van Limbergen et al. 2009).

1.4 Autofagia mediada por chaperones

A autofagia mediada por chaperones (CMA), apenas é observada em células de mamíferos. Esta é mediada por chaperones específicas, que permitem a translocação de

determinadas proteínas para o lúmen lisossomal através da membrana, por interação com o recetor LAMP-2A, resultando no desenrolamento das proteínas e sua degradação (Valdor & Macian 2012).

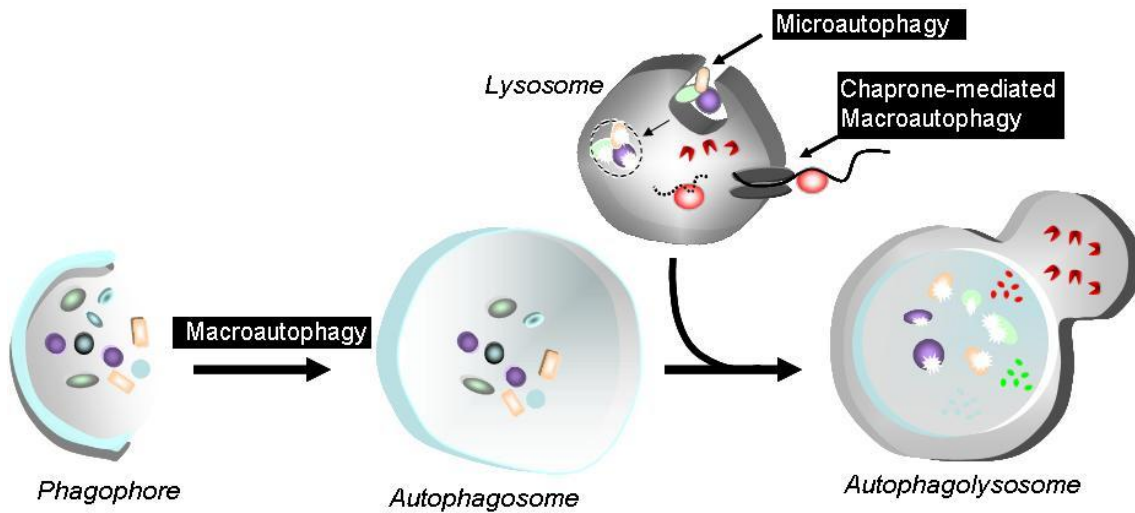


Figura 1 - **Diferentes processos autofágicos.** a) Macroautofagia b) Micoautofagia c) Autofagia mediada por chaperones. Adaptado de ("Human autophagy database - HADb", online).

Capítulo II - Mecanismos moleculares da autofagia

Os mecanismos moleculares da Autofagia foram preservados ao longo do tempo, existindo no genoma de diversos organismos, um conjunto de genes, primeiramente descritos em leveduras e denominados de *Atg* (autophagy), envolvidos no mecanismo de autofagia (Tsujiimoto & Shimizu 2005). Os homólogos dos *Atg* em mamíferos serão designados mAtg.

A Autofagia divide-se em três processos distintos, tais como, indução, alongamento e maturação, controladas pelos produtos dos genes *Atg* (Dwivedi & Ahnn 2009).

Indução/Iniciação

Conforme referido acima, o início da indução engloba a formação de uma estrutura inicial, uma membrana lipídica dupla de isolamento, denominada fagóforo (Van Limbergen et al. 2009).

O fagóforo inicia-se com uma estrutura denominada PAS (“Phagophore Assembly Site”). Em mamíferos, as proteínas envolvidas nesta etapa inicial são a PI3K III (fosfatidilinositol 3-cinase de classe III) também designada Vps34, beclina 1 (mAtg6), p150 (subunidade reguladora da Vps34 (Yan & Backer 2007)) e mAtg14L, entre outras. O complexo formado pelas proteínas beclina 1, p150, Vps34 e Atg14L leva à formação de fosfatidilinositol-3-fosfato, o que resulta no local de nucleação do fagóforo (formação do PAS) (Murrow & Debnath 2013). A partir do PAS, ocorre reconhecimento dos materiais a incluir no fagóforo e segue-se a fase de alongamento (Ravikumar et al. 2010).

O posicionamento do complexo beclina-1-p150-Vps34-Atg14L está sob o controlo de Ulk-1/-2 (mAtg1), mAtg13 e FIP200 (Murrow & Debnath 2013). A proteína mTOR, que se descreverá abaixo, é um regulador da fase de iniciação. mTOR é um inibidor da autofagia quando na forma ativada. Porém, em condições de ausência de nutrientes, mTOR é inibida, permitindo deste modo a ativação da proteína Ulk 1, o que conduz ao início do processo de autofagia (Deretic 2010).

Alongamento

A expansão da membrana autofágica é mediada pela interação inicial de Atg5 com Atg12, a qual de seguida interage com Atg10 e Atg7, conduzindo à formação do complexo Atg16L1. A Atg7 e Atg10, são também importantes para o recrutamento de outras proteínas para a membrana, tal como a LC3 (equivalente ao Atg8) (Z. Liu & Lenardo 2007).

Esta proteína (LC3) existe em duas formas, a LC3-I (citosol) e a sua derivada proteolítica LC3-II (membrana do fagóforo). A LC3 é inicialmente processada a pró-LC3 e alterada posteriormente pela Atg4 à sua forma madura, LC3-I. Esta é processada por uma protease de cisteína (**Atg4**) deixando um resíduo de glicina exposto para uma posterior conjugação com fosfatidiletanolamina (PE), e processar LC3-II (C. Liu et al. 2010; J. Wu et al. 2006).

A LC3 é a única proteína Atg que se encontra em células eucariontes associada ao autofagossoma maduro. A Atg8 tem vários parálogos (originados por duplicação antes ou depois da especiação) em mamíferos, denominadas LC3A, LC3, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, codificadas em cromossomas diferentes, excepto LC3 e

GABARAPL2, que estão associadas ao cromossoma 16 no genoma humano (Van Limbergen et al. 2009).

A quantificação da LC3-II é normalmente utilizada para estimar a abundância de autofagossomas. Após a fusão do autofagossoma com o lisossoma, esta proteína é degradada (Glick et al. 2010).

Maturação

Nesta fase, os autofagossomas movem-se ao longo de microtúbulos por meio do centro organizador dos mesmos, designado de MTOC (“microtubule organizing center”), responsável pela organização e direção dos microtúbulos, e movimento axonal, de vesículas e organelos. Sendo através da proteína motora - dineína, que este transporte se realiza (Ravikumar et al. 2010).

Os autofagossomas, formados aleatoriamente no citoplasma, fundem-se com organelos endossomais e lisossomais ou recebem intermediários produtores de lisossomas para formar um estado denominado anfissoma que, eventualmente, torna-se num organelo pleno de atividade lítica denominado autolisossomas. Autolisossomas são delimitados por uma única membrana que contém produtos degradados de alvos capturados (Deretic 2010).

Os autofagossomas fundem primeiro com endossomas e depois com lisossomas. A fusão ocorre por atuação de diversas proteínas, tais como Rab7, SNAREs (“soluble NSF attachment protein receptors”), ESCRT (“endosomal sorting complex required for transport”) e proteínas Vps (“vacuolar protein sorting”) classe C. A proteína UVRAG recruta proteínas Vps da classe C e por via dessa interação ativa Rab7, promovendo a

fusão com endossomas tardios e lisossomas. Na fusão também está envolvida Rubicon, uma proteína que interage com Bec1. (Ravikumar et al. 2010).

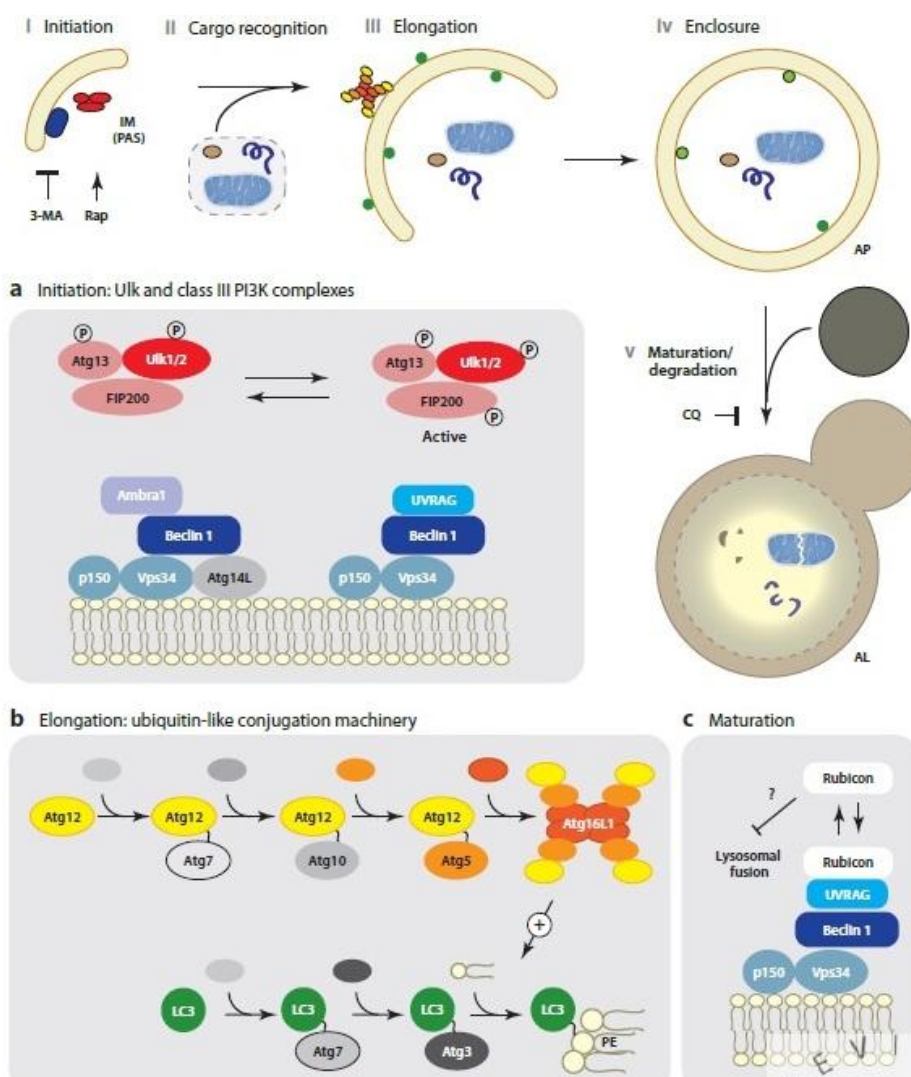


Figura 2 - Etapas gerais da autofagia. i) Iniciação ii) Reconhecimento de Carga iii) Alongamento iv) Finalização do autofagossoma v) Maturação a) Iniciação: Ulk e complexo PI3K classe III b) Alongamento: maquinaria de conjugação do tipo ubiquitina c) Maturação. Adaptado de (Morrow & Debnath 2013).

Capítulo III - Regulação da autofagia

Diversos estímulos podem induzir o processo da autofagia, como uma diminuição dos níveis normais dos nutrientes e, fatores de crescimento, entre outros (Van Limbergen et al. 2009).

O estudo da regulação molecular da autofagia avançou com a identificação da proteína TOR (“Target of Rapamycin”) ou mTOR (o seu equivalente em mamíferos). A rapamicina sendo inibidor da mTOR, atua como indutor na autofagia (Van Limbergen et al. 2009).

Proteína mTOR / PI3K

A proteína mTOR pertence à família das proteínas TOR, sendo uma serina/treonina cinase, pertencente ao grupo das PI3K. As enzimas PI3ks são compostas por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p50 α , p55 α , p55 γ , p85 α ou p85 β), apresentando várias isoformas. Esta família de enzimas PI3ks está dividida em 3 classes (I a III), consoante a sua especificidade de substrato *in vivo*, regulação e estrutura (Hiles et al. 1992).

A proteína mTOR regula as principais vias de sinalização intracelular e está envolvida na homeostase, no crescimento e proliferação celulares, participando na regulação da transcrição e da tradução do mRNA, na resposta a concentrações intracelulares de nutrientes, incluindo aminoácidos, na reorganização do citoesqueleto e biogénese ribossomal (Machín et al. 2006).

A mTOR forma duas subunidades funcionais: mTORC1 e mTORC2. A mTORC1 é um complexo mTOR sensível a rapamicina, que regula a autofagia e o crescimento celular, e é formado pelas proteínas mTOR, Raptor (complexo de mTOR sensível à rapamicina), GβL (ou mLST8) e PRAS40 (inibidor da mTOR). A segunda subunidade, a mTORC2 não é sensível a rapamicina (liga-se a Rictor – complexo de mTOR insensível à rapamicina) e ainda se desconhece a sua ação (Ravikumar et al. 2010).

O principal regulador da via de sinalização mTOR é o complexo TSC, constituído por TSC1 (hamartina) e TSC2 (tuberina). O complexo TSC1 – TSC2 (TSC) contém um domínio ativador GTPases (GAP), resultando na conversão da pequena GTPase Rheb (“Ras homolog enriched in brain”) na sua forma inativa (ligada a GDP). Através da inativação da Rheb o complexo TSC atua inibindo mTORC1 (J & B 2008; Machín et al. 2006). Em condições de nível energético celular normal, o TSC1 é inibido pela proteína Akt e o TSC2 é inibido (fosforilado) pela enzima AMPK (quando ATP/AMP é elevada). Esta dupla inibição resulta na manutenção da Rheb (e conseqüente da mTOR) nas suas formas ativas (Ravikumar et al. 2010).

A inibição da autofagia pelo mTOR ocorre por inibição da Atg1 em leveduras, ou Ulk1 em mamíferos. Nas leveduras a atividade de cinase Atg1 (após interação com Atg13 e Atg17) é fundamental para a indução da autofagia, através do recrutamento de outras proteínas Atg para os autofagossomas (Van Limbergen et al. 2009).

Proteína Bcl2

A Bcl2 pertence à família de proteínas BH3 (“Bcl2 homology 3”), que possui membros anti-apoptóticos e membros pró-apoptóticos. As Bcl2 são reconhecidas como mediadores anti-apoptóticos, no entanto, a função citoprotectora de proteínas Bcl2

provém da sua capacidade para antagonizar Bax e Bak (pró-apoptóticas), e, assim, prevenir a apoptose. (Gross et al. 1999).

Estas proteínas, Bax e Bcl2 possuem capacidade de formar heterodímeros (Bcl2/Bax) ou homodímeros (Bax/Bax ou Bcl2/Bcl2), estando o balanço antiapoptótico ou pró-apoptótico dependente do equilíbrio destes heterodímeros e homodímeros (Petros et al. 2004).

A proteína Bec1, classificada como uma proteína *BH3-only*, interage com a **Bcl2**. Esta interação inibe a autofagia dependente da Bec1, mas não inativa o efeito antiapoptótico de Bcl2. Em condições habituais, Bec1 é inibida e ligada pela Bcl2, no entanto, para ocorrer autofagia é necessário dar-se a dissociação entre Bec1 e Bcl2 (Ciechomska et al. 2009).

Por fim, em células deficientes de Bec1 a expressão de mutantes de Bec1 que não se ligam à Bcl2 além de induzir mais autofagia também promovem morte celular, ao contrário da expressão de Bec1 selvagem. Assim, Bcl2 além de atuar como uma proteína antiapoptótica também funciona como uma proteína antiautofágica, onde tem um papel ativo na manutenção da autofagia compatível com a sobrevivência celular (Pattingre et al. 2005).

Proteína p62

Embora a autofagia seja sobretudo um processo inespecífico, a ligação específica de certas moléculas à membrana dos autofagossomas pode levar à sua inclusão para degradação. É o caso do p62, sendo a sua degradação por autofagia de extrema importância visto a acumulação de p62 ser tóxica (Itakura & Mizushima 2011).

A **p62**, sendo um recetor de carga ou adaptador, atua também como seletor de substratos, sendo uma proteína reguladora da entrega de organelos disfuncionais, proteínas agregadas ou enroladas de forma incorreta e proteínas ubiquitinadas para a eliminação através da autofagia (Itakura & Mizushima 2011).

Assim, a p62 pode ser um elemento fulcral no mecanismo de controlo para a eliminação de componentes tóxicos (Moscat & Diaz-Meco 2009), desempenhando também funções na carcinogénese, no metabolismo ósseo, na formação de corpos de inclusão e na, ativação da via das caspases (Itakura & Mizushima 2011).

A p62 liga-se diretamente à mAtg8/LC3 (presentes na membrana externa e interna do autofagossomas) através da região de interação LC3 também denominada por, sequência de reconhecimento LC3 (LRS – “LC3 recognition sequence”). Esta ligação da p62 com mAtg8/LC3 permite que as “cargas” sejam fechadas pelos autofagossomas. A localização da LC3 no autofagossoma depende da formação de LC3-II ou da conjugação de LC3 com a fosfatidiletanolamina, necessitando da Atg3 e da enzima específica de conjugação E2-like. Assim, em células Atg3 KO (knockout), a formação de LC3 e de LC3-II ficam inibidas (Itakura & Mizushima 2011).

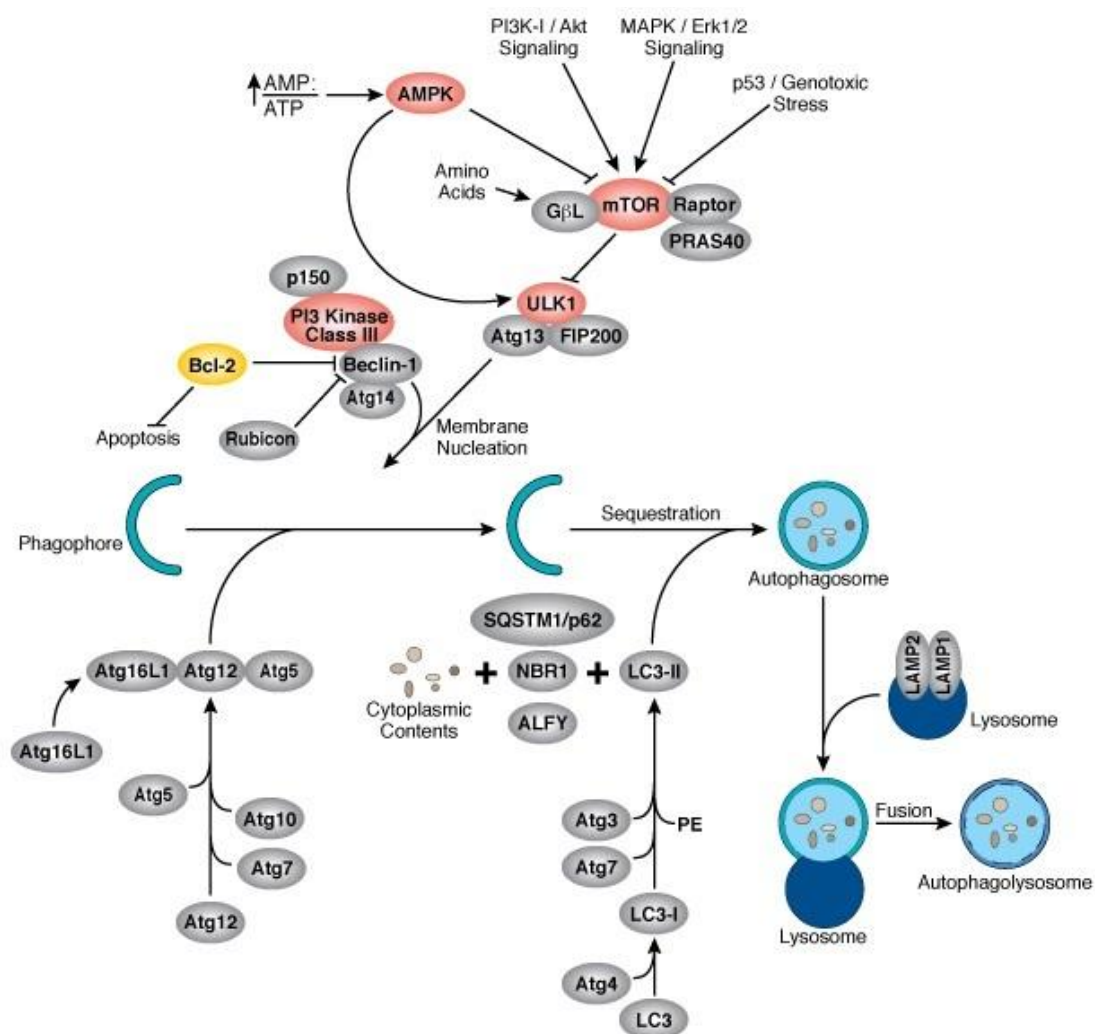


Figura 3 – Vias de regulação da autofagia. São mostradas as principais proteínas envolvidas no processo autofágico, assim como a sua ativação (seta) e inibição (seta fechada). Obtido de: <http://www.cellsignal.com/pathways/autophagy-signaling.jsp>.

Capítulo IV – Funções da Autofagia

4.1 Função inicial

Como referido acima, a autofagia é um importante processo de renovação contínua.

Esta renovação contínua está presente em diversos organismos eucariotas, sendo essencial para que as células possam obter a energia necessária para exercer as suas funções em processos biológicos vitais, tais como, desenvolvimento, diferenciação, imunidade inata e adaptativa, envelhecimento e morte celular (Wirawan et al. 2012).

É atualmente aceite que a fome, o stress e o exercício físico são fortes indutores de autofagia, levando à reciclagem celular.

4.2 Stress

A autofagia é um processo fisiológico, consistindo num componente fulcral da resposta ao stress integrado (Guido Kroemer et al. 2010).

Existem diversas condições externas, tais como, pH, temperatura, concentração, luz ultravioleta, entre outros, que condicionam as células eucarióticas, provocando uma adaptação destas. Quando estas condições atingem um valor superior ao terapêutico, atinge-se o stress, levando a uma resposta celular com vista à sua sobrevivência. Durante esta resposta, as células passam por mudanças rápidas para adaptar o seu metabolismo e se proteger contra possíveis danos (Guido Kroemer et al. 2010).

A autofagia tornou-se num mecanismo de sobrevivência, através do qual as células se defendem contra agressões ambientais/externas, nomeadamente stress oxidativo, stress do reticulo endoplasmático e fome. Esta constatação, baseia-se na necessidade que os organismos apresentam em se adaptarem a ambientes desfavoráveis, onde em resposta a esta necessidade precisam dos genes *Atg*. A transcrição destes genes é aumentada na presença de agressões externas, codificando proteínas essenciais à regulação e execução da autofagia (H. Wu et al. 2009).

O retículo endoplasmático é o compartimento onde ocorre o enrolamento de proteínas antes do transporte destas para a superfície intracelular ou extracelular. Situações de stress celular originam uma acumulação de proteínas incorretamente enroladas ou desenroladas no lúmen do reticulo endoplasmático (Ogata et al. 2006). Uma acumulação destas proteínas desencadeia uma resposta (UPR – “unfolded protein response”), para impedir que ocorra dano celular (R. C. Wang & Levine 2010).

Para além da UPR, recentemente demonstrou-se que também a autofagia era induzida para a destruição das proteínas disfuncionais, através da atuação de um recetor do reticulo endoplasmático, IRE1 α , responsável pela transdução do sinal de stress do reticulo (Ogata et al. 2006; R. C. Wang & Levine 2010).

Além de IRE1 α , existem outros dois recetores do reticulo endoplasmático, designados por PERK e ATF6. PERK, está envolvido na diminuição da transcrição, para aliviar a atividade do RE. Assim, a ativação da PERK na UPR resulta numa diminuição do número de proteínas no reticulo, devido à inibição da tradução de mRNAs. IRE1 α e ATF6 são fatores de transcrição de chaperones do RE, que vão colaborar no correto enrolamento proteico (Harding et al. 2001; Ogata et al. 2006).

Por último, o retículo endoplasmático, por ser um local de armazenamento de cálcio intracelular, pode despoletar a autofagia através da ativação CaMKK β (dependente de AMPK) (R. C. Wang & Levine 2010).

4.3 Exercício Físico

O exercício físico apresenta inúmeros efeitos benéficos sobre a saúde humana, incluindo proteção contra doenças metabólicas. O músculo-esquelético é o tecido mais abundante nos mamíferos e o principal depósito de aminoácidos no organismo, portanto o seu estado fisiológico desempenha um papel muito importante na saúde (He et al. 2012).

O exercício físico induz as células a degradarem proteínas indesejadas para produzir mais energia, protegendo contra diversas patologias e impedindo distúrbios metabólicos, tais como, a diabetes. Neste caso, o exercício físico induz a autofagia, sendo a Bcl2 um regulador essencial do exercício (He et al. 2012).

Assim sendo, foi feito um estudo por (He et al. 2012), onde foi avaliado o papel da autofagia induzida pelo stress provocado pelo exercício físico. Este estudo, foi realizado em ratinhos transgênicos nos quais a Bcl2 sofre fosforilação defeituosa ligando-se a Bec1. A ligação permanente de Bec1 a Bcl2 impede a indução da autofagia em resposta ao stress ocorrido no tecido adiposo, músculo cardíaco e músculo-esquelético (He et al. 2012; Klionsky & Saltiel 2012).

Os resultados obtidos mostram diminuição na resistência e na capacidade da prática de exercício físico pelos ratinhos transgênicos, no entanto, mostram que estes após o exercício físico apresentam níveis elevados de insulina e de glicose no plasma em

comparação com ratos normais. Estes resultados, em ratinhos transgênicos e selvagens, indicam que o aumento de peso derivado de uma alimentação a base de gorduras, pode ser alterado pela prática de exercício físico, melhorando o peso, mas também reduzindo os níveis de colesterol, triglicérides e de insulina (He et al. 2012; Klionsky & Saltiel 2012).

Por último, foi também verificado que a enzima AMPK, reguladora da homeostase energética e reguladora positiva da autofagia, é ativada durante o exercício físico devido ao aumento da razão AMP/ATP, causando inibição da via mTORC1 e ativação de ULK1 cinase. A ativação de AMPK o que leva à estimulação da oxidação de ácidos gordos e inibição das enzimas que catalisam os processos anabólicos (Klionsky & Saltiel 2012).

Capítulo V- Funções imunológicas

Este capítulo irá analisar as funções da autofagia na regulação das funções imunológicas, através da atividade dos diferentes tipos de células envolvidas numa resposta imunitária (Valdor & Macian 2012).

O sistema imunológico é constituído por tecidos e órgãos que têm como tarefa identificar agentes agressores e defender o organismo contra as agressões destes. É constituído por vários tipos de células e proteínas, tais como, leucócitos e imunoglobulinas, respetivamente. Onde os leucócitos apresentam funções específicas, dividindo-se em linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e basófilos (Margarida et al. 1995).

Os monócitos quando presentes nos tecidos, diferenciam-se em macrófagos. Estes digerem os elementos invasores, células mortas e libertam compostos químicos que atraem outras células ao local de infeção (Margarida et al. 1995).

Por outro lado, existem dois tipos de linfócitos: os linfócitos B e os linfócitos T. Os linfócitos B apresentam na sua superfície recetores específicos para antigénios e são responsáveis pela imunidade humoral, diferenciando-se em plasmócitos, células especializadas na produção de anticorpos, na ação contra agentes invasores. Os linfócitos T diferenciam-se em linfócitos T4 (células CD4) e linfócitos T8 (células CD8), sendo responsáveis pela imunidade celular (Margarida et al. 1995).

A ação conjunta de todas as células do sistema imunitário, provoca uma ação rápida no combate ao agente agressor (Margarida et al. 1995).

A autofagia atua em diversos aspectos da imunidade, tais como, captação de antígenos de localização citoplasmática, envio de elementos patogênicos para a degradação lisossomal, eliminação de vírus, parasitas e bactérias e fornecimento de antígenos para o complexo major de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II, desempenhando um importante papel na apresentação de antígenos aos linfócitos T por macrófagos e células dendríticas (Ravikumar et al. 2010).

A ligação de antígenos microbianos a receptores TLR, bem como a ligação de citocinas como IFN- γ induz mobilização de Bec1, Atg5 e Atg7 para o fagossoma, conduzindo à ativação da autofagia (Ravikumar et al. 2010).

Num estudo realizado com o objetivo de melhorar a eficácia da vacina BCG contra a tuberculose foi demonstrado que a ação da vacina pode ser melhorada se for combinada com a presença de antígenos produzidos por autofagia em APCs, ocorrendo uma resposta imune mais rápida (Ravikumar et al. 2010).

A comprovada importância da autofagia na função imunológica, torna-a num importante alvo para o desenvolvimento de novas terapias (Valdor & Macian 2012).

Capítulo VI - Autofagia na imunidade inata e adaptativa

A autofagia atua em resposta a diversos estímulos, desempenhando um papel fundamental na imunologia. Está envolvida na degradação de elementos patogénicos, na inflamação, na apresentação de antígenos, entre outros. (Deretic & Levine 2009).

Autofagia na imunidade inata

O sistema imunológico inato depende de um conjunto diverso de recetores, entre os quais os recetores de reconhecimento de padrões - PRR (“pattern recognition receptors”), que reconhecem estruturas moleculares comuns a vários microrganismos e existem principalmente em macrófagos e células dendríticas (Hussey et al. 2009). Estes recetores medeiam a produção de quimiocinas e citocinas após reconhecimento de elementos patogénicos e estimulação da resposta imune contra estes (Xu & Eissa 2010).

Uma classe de PRR são os TLRs (“toll-like receptors”), que consistem em proteínas transmembranares localizadas na superfície da célula, que interagem com a molécula adaptadora TIR (“Toll-IL-1 receptor”) localizada no citosol (Hussey et al. 2009).

A autofagia é desencadeada por LPS (lipopolisaccarídeo) após ativação de TLR4. A ligação de TLR aos seus ligandos leva ao recrutamento do domínio TIR de moléculas adaptadoras, tais como, TRIF (“TIR domain containing adaptor protein inducing interferon IFN- β ”), MyD88 (“myeloid differentiation primary response protein 88”), TIRAP (“TIR domain containing adaptor protein”) e TRAM (“TRIF related adaptor

molecule”) (Hussey et al. 2009; Xu et al. 2008). Este recrutamento de proteínas adaptadoras, dispara a cascata da via de sinalização e leva à ativação de fatores de transcrição, tais como, IRF (“IFN regulatory factor”) e NF- κ B (“nuclear factor κ B”) (Xu & Eissa 2010).

A proteína adaptadora MyD88 interage com Bec1, resultando na diminuição da sua ligação a Bcl2 e promoção da autofagia. Os estudos de Xu e colaboradores (Xu & Eissa 2010) indicam que para desencadear uma resposta autofágica, os TLRs são suficientes, visto após a estimulação por LPS na linha celular RAW264.7 forma-se grande número de autofagossomas, e, inibindo o TLR4 dá-se uma redução nos autofagossomas (Hussey et al. 2009).

Autofagia na imunidade adaptativa

No sistema imunitário, a imunidade adaptativa atua no desenvolvimento de memória imunológica, baseada na ligação antígeno-anticorpo. O que se traduz numa resposta mais rápida e eficaz num posterior encontro com o agente patogénico. A imunidade adaptativa é mediada por linfócitos T e linfócitos B após exposição a um antígeno específico. (Forte 2007).

A autofagia tem vindo a ser implicada na entrega de péptidos antigénicos aos lisossomas, na apresentação de antígenos pelo MHC de classe II, mas também na homeostase das células de Paneth, linfócitos T e linfócitos B. Após diversos estudos, foi descoberto que todo o processo da autofagia pode ser modulado por fatores que alteram a resposta imune, como é o caso das citocinas produzidas por linfócitos Th1 ou Th2. As citocinas são responsáveis pela ativação da resposta inata e pelo aumento da resposta imunológica humoral (Forte 2007; Xu & Eissa 2010).

Enquanto os linfócitos Th1 (que produzem IFN- γ) regulam a autofagia, IL-4 e IL-13 (produzidas por linfócitos Th2) inibem esta. Esta inibição resulta da estimulação da via PI3k-I, que posteriormente ativa o principal inibidor da autofagia, o TOR. Sendo assim, Th2 funciona como supressor da autofagia, protegendo os elementos patogénicos da sua eliminação pela autofagia. Inversamente, após indução por Th1, a autofagia leva à eliminação dos elementos patogénicos (Deretic & Levine 2009; Xu & Eissa 2010).

Por último, ainda estão por explicar muitos mecanismos que relacionam autofagia e imunidade. O conhecimento desses mecanismos levará a um melhor conhecimento da imunologia na defesa contra elementos patogénicos (Deretic 2006).

Capítulo VII - Autofagia e Apoptose

A morte celular programada (PCD) é um sistema geneticamente controlado, desencadeado por estímulos exógenos e endógenos, onde ocorre uma sequência de fenômenos bioquímicos e moleculares. A autofagia e a apoptose são mecanismos pertencentes à PCD (Castro et al. 2010). Esta apresenta 3 tipos, tais como, a PCD tipo I (Apoptose), a PCD tipo II (autofágica) e a PCD tipo III (tipo de morte não lisossomal) (Patricia Boya et al. 2005).

A apoptose consiste na morte celular, num mecanismo que elimina células lesadas ou indesejadas, de uma forma irreversível. Esta é o resultado da ativação de enzimas, denominadas de caspases. As caspases reconhecem e clivam substratos que possuam resíduos de aspartato, pertencendo estas à família das proteases da cisteína. A ativação das caspases depende do equilíbrio entre as vias antiapoptóticas e pró-apoptóticas. A sinalização que ativa as caspases e desencadeia os eventos que originam a apoptose da célula pode ser de origem intracelular (via mitocondrial) ou extracelular (via dos recetores). Estas duas vias diferem na regulação e indução, no entanto, ambas terminam na ativação das caspases e posterior apoptose (Kumar et al. 2013).

A autofagia e a apoptose são dois mecanismos distintos, morfológica e molecularmente, mas estão interligados pelas vias de sinalização compartilhadas. A autofagia é caracterizada pela participação da família Atg na coordenação do processo autofágico, pelo aumento da granulosidade celular com fragmentação celular e formação de vacúolos autofágicos, enquanto que, a apoptose é caracterizada pela participação das caspases e da Bcl-2 no processo apoptótico, pela fragmentação nuclear,

encolhimento nuclear e celular, blebbing da membrana, entre outros eventos (Patricia Boya et al. 2005).

Um dos estudos sobre a relação entre a autofagia e a apoptose, utilizaram células HeLa num contexto de privação de nutrientes e demonstraram que se artificialmente fosse induzida a inibição da autofagia, podia conduzir à apoptose celular. Independentemente da fase em que a autofagia sofria inibição, esta ia atingir uma via comum a apoptose, atuando assim como um mecanismo pró-apoptótico (Patricia Boya et al. 2005).

Sendo assim, pode ser prejudicial a estimulação da autofagia em células cancerígenas, pois pode conduzir a uma diminuição da apoptose. No entanto, uma ativação constante da autofagia pode conduzir à apoptose (Amaravadi et al. 2007).

Amaravadi e colaboradores (Amaravadi et al. 2007) demonstraram morte apoptótica após inibição da autofagia em células de um linfoma resistente à apoptose, por indução do oncogene c-Myc. Verificaram que a inibição da autofagia e de Atg5, conduziu as células tumorais à morte induzida pela ativação de p53. Assim, este estudo adverte para a possibilidade de combinar agentes inibidores de autofagia com agentes indutores de apoptose, para um proveito terapêutico (Amaravadi et al. 2007).

As proteínas antiapoptóticas Bcl2 e Bcl-XL, participam em ambos os processos de autofagia e apoptose, inibindo a autofagia por ligação a Bec1 (Maiuri et al. 2007). Assim, Bcl2 atuando como molécula inibidora liga-se a Bec1 impedindo a sua ação pró-autofágica (P Boya & G Kroemer 2009). Estes dados indicam que a autofagia é inibida pelo complexo Bec1-Bcl2/Bcl-XL localizado no retículo endoplasmático (Maiuri et al. 2007). As proteínas *BH3-only* (como é o caso de Bec1), atuam como sensores em resposta a determinadas situações, tais como, exposição a agentes lesivos do DNA ou

privação de fatores de crescimento (Kumar et al. 2013). Assim sendo, a libertação de Bec1 após a sua inibição por Bcl2/Bcl-XL, resulta na ativação da autofagia (Maiuri et al. 2007).

Capítulo VIII - Autofagia na proteção contra bactérias

Cada vez mais, os elementos patogénicos possuem aptidão para invadir células hospedeiras de modo a ficarem protegidos dos constituintes do sistema imunitário. No entanto, estas células desenvolveram estratégias para eliminar os elementos patogénicos, tais como a utilização de proteólise ou de espécies reativas de oxigénio (Campoy & María I Colombo 2009).

A autofagia atua na defesa da célula hospedeira contra os elementos patogénicos, sobretudo se estes conseguem escapar do fagossoma ou impedem a sua fusão com o lisossoma. No entanto, alguns patogéneos inibem a maturação do autofagossoma com o objetivo de impulsionar a replicação bacteriana, como exemplo temos a *Mycobacterium tuberculosis* (Campoy & María I Colombo 2009; Cemina & Brummel 2012).

8.1 *Mycobacterium tuberculosis*

A *Mycobacterium tuberculosis* é um parasita intracelular facultativo, sendo o agente responsável pela tuberculose. A infeção mais comum da tuberculose é a infeção pulmonar uma vez que os bacilos são inalados, atingindo os alvéolos pulmonares e ocorrendo então, a fagocitose dos mesmos por macrófagos. No entanto, a tuberculose pode estender-se a qualquer zona do organismo (Songane et al. 2012; Vergne et al. 2006).

A autofagia está envolvida na defesa do hospedeiro contra *Mycobacterium tuberculosis*. Onde, em resposta a invasão bacteriana, o sistema imunitário induz a autofagia quando a via de maturação do fagossoma é bloqueada pela *M. tuberculosis* (Vergne et al. 2006).

Segundo o estudo de (Gutierrez et al. 2004) a citocina IFN- γ confere proteção contra a tuberculose, sendo um processo dependente da autofagia. Estes verificaram que após a estimulação da autofagia, a bactéria encontra-se dentro de um vacúolo rodeado por uma membrana dupla contendo LC3. IFN- γ atua nos macrófagos, originando a expressão de IRGM1 (LRG47) e NOS-2 (“Nitric-oxide synthase”) (Gutierrez et al. 2004; Songane et al. 2012). Esta última enzima, gera RNI (“Reactive Nitrogen Intermediates”), que inativa o fator de virulência do bacilo (TDM – “trehalose dimycolate”). Este fator retarda a maturação do fagossoma, e a sua inativação leva posteriormente à formação do fagolisossoma que resulta na morte da bactéria (Axelrod et al. 2008). Por outro lado, IRGM1, uma GTPase, converte LC3-I a LC3-II. Assim, estimula a autofagia, induzindo a formação do autofagossoma nos macrófagos. O IFN- γ origina a maturação do fagossoma, permitindo a sua fusão com o lisossoma e induz autofagia, levando à morte do bacilo da tuberculose (S. B. Singh et al. 2006).

8.2 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um parasita intracelular facultativo, que pode proliferar dentro de macrófagos ou em outras células não fagocíticas. Esta está associada a infecções em grupos de risco, tais como recém-nascidos/crianças, grávidas e imunodeprimidos. A *L. monocytogenes* encontra-se disseminada na natureza, existindo no solo, água e trato intestinal dos animais e homem, podendo contaminar alimentos. Pode originar parto prematuro, aborto, septicemia e meningite (Ramnath et al. 2003).

Numa Listeriose, a imunidade humoral não atua, visto esta bactéria se multiplicar dentro da célula, no entanto, a imunidade celular é fundamental para a eliminação deste patógeno, através de macrófagos, neutrófilos, linfócitos T CD8+ e células NK.

Também sendo o TNF- α e o IFN- γ fundamentais para a defesa do hospedeiro (Bogdan 2012; Cruz et al. 2008).

A *Listeria monocytogenes* numa infecção primária é endocitada formando um vacúolo, mas após escapar do fagossoma, replica-se no citoplasma. Esta fuga do fagossoma por parte da bactéria é dependente da formação de poros, secretados pela toxina LLO (Listeriolysin O) e duas fosfolipases. A atividade desta toxina pode ser prejudicada pela indução de Phox e NOS2 pela ação de O_2^- e NO, sendo estes últimos gerados pelo INF- γ . Posteriormente no citoplasma, a bactéria induz a polimerização da actina sobre a sua superfície com a intervenção da proteína ACTa (“Actin assembly-inducing protein”), para deslocação no citoplasma e posterior invasão das células vizinhas (Bogdan 2012; Campoy & María I Colombo 2009).

A toxina LLO e a permeabilização do vacúolo, levam à ativação da autofagia, onde verificando-se um aumento de LC3-II/LC3-I, numa fase inicial da infecção. Resultado disso, é a degradação desta bactéria pela autofagia, imediatamente após a saída desta do fagossoma mas antes da sua proliferação no citoplasma (Campoy & María I Colombo 2009).

Capítulo IX - Autofagia em potenciais aplicações terapêuticas

A autofagia, como desempenha um papel fundamental no controlo de diversos processos vitais, está associada a inúmeras patologias, podendo ser um campo de desenvolvimento de aplicações terapêuticas (Deretic & Klionsky 2008).

9.1 Doença inflamatória intestinal – Crohn

A Doença inflamatória intestinal é uma patologia que compreende dois tipos de desordens intestinais inflamatórias, a colite ulcerosa (CU) e a doença de Crohn (DC) (Khor et al. 2011).

A doença de Crohn é uma patologia crónica, que manifesta uma inflamação intestinal. Geralmente atinge o cólon e o íleo, mas pode afetar qualquer zona do trato gastrointestinal (Van Limbergen et al. 2009).

A DC manifesta-se principalmente na infância/adolescência ou no início da idade adulta, atingindo tanto homens como mulheres (Van Limbergen et al. 2009). As manifestações clínicas são várias, tais como, diarreia crónica (mais de 6 semanas), dor abdominal, emagrecimento, febre e mal-estar geral. No entanto, a DC pode ser confundida com outra patologia, e por isso mesmo é fundamental proceder a uma completa anamnese, para ser verificada a evolução da doença, início dos sintomas, fatores de risco, histórico farmacoterapêutico e histórico familiar (Stange et al. 2006).

Os genes ligados à autofagia que apresentam risco de doença de Crohn são o *IRGM*, *Atg5* e *Atg16L1* (Van Limbergen et al. 2009).

O gene *IRGM* codifica uma proteína da autofagia com um papel fundamental na imunidade contra patógenos intracelulares, tais como *Mycobacterium tuberculosis*, como já referido. A variante c.313T, associada a um maior risco de desenvolver DC, é uma mutação sinónima, não resultando numa proteína diferente. No entanto verificou-se que os doentes com DC possuem uma expressão aumentada de um microRNA, miR-196, o qual apenas interage com a forma mutada (c.313T) e não com a não mutada (c.313C), levando a uma inibição da atividade do *IRGM*, ou seja, inibindo a autofagia apenas em doentes que expressam a variante de risco. Uma diminuição na atividade autofágica da proteína *IRGM* leva a maior proliferação bacteriana, aumentando o risco de DC (Brest et al. 2011).

O gene *Atg16L1* é importante para a autofagia, pois codifica a proteína *Atg16L1*, responsável pela localização intracelular da maquinaria fagocitária e formação do fagossoma (Cadwell et al. 2008). Uma mutação T300A (alteração do aminoácido treonina da posição 300 por uma alanina) no domínio da proteína, aumenta o risco de desenvolver DC (Khor et al. 2011).

Cadwell e colaboradores (Cadwell et al. 2008) fizeram um estudo, onde manipularam geneticamente ratinhos, inserindo a mutação *T300A* do gene *Atg16L1* e depletando *Atg5*. Demonstraram que *Atg16L1* e *Atg5* (que faz parte do complexo de *Atg16L1*), são proteínas essenciais para a autofagia e para as células de Paneth, especializadas na secreção de proteínas e grânulos que alteram o meio intestinal. Os ratinhos revelaram alterações na quantidade secretada de péptidos antimicrobianos endógenos, tamanho e

quantidade dos grânulos, aumento dos reagentes de fase aguda e duas adipocitocinas (leptina e adiponectina) (Cadwell et al. 2008; Van Limbergen et al. 2009).

9.2 Cancro

As neoplasias malignas, vulgarmente designadas cancro, consistem numa proliferação anormal das células de um determinado órgão, multiplicando-se até formarem uma massa tumoral. Esta massa pode manter-se apenas no órgão de origem ou sofrer metastização, tendo capacidade de invadir todo o organismo, formando colónias tumorais à distância (Bocchetta & Carbone 2004).

O cancro é uma patologia que surge em consequência de alterações epigenéticas e genéticas. As alterações epigenéticas consistem em alterações a nível da cromatina, que apenas aumentam a probabilidade das mutações genéticas originarem em cancro. Por outro lado, as alterações genéticas consistem em mutações no DNA podendo ser adquiridas ou herdadas (Alberts et al. 2002).

As alterações genéticas afetam os genes supressores tumorais, inativando a capacidade de eliminar alterações malignas, e os oncogenes, que sofrem ativação, resultando em aumento da proliferação celular e perda da capacidade de diferenciação (Alberts et al. 2002).

O cancro e a autofagia estão interligados, visto a autofagia ser um mecanismo que quando interrompido pode promover e acelerar a carcinogénese. O gene *Bec1* é considerado um gene supressor tumoral, bem como o *p53*. A *Bec1* encontra-se suprimida em cerca de 50% dos cancros, tais como, cancro da próstata, cancro da

mama, entre outros. O gene *p53* também parece ser importante na indução de autofagia (Van Limbergen et al. 2009; Yang et al. 2011).

O processo autofágico atua como um mecanismo de supressão tumoral, eliminando organelos celulares e proteínas (por exemplo, mitocôndrias) danificadas, que poderiam alterar os processos celulares normais (Van Limbergen et al. 2009). O gene *p53* é também importante na codificação de uma fosfoproteína nuclear responsável pela interrupção do ciclo celular após ocorrerem alterações na sequência de DNA (Elmore 2007).

Por outro lado, em resposta ao stress metabólico dá-se uma acumulação da proteína p62 nas células, provocando alterações nas mitocôndrias (Mizushima et al. 2010). Sendo as mitocôndrias responsáveis pela energia no interior da célula, produzem ROS (“reactive oxygen species”) como sub-produto, o qual é mantido em níveis baixos por enzimas antioxidantes. Em situação de inibição autofágica, mitocôndrias envelhecidas não serão eliminadas, levando a uma maior produção de ROS o que pode resultar em maiores danos do DNA ou de proteínas que controlem o processo de replicação de DNA, levando ao aparecimento de cancro (Van Limbergen et al. 2009).

Assim, a promoção da apoptose pode ser um mecanismo pelo qual a autofagia pode suprimir o cancro, através da limitação da proliferação e desenvolvimento das células neoplásicas (Van Limbergen et al. 2009).

Por último, o sucesso da manipulação da autofagia depende muito da compreensão dos seus mecanismos, mas também do estado e evolução do cancro no organismo, sendo importante para a prevenção e desenvolvimento de novas terapias (Van Limbergen et al. 2009).

Conclusão

Esta dissertação serviu para reunir uma variedade de informação relativamente ao tema, no entanto, existe outros aspetos que poderiam ter sido abordados. Mas, sendo este, um tema demasiado complexo e relativamente novo, tornou-se difícil restringir a elaboração desta dissertação a um só tema, tendo por isso sido feita uma redação da informação mais relevante.

A autofagia degrada os componentes celulares deteriorados da própria célula, atuando como uma via de “reciclagem”, onde constitui um mecanismo de sobrevivência para conservar o metabolismo celular. Esta, através dos seus mecanismos moleculares tem um papel fundamental no sistema imunológico, no combate a elementos patogénicos.

Assim, depois de uma análise sobre a importância e relevância da autofagia no mundo atual, conclui-se que esta constitui um alvo com diferentes potenciais terapêuticos. Onde, a compreensão e investigação de todos os mecanismos autofágicos requerem paciência e dedicação para um total conhecimento destes.

Por último, esta dissertação como trabalho final de mestrado integrado tem grande importância no enriquecimento curricular, e neste aspeto acho que fui bem-sucedida, sendo esta uma mais-valia para o meu futuro enquanto profissional de saúde. Como Farmacêutica, o conhecimento acerca da autofagia é fulcral, visto a descoberta de novos fármacos revolucionar o desenvolvimento de novas terapias. Onde, o conhecimento da biologia da célula e os seus mecanismos moleculares, são fundamentais para estabelecer uma relação entre a sobrevivência celular e os mecanismos para manipular e controlar as vias patogénicas.

Bibliografia

Alberts, B. et al., 2002. *Molecular Biology of the Cell* 4^a edição., New York: Garland Science.

Amaravadi, R.K. et al., 2007. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *The Journal of clinical investigation*, 117(2), pp.326–36.

Axelrod, S. et al., 2008. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cellular microbiology*, 10(7), pp.1530–45.

Bocchetta, M. & Carbone, M., 2004. Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: molecular mechanisms of malignant transformation. *Oncogene*, 23(38), pp.6484–91.

Bogdan, C., 2012. *Listeria monocytogenes*: No Spreading without NO. *Immunity*, 36(5), pp.697–699.

Boya, P & Kroemer, G, 2009. Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis. *Oncogene*, 28(21), pp.2125–7.

Boya, Patricia et al., 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 25(3), pp.1025–40.

Brest, P. et al., 2011. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nature genetics*, 43(3), pp.242–5.

Cadwell, K. et al., 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg1611 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 456(7219), pp.259–63.

Campoy, E. & Colombo, María I, 2009. Autophagy in intracellular bacterial infection. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(9), pp.1465–77.

Castro, A. et al., 2010. Rotenone enhances the antifungal properties of staurosporine. *Eukaryotic cell*, 9(6), pp.906–14.

Cemna, M. & Brumell, J.H., 2012. Interactions of Pathogenic Bacteria with Autophagy Systems. *Current Biology*, 22(13), pp.R540–R545.

Ciechomska, I.A. et al., 2009. Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene*, 28(21), pp.2128–41.

Cruz, C.D., Martinez, M.B. & Destro, M.T., 2008. *Listeria monocytogenes* : Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alim. Nutr.*, 19(2), pp.195–206.

Deretic, V., 2006. Autophagy as an immune defense mechanism. *Current opinion in immunology*, 18(4), pp.375–82.

Deretic, V., 2010. Autophagy in infection. *Current opinion in cell biology*, 22(2), pp.252–62.

Deretic, V. & Klionsky, D.J., 2008. Como as Celulas Limpam a Casa. *Scientific American Brasil*, pp.54–61.

Deretic, V. & Levine, B., 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell host & microbe*, 5(6), pp.527–49.

Dwivedi, M. & Ahn, J., 2009. Autophagy--is it a preferred route for lifespan extension? *BMB reports*, 42(2), pp.62–71.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), pp.495–516.

Forte, W.C.N., 2007. *Imunologia: Do básico ao Aplicado 2ª Edição.*, Artmed, pp.17-23.

Glick, D., Barth, S. & Macleod, K.F., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), pp.3–12.

Gross, A., McDonnell, J.M. & Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 13(15), pp.1899–1911.

Gutierrez, M.G. et al., 2004. Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages. *Cell*, 119(6), pp.753–766.

Harding, H.P. et al., 2001. Diabetes Mellitus and Exocrine Pancreatic Dysfunction in Perk^{-/-} Mice Reveals a Role for Translational Control in Secretory Cell Survival. *Molecular Cell*, 7(6), pp.1153–1163.

He, C. et al., 2012. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*, 481(7382), pp.511–5.

Hiles, I.D. et al., 1992. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*, 70(3), pp.419–29.

Hussey, S., Travassos, L.H. & Jones, N.L., 2009. Autophagy as an emerging dimension to adaptive and innate immunity. *Seminars in immunology*, 21(4), pp.233–41.

Itakura, E. & Mizushima, N., 2011. p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *The Journal of cell biology*, 192(1), pp.17–27.

J, H. & B, M., 2008. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochemical Journal*, (412), pp.179–190.

Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R.J., 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), pp.307–17.

Klionsky, D.J., 2008. Autophagy revisited - A conversation with Christian de Duve. *Autophagy*, 4(6), pp.740–743.

Klionsky, D.J. & Saltiel, A.R., 2012. Autophagy works out. *Cell metabolism*, 15(3), pp.273–4.

Kroemer, Guido, Mariño, G. & Levine, B., 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, 40(2), pp.280–93.

Kumar, V., Abbas, A.K. & Aster, J.C., 2013. *Robbins Patologia Básica*, Elsevier Brasil, pp.928.

Van Limbergen, J. et al., 2009. Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal immunology*, 2(4), pp.315–30.

Liu, Chunli et al., 2010. Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *Journal of neurochemistry*, 115(1), pp.68–78.

Liu, Z. & Lenardo, M.J., 2007. Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases. *Developmental cell*, 12(4), pp.484–5.

Lleo, A. et al., 2007. Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *Journal of autoimmunity*, 29(2-3), pp.61–8.

Machín, R.P., Díaz, Y.R. & Hernández, M.C.V., 2006. La ruta mTOR como diana terapéutica. *BioCancer* 3, p.4.

Maiuri, M.C. et al., 2007. BH3-Only Proteins and BH3 Mimetics Induce Autophagy by Competitively Disrupting the Interaction Between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-XL. *Autofagia*, 3:4(August), pp.374–376.

Margarida, M., Carneiro, S. & Coimbra, U. De, 1995. Introdução ao Sistema Imunitário. *Conhecer a Imunologia*, pp.9–10.

Mizushima, N., Chen, N. & Debnath, J., 2010. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Letters*, 584(7), pp.1427–1435.

Moscat, J. & Diaz-Meco, M.T., 2009. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*, 137(6), pp.1001–4.

Murrow, L. & Debnath, J., 2013. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annual review of pathology*, 8, pp.105–37.

Ogata, M. et al., 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology*, 26(24), pp.9220–31.

Pattingre, S. et al., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), pp.927–39.

Petros, A., Olejniczak, E. & Fesik, S., 2004. *Structural biology of the Bcl-2 family of proteins*, Biochim Biophys Acta, pp.83-94.

Ramnath, M. et al., 2003. Development of a *Listeria monocytogenes* EGDe partial proteome reference map and comparison with the protein profiles of food isolates. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), pp.3368–76.

Ravikumar, B. et al., 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 90(4), pp.1383–435.

Singh, S.B. et al., 2006. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5792), pp.1438–41.

Songane, M. et al., 2012. The role of autophagy in host defence against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 92(5), pp.388–96.

Stange, E.F. et al., 2006. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*, 55 (1), pp.1–15.

Tsujimoto, Y. & Shimizu, S., 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell death and differentiation*, 12, pp.1528–34.

Valdor, R. & Macian, F., 2012. Autophagy and the regulation of the immune response. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 66(6), pp.475–83.

Vergne, I. et al., 2006. Autophagy in Immune Defense Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Autophagy*, 2:3, pp.175–178.

Wang, R.C. & Levine, B., 2010. Autophagy in cellular growth control. *FEBS letters*, 584(7), pp.1417–26.

Wirawan, E. et al., 2012. Autophagy: for better or for worse. *Cell research*, 22(1), pp.43–61.

Wu, H., Wang, M.C. & Bohmann, D., 2009. JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mechanisms of development*, 126(8-9), pp.624–37.

Wu, J. et al., 2006. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B--two novel markers of autophagosome. *Biochemical and biophysical research communications*, 339(1), pp.437–42.

Xu, Y. et al., 2008. Signaling pathway of autophagy associated with innate immunity. *Landes Bioscience, Autophagy*, pp.4–6.

Xu, Y. & Eissa, N.T., 2010. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(1), pp.22–8.

Yan, Y. & Backer, J.M., 2007. Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 2), pp.239–41.

Yang, Z.J. et al., 2011. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Molecular cancer therapeutics*, 10(9), pp.1533–41.