

Paulo André de Moura Monteiro

Estratégias Terapêuticas Baseadas na Modulação da Atividade Enzimática das Caspases



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2014

Estratégias Terapêuticas Baseadas na Modulação da Atividade Enzimática das Caspases:

Paulo André de Moura Monteiro

Estratégias Terapêuticas Baseadas na Modulação da Atividade Enzimática das Caspases



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2014

Estratégias Terapêuticas Baseadas na Modulação da Atividade Enzimática das Caspases:

Autor:

Paulo André de Moura Monteiro

Estratégias Terapêuticas Baseadas na Modulação da Atividade Enzimática
das Caspases

(Assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Agradecimentos

No vencer de mais uma etapa da minha vida não poderia deixar de referir as pessoas que tanto me ajudaram neste percurso de intensa aprendizagem.

Esta dissertação não representa apenas extensas horas de trabalho mas representa também todas as pessoas que atravessaram o meu percurso académico.

Queria agradecer à Universidade Fernando Pessoa por me ter proporcionado a minha formação profissional. Muito obrigada pela oportunidade.

Queria agradecer á minha orientadora, Professora Doutora Maria Gil Ribeiro, por todo o apoio, disponibilidade e atenção que sempre demonstrou. A forma como me acompanhou e orientou, procurando sempre resolver as dificuldades que foram surgindo, foi essencial para a execução deste trabalho. O meu sincero obrigado.

A todos os meus amigos, principalmente à Patrícia, por toda a força e apoio demonstrado, um obrigado.

À minha família por toda a força e incentivo, principalmente à minha irmã, que esteve presente nos momentos mais complicados, um grande OBRIGADO.

Por ultimo um obrigado a todos os meus colegas de trabalho pelas trocas que fizeram comigo para que esta etapa da minha vida fosse concluída.

Índice

Índice	1
Resumo.....	2
Abstract	3
Índice de figuras	4
Índice de tabelas	5
Abreviaturas e siglas	6
Capítulo I – Introdução.....	7
Capítulo II - Desenvolvimento	8
1- Ciclo Celular.....	8
2- Morte celular.....	9
3- Apoptose	10
4- Caspases	12
4.1 - Classificação	13
4.2 - Estrutura.....	14
4.3 - Maturação e ativação.....	15
4.4 - Substratos	17
4.5 - Regulação da atividade catalítica das caspases	17
4.6 - Regulação alostérica	18
5- Inibidores Sintéticos das Caspases.....	21
5.1 - Inibidores Ortostéricos.....	21
5.2 - Inibidores alostéricos das caspases.....	22
5.3 - Inibidores peptidomiméticos	22
5.4 - Pequenas moléculas inibidoras não peptídicas	24
5.5 - Inibidores naturais	25
6 - Terapias prospetivas	27
6.1 - Doenças oncológicas	27
6.2 - Doenças neurodegenerativas	28
6.3 - Doenças inflamatórias (Inflamassoma).....	33
Capítulo III – Conclusões e perspectivas futuras	34
Referências bibliográficas	35

Resumo

A morte celular é um processo geneticamente determinado e importante em organismos multicelulares. Esta pode ocorrer através de vários mecanismos moleculares sendo a apoptose o mais conhecido. Na apoptose, os executores da morte celular são proteínas designadas por caspases. Estas enzimas são endoproteases, mais especificamente proteases de cisteína que atuam a seguir a um resíduo de ácido aspártico. De acordo com a sua função, podem ser classificadas em três grupos: caspases inflamatórias, caspases iniciadoras da apoptose e caspases efetoras da apoptose. Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado a importância da modulação da atividade enzimática das caspases para fisiopatologia celular. Um inibidor ideal de caspases deverá ser altamente seletivo, possuir uma boa biodisponibilidade e ser farmacologicamente ativo. Entre os inibidores das caspases foram descritos inibidores ortostéricos, inibidores alostéricos, inibidores peptidomiméticos, pequenas moléculas inibidoras não peptídicas e inibidores naturais. Em doenças associadas a uma desregulação do processo apoptótico, tais como as doenças oncológicas, as doenças neurodegenerativas ou doenças inflamatórias, a inibição/ativação da apoptose através da modulação da atividade enzimática das caspases representa uma estratégia terapêutica promissora. Este facto tem contribuído para o desenvolvimento da investigação sobre a modulação da actividade enzimática das caspases e, subsequentemente, para a descoberta e caracterização de novas moléculas inibidoras e ativadoras das caspases. O presente trabalho de revisão bibliográfica foi desenvolvido com o objetivo de rever e integrar esta informação.

Palavras-chave: Apoptose, Caspases, Inibidores das caspases, Ativadores das caspases, Doença oncológica, Doença neurodegenerativa, Doença inflamatória.

Abstract

Cell death is a genetically determined process, which is important for multicellular organisms. This process occurs through several molecular mechanisms among which the best known is called apoptosis. In apoptosis the cell death executors are proteins, the caspases. These enzymes are endoproteases, more specifically cysteine proteases that cleave proteins after a residue of aspartic acid. According their function, caspases can be classified into three groups: inflammatory, initiators and effectors of apoptosis. In the last years, several studies have demonstrated the importance of the modulation of the enzymatic activity of caspases for cell pathophysiology. An ideal inhibitor should have high selectivity and bioavailability, and be pharmacologically active *in vivo*. Several caspase inhibitors have been described including ortosteric inhibitors, allosteric inhibitors, peptidomimetic inhibitors, non-peptide small molecule inhibitors and natural inhibitors. In diseases associated with dysregulation of the apoptotic process, such as oncologic diseases, neurodegenerative diseases or inflammatory diseases, the inhibition/activation of apoptosis through the modulation of the enzymatic activity of the caspases is likely to represent a promising therapeutic approach. This notion led to new research developments on the modulation of capase's cell activity and, subsequently, to the identification and characterization of novel drugs acting as enzyme inhibitors or activators. The present work reviews the main findings published in the literature about this topic.

Key-words: Apoptosis, Caspases, Caspase inhibitors, Caspase activators, Oncologic disease, Neurodegenerative disease, Inflammatory disease.

Índice de figuras

Figura 1- Representação esquemática da cascata de sinalização apoptótica.

Figura 2- Representação esquemática da ligação e activação FADD/Fas.

Figura 3 - A via apoptótica em *C. elegans*, mamíferos e *Drosophila*.

Figura 4- Classificação das caspases em mamíferos.

Figura 5- Estrutura das caspases.

Figura 6- Representação esquemática do processo de activação das caspases.

Figura 7- Representação esquemática da transição de uma proteína alostérica segundo o modelo MWC.

Figura 8- Estrutura química dos inibidores peptidomiméticos.

Figura 9- Sulfonamidas como inibidores heterocíclicos das caspases efetoras 3 e 7.

Figura 10- Evolução natural da doença de Alzheimer.

Figura 11- Alterações moleculares e celulares na doença de Alzheimer.

Índice de tabelas

Tabela 1- Inibidores peptidomiméticos.

Tabela 2- Especificidade de inibidores de caspases virais e celulares.

Tabela 3- Ação anti-tumoral da ativação das caspases em estudos *in vivo* e *in vitro*.

Abreviaturas e siglas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

APP - Proteína precursora amilóide

CrmA - Cytokine Response Modifier A

CARD – *Caspase activation and recruitment domain*

DA – Doença de Alzheimer

DP - Doença de Parkinson

DED - *Death Effector Domain*

DRONC - *Drosophila caspase*

FADD - *Fast Associated Protein with a Death Domain*

IAP – Inibidor de proteínas apoptóticas

ICE - Enzima de conversão da interleucina-1 β

Ki – Constante de inibição

Km – Constante de Michaelis

KNF - Koshland–Nemethy–Filmer

MWC - Monod–Wyman–Changeux

NLR - *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing proteins*

PARP - poli(ADP-ribose)-polimerase

RMN – Ressonância magnética nuclear

RNA - Ácido ribonucleico

RNAi - RNA de interferência

V_{max}- Velocidade máxima

Capítulo I – Introdução

A presente dissertação resultou de um trabalho de revisão bibliográfica que foi efetuado com o intuito de avaliar a importância das caspases em processos celulares vitais, assim como a sua relação com o aparecimento e/ou desenvolvimento de diversas patologias na espécie humana e, subsequentemente, a possibilidade de representarem alvos terapêuticos adequados em várias condições patológicas. Deste modo, o presente trabalho começa por descrever a importância biológica do ciclo celular e da morte celular programada com o propósito de facilitar a compreensão dos capítulos seguintes, nomeadamente quanto ao papel destas proteases na manutenção de um balanceamento adequado entre a sobrevivência e a morte celulares e à potencialidade terapêutica da modulação da sua actividade catalítica em doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias e cancro.

Capítulo II - Desenvolvimento

1- Ciclo Celular

O crescimento e a divisão de células somáticas dependem de uma série complexa de reações bioquímicas que ocorrem num período de 24 a 48 horas e que é denominada ciclo celular. O ciclo celular compreende os processos de duplicação de ADN (ácido desoxirribonucleico) e a fase mitótica (mitose ou cariocinese, e a citocinese), e dele resulta a produção de uma nova célula (Malumbres & Barbacid, 2001).

Para iniciar um ciclo, a célula em repouso (fase G₀) precisa de ser estimulada por fatores de crescimento, hormonas esteróides e/ou citocinas. Estes fatores ligam-se a recetores específicos desencadeando uma cascata de acontecimentos bioquímicos e morfológicos que conduzem a célula através de diferentes fases, isto é, da fase G₀ para as fases G₁-S-G₂ e, finalmente, para a mitose. A execução das reações e dos acontecimentos de cada fase do ciclo celular é mediada por diversos fatores, tais como: ciclinas A,B e D, enzimas quinases dependentes de ciclinas, fosfatases e proteínas inibidoras (Malumbres & Barbacid, 2001).

A progressão do ciclo celular é interrompida em momentos específicos nas transições das fases G₀/G₁, fases G₁/S e G₂/mitose. Nestes pontos específicos do ciclo celular, a célula decide se inicia o ciclo ou se passa para a fase seguinte, continuando o processo de proliferação, ou se sai do ciclo, iniciando o processo de diferenciação celular caso esteja na fase de mitose, ou, ainda, se entra em apoptose (Hoeijmarkers, 2001).

2- Morte celular

A expressão “morte celular programada” foi usada originalmente para descrever uma série coordenada de acontecimentos que conduzem à morte da célula (Mooi & Peeper, 2006).

Os processos de morte celular, todos eles regulados geneticamente e com as suas características morfológicas e bioquímicas específicas, compreendem a autofagia, a necrose regulada e a apoptose (Okada, 2004).

A autofagia é considerada um processo adaptativo, que ocorre em resposta ao *stress* metabólico, e que resulta na degradação de componentes celulares. No entanto, no caso do nível de *stress* exceder a capacidade adaptativa da célula, esta pode entrar em morte celular (Lum & DeBerardinis, 2005).

Por outro lado, a necrose regulada trata-se de um tipo de morte em que a célula sofre um acréscimo do volume celular, condensação moderada da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e, conseqüentemente, ruptura celular. Durante este processo, o conteúdo celular é libertado, o que causa danos às células vizinhas e uma reação inflamatória localizada (Lum, DeBerardinis, & Thompson, 2005).

Finalmente, a apoptose que é reconhecida por ser um processo conservado evolutivamente e vital para o desenvolvimento e o equilíbrio de organismos multicelulares. Diversos fatores podem desencadear a apoptose, entre eles a ativação de recetores de membrana específicos, agentes quimiotrópicos, radiação ionizante, danos no ADN, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas de oxigénio. Morfológicamente, este processo é caracterizado por arredondamento celular, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos que são fagocitados por células vizinhas, não desencadeando, por isso, uma reação inflamatória (Ivana *et al*, 2007).

3- Apoptose

A cascata de sinalização apoptótica compreende duas vias, a extrínseca (citoplasmática) e a intrínseca (mitocondrial), que são ativadas por moléculas solúveis que se ligam aos recetores da membrana plasmática ou por estímulos mitocondriais, respetivamente (Fig. 1). O estímulo (interno ou externo) gera um sinal intracelular que leva ao recrutamento de moléculas adaptadoras que irão relacionar o estímulo com uma via de sinalização específica, e posteriormente, ativar as moléculas efetoras da apoptose (enzimas proteolíticas específicas pertencentes à família das caspases) (Chowdhury *et al*, 2008).

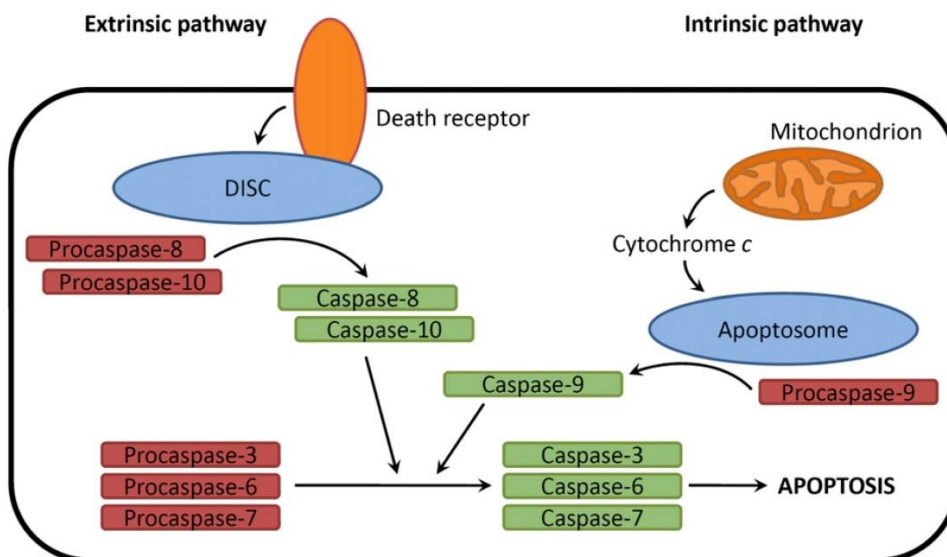


Figura 1- Representação esquemática da cascata de sinalização apoptótica (adaptado de Chowdhury *et al.*, 2008).

Na via extrínseca, uma molécula adaptadora intracelular (FADD, *Fas-associated protein with a death domain*) liga-se ao recetor Fas ativado pelo ligando (Fig. 2), numa região conhecida por DD (Domínio de morte, razão pela qual estes recetores são denominados por recetores de morte celular). Por sua vez, o FADD também possui um outro domínio, conhecido por DED (*death effector domain*), que irá ligar uma enzima

da classe das caspases e, deste modo, dar continuidade à execução da via extrínseca da apoptose (Ivana *et al*, 2007).

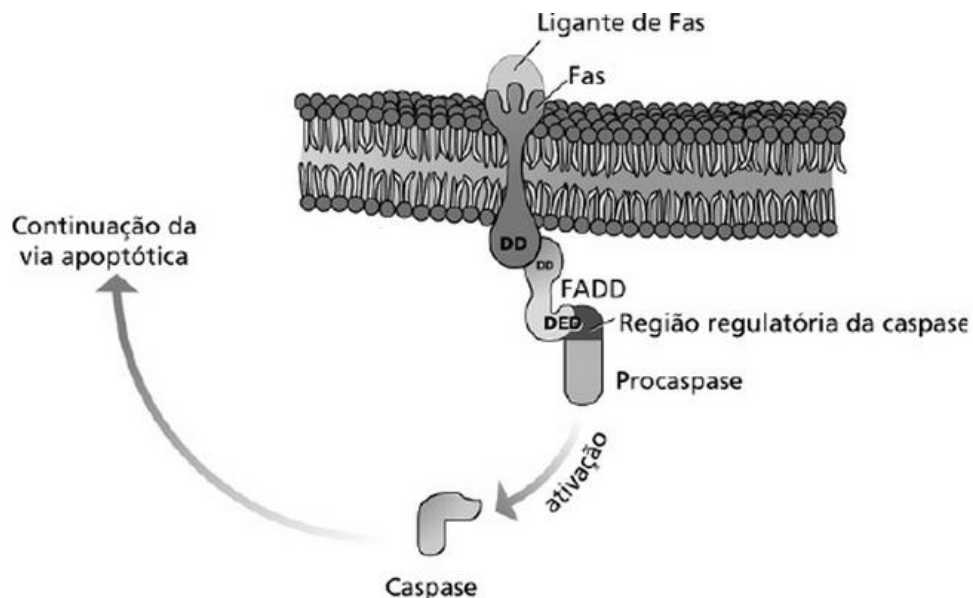


Figura 2- Representação esquemática da ligação e ativação FADD/Fas. (adaptado de Ivana *et al*, 2007)

Na via intrínseca, são usadas outras moléculas adaptadoras, nomeadamente proteínas Bax e Bid que são translocadas para a mitocôndria, inibindo especificamente a Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica. Deste processo resulta a formação de um poro na membrana mitocondrial e libertação, no citoplasma, do citocromo c (um dos transportadores de electrões da cadeia respiratória) e outras moléculas. O citocromo c liga-se a uma proteína adaptadora (Apaf-1) permitindo a ligação de uma pró-caspase que, após ativação, irá formar um complexo que conduzirá a célula à apoptose (Ivana *et al*, 2007).

4- Caspases

Estas enzimas e seus homólogos foram detetados em diversas espécies, desde os nemátodos (e.g. *C. elegans*) até aos dípteros (e.g. *D. melanogaster*). O facto destas proteínas terem sido conservados durante a evolução (Fig. 3) sugere que elas desempenharão uma função celular central, designadamente no âmbito da resposta apoptótica. Estas enzimas são endoproteases e a origem da sua designação está relacionada com o facto de serem proteases de cisteína (“c”) que clivam proteínas a seguir a resíduos de ácido aspártico (Asp-X) (“aspase”) (Alnemri *et al.*, 1996). A clivagem proteolítica promovida pelas caspases pode não só originar a inativação de substratos como também a formação de moléculas de sinalização ativas que participam nos processos de apoptose e inflamação. (Crawford & Wells, 2011).

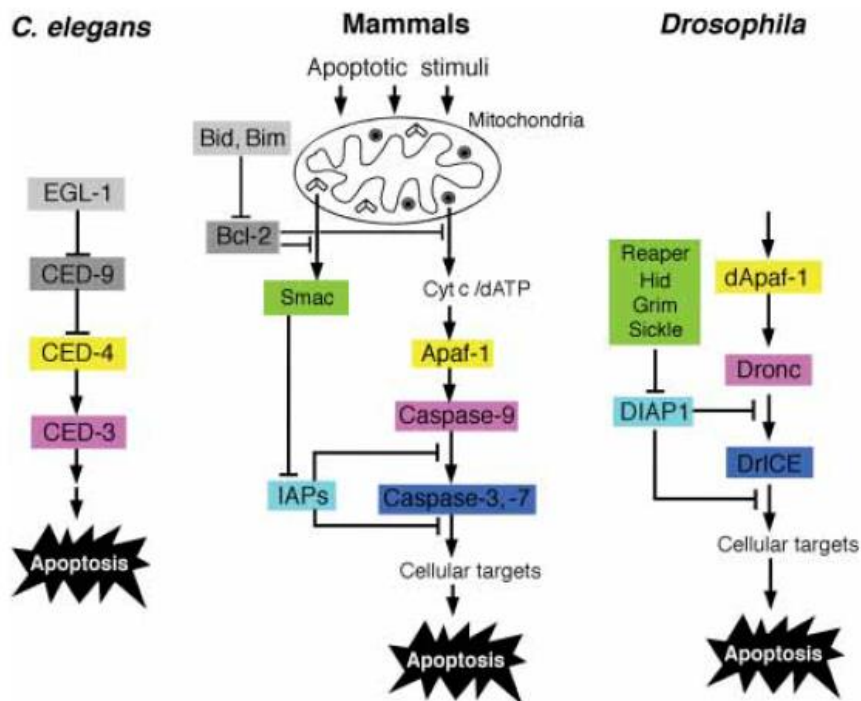


Figura 3 - A via apoptótica em *C. elegans*, mamíferos e *D. melanogaster* (adaptado de Shi, 2001).

O estudo das caspases iniciou-se com a descoberta do gene humano que codifica ICE (enzima conversora de interleucina-1 β) e que tem como homólogo em *C. elegans* o gene *Ced-3* cujo produto está envolvido na apoptose (Alnemri *et al.*, 1996). Os membros desta família foram identificados de acordo com a ordem da sua publicação. Por isso, o ICE, como primeiro membro a ser descoberto, adquiriu também a designação de caspase 1 (Cohen, 1997).

4.1 - Classificação

Como foi referido anteriormente as caspases são um grupo de proteases e, de acordo com a sua função, podem ser classificadas em três grupos (Fig. 4):

Caspases inflamatórias: incluem as caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14, que estão envolvidas na inflamação e não na apoptose.

Caspases iniciadoras da apoptose: incluem as que pertencem ao DED, as caspases 8 e 10, e ao domínio de ativação e recrutamento de caspases (CARD), as caspases 2 e 9, que vão mediar a interação na direção das moléculas adaptadoras (Apaf-1 e FADD).

Caspases efetoras da apoptose: incluem as caspases 3, 6 e 7. Esta classe executora caracteriza-se pela presença de um pequeno domínio amino-terminal e após ativação, por clivagem das subunidades, dão continuidade ao processo apoptótico pela clivagem de múltiplos substratos celulares (Degterev *et al.*, 2003).

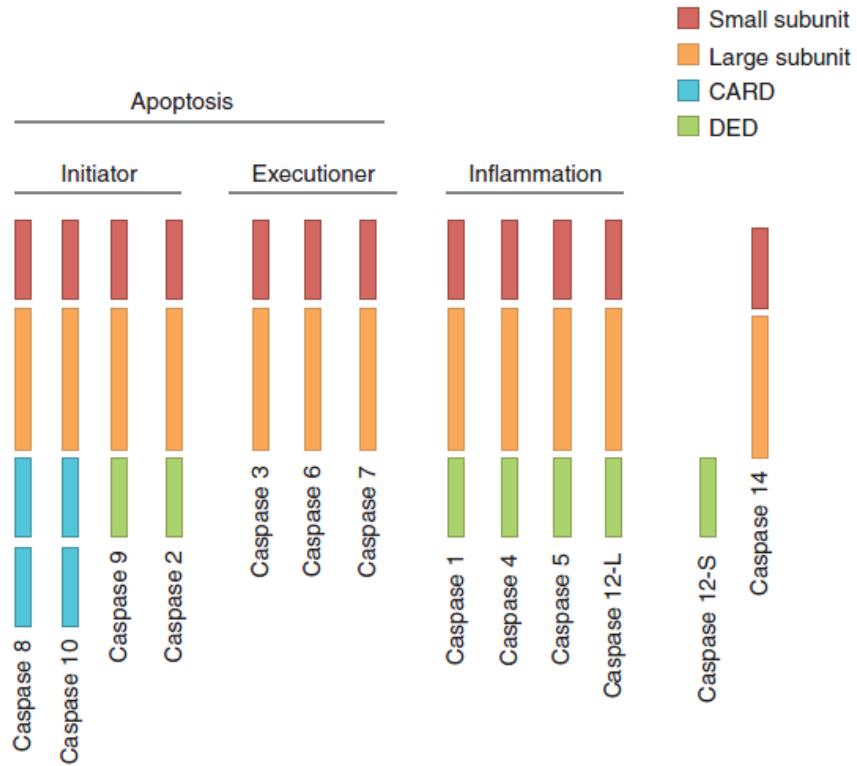


Figura 4- Classificação das caspases em mamíferos (adaptado de Mcilwain *et al.*, 2013).

4.2 - Estrutura

A estrutura das caspases é ilustrada na Fig. 5. As caspases são produzidas na forma de pró-enzimas e apresentam uma massa molecular entre 30-60 kDa. A clivagem desse precursor origina uma subunidade grande de 20 kDa (cadeia α) e uma pequena de 10 kDa (cadeia β) (Pop & Salvesen, 2009).

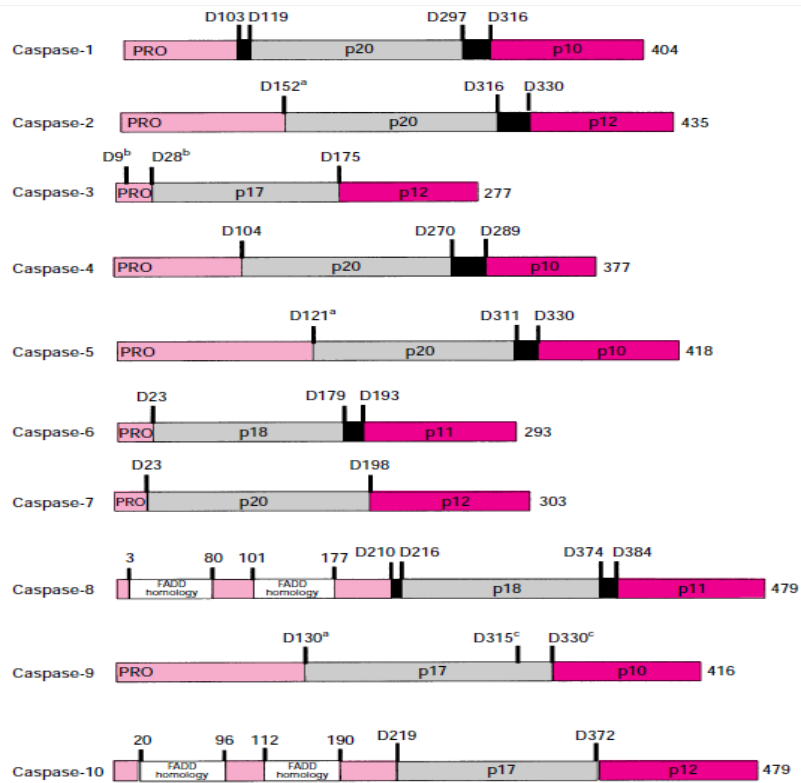


Figura 5- Estrutura das caspases (adaptado de Cohen, 1997).

4.3 - Maturação e ativação

O processo de ativação e maturação das caspases iniciadoras e das caspases efetoras está ilustrado na Fig. 6.

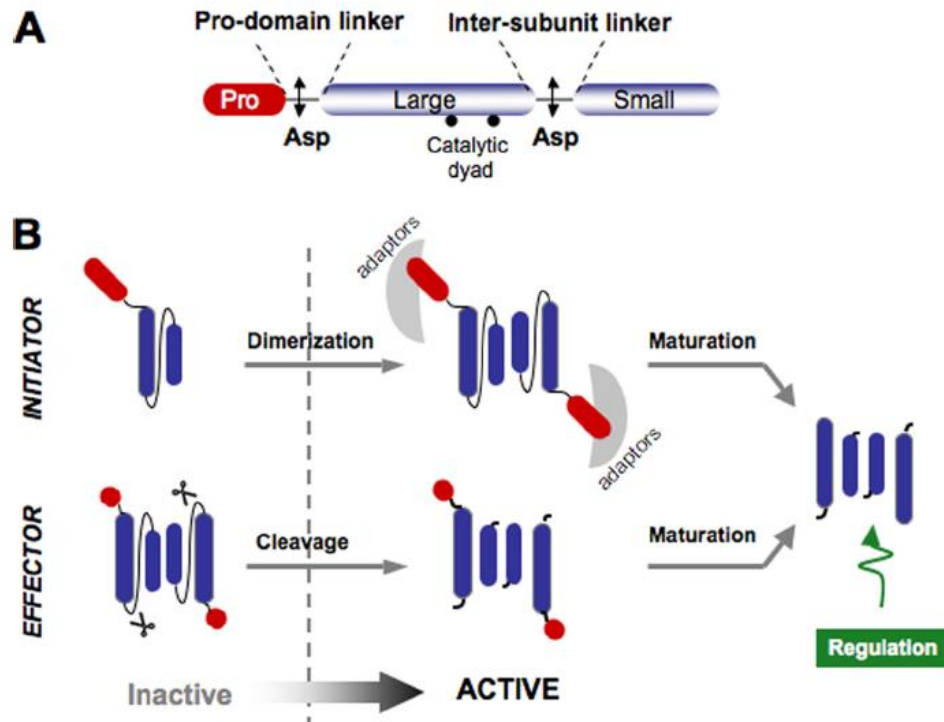


Figura 6 – Representação esquemática do processo de ativação das caspases (adaptado de Pop & Salvesen, 2009).

As caspases iniciadoras traduzem sinais extrínsecos recebidos por recetores membranares com domínio DED ou sinais endógenos provenientes da mitocôndria, e promovem a clivagem de caspases efetoras, ativando-as. As caspases iniciadoras 8 e 9 existem, normalmente, como monómeros inativos (pró-caspases) que são ativadas por dimerização e não por clivagem. A dimerização facilita a clivagem autocatalítica do monómero da caspase nas respetivas subunidades, pequena e grande, o que contribui para a estabilização do dímero. A ativação da pró-caspase 8 requer a associação com o cofactor FADD através do domínio DED, enquanto que a ativação da pró-caspase 9 envolve um complexo com o cofactor Apaf-1 através do CARD. A ativação da caspase 9 também requer a presença do citocromo c1 e da desoxiadenosina trifosfato. Estas duas caspases encontram-se no topo da sinalização da cascata das caspases (Lawen, 2003).

As caspases efetoras são ativadas pelas caspases iniciadoras e asseguram a proteólise celular. Este grupo de caspases é responsável pela fragmentação do invólucro nuclear, bem como da poli(ADP-ribose)-polimerase (PARP), enzima de reparação do ADN. A ativação da DNase promove a fragmentação do ADN (Lawen, 2003). As

caspases efetoras também atuam na degradação de outras proteínas, nomeadamente proteínas anti-apoptóticas (Bcl2 e Bcl-xL), proteínas de sinalização celular, de reparação e de síntese de macromoléculas, e a gelsolina (proteína de ligação à actina) (Lawen, 2003). A caspase 3 é um dos executores chave da apoptose sendo responsável, parcial ou totalmente, pela clivagem proteolítica de várias proteínas, igualmente importantes, tais como a enzima nuclear PARP (Cohen, 1997).

4.4 - Substratos

Vários estudos têm contribuído para a caracterização dos mecanismos catalíticos e especificidade das caspases relativamente aos substratos sobre os quais atuam (Poreba *et al.*, 2013).

As caspases foram classificadas de acordo com a sua especificidade quanto a péptidos sintéticos (testes *in vitro*) em três grupos: I (formado pelas caspases 1, 4, 5; preferência pela sequência WEHD), II (caspases 3, 7 e 2; preferência pela sequência DEXD) e III (caspases 6, 8 e 9; preferência pela sequência (LV)EXD) (Thomberry *et al.*, 1977).

Segundo Degterev e seus colaboradores, mais de 100 substratos foram identificados. Com base no estudo da sua função celular, os alvos das caspases podem ser subdivididos em seis categorias principais: (1) mediadores e reguladores da apoptose, (2) proteínas estruturais, (3) proteínas de reparação do ADN celular, e (4) proteínas relacionadas com o ciclo celular. (Degterev *et al.*, 2003).

4.5 - Regulação da atividade catalítica das caspases

Virtualmente, todos os processos celulares necessitam de ser controlados cuidadosamente uma vez que uma falha numa das etapas desses processos poderá conduzir à disfunção e, eventualmente, morte celular. As proteínas são os agentes reguladores preferenciais das atividades celulares. O controlo do nível de atividade biológica de uma proteína pode ser executado em diferentes alturas durante o seu ciclo

de vida: durante a expressão gênica, no momento da tradução, durante o tempo de vida da proteína por moléculas ativadores/inibidores ou através da sua degradação. Deste ponto de vista, as caspases não são uma exceção e a sua atividade pró-apoptótica tem de ser mantida sob controlo para que células saudáveis possam sobreviver (Tsai *et al.*, 2008).

A principal forma de regulação da atividade enzimática das caspases consiste na sua ativação proteolítica. No entanto, existem outros mecanismos, nomeadamente através da regulação do nível de expressão dos genes das caspases. De facto, apesar da apoptose não ser, geralmente, dependente do nível de produção das caspases, a regulação da expressão de genes de caspases pode modular a sensibilidade das células à apoptose. Por outro lado, algumas modificações pós-translacionais tais como nitrosilação, oxidação, fosforilação e ubiquitinação, também desempenham um papel importante na regulação da atividade das caspases (Maclachlan & El-Deiry, 2002).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado a importância da regulação alostérica como mecanismo modulador da atividade enzimática das caspases. A secção seguinte explora alguns aspetos deste mecanismo regulador, bem como a sua importância para a dinâmica do processo de sobrevivência vs. morte celular.

4.6 - Regulação alostérica

A alosteria, uma palavra articulada há mais de 50 anos, manteve uma importância central na biologia uma vez que ela é fundamental para a compreensão da maioria dos processos fisiológicos, não só a nível dos seus mecanismos moleculares e celulares mas, também, sobre o seu papel na saúde e na doença (rev. em Motlagh *et al.*, 2014).

O primeiro trabalho experimental sobre alosteria postulou que dois locais distintos numa proteína poderiam, contudo, interagir, apesar de não estarem sobrepostos na estrutura molecular. Esta "ação à distância" é um fenómeno difícil de interpretar na ausência de informações estruturais ou bioquímicas adicionais (rev. em Motlagh, *et al.*, 2014).

Apesar da sua importância, os mecanismos alostéricos, na maioria dos casos, continuam a ser um enigma biofísico. A alosteria foi mesmo referida como o "segundo

segredo da vida” (Hardy *et al.*, 2004). Por tudo isto, tem despertado a atenção de muitos investigadores. Este facto não é surpreendente uma vez que a alosteria é a chave para a regulação de muitos processos celulares mediados por proteínas. Na alosteria, a presença de um efetor induz uma alteração funcional no local de ligação da enzima ao substrato. Estas perturbações podem surgir devido a alterações do pH, temperatura, força iónica, concentração, modificações covalentes, bem como na sequência da ligação de moléculas grandes e pequenas. Os efetores resultam na alteração de parâmetros cinéticos das enzimas: um efetor positivo aumenta V_{max} ou diminui K_m , resultando no aumento da atividade da proteína; ao contrário, um efetor negativo, diminui V_{max} ou aumenta K_m (Tsai *et al.*, 2008).

Grande parte do conhecimento sobre os mecanismos alostéricos deve-se à análise de estruturas 3D de proteínas, usando cristalografia de raios-X ou espectroscopia de RMN. São conhecidos mais de 100 casos de proteínas alostericamente reguladas. A comparação das estruturas dessas proteínas tem contribuído para a compreensão do funcionamento do mecanismo alostérico (Tsai *et al.*, 2008). Nos anos 60 foram propostos dois modelos alternativos para descrever como funciona o mecanismo alostérico: MWC (Monod–Wyman–Changeux) e KNF (Koshland–Nemethy–Filmer) (Tsai *et al.*, 2008). O modelo MWC, também conhecido como modelo de simetria, descreve a transição como uma ação concertada entre dois estados- estado relaxado (R) ou tenso (T) (Fig 7). O modelo KNF é descrito como sequencial porque são induzidas, sequencialmente, alterações conformacionais. Ambos os modelos aplicam-se a conjuntos de proteínas oligoméricas de polipéptidos idênticos, ou subunidades, e podem não ser de natureza exclusiva (Tsai *et al.*, 2008).

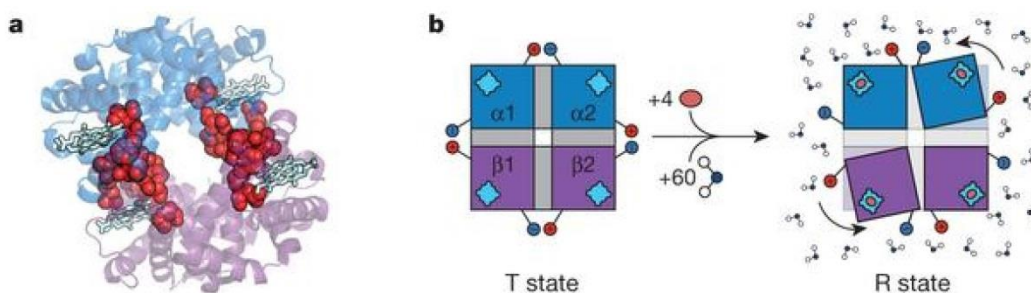


Figura 7- Representação esquemática da transição de uma proteína alostérica segundo o modelo MWC (adaptado de Motlagh, Wrabl, Jing, & Hilser, 2014).

Em suma, estes dois modelos clássicos apresentam 3 características comuns: Existem apenas dois estados; Ocorre uma alteração conformacional no local de ligação do substrato; O sinal alostérico é transmitido através de uma única via.

A evidência científica indica que o estado nativo é um conjunto conformacional e que perturbações alostéricas envolvem uma mudança de conformações pré-existentes, algumas exibindo já uma conformação alterada no local de ligação ao substrato. Esta nova visão amplia a definição de alosteria. Ao contrário dos modelos clássicos, esta descreve a existência de proteínas como conjuntos, e não apenas os dois estados conformacionais. Acrescenta ainda a alosteria como um fenômeno termodinâmico, podendo estar sujeita a fenômenos de entalpia e/ou entropia (Tsai *et al.*, 2008).

5- Inibidores Sintéticos das Caspases

Cientistas, biólogos, químicos e farmacêuticos, discordam quando se fala no que será um ótimo e seletivo inibidor enzimático. Contudo, um inibidor ideal deverá apresentar um $K_i < 10$ nM, ser altamente seletivo, possuir uma boa biodisponibilidade e ser farmacologicamente ativo. Contudo, existem ainda caspases que não possuem inibidores com estas características (Poreba *et al.*, 2013).

Com a clonagem do gene *Ced-3*, que codifica para uma proteína essencial do processo de morte celular programada no *Caenorhabditis elegans*, e a sua semelhança com o ICE, tornou-se claro que as caspases são necessárias para a morte celular deste nemátodo e que os inibidores das caspases poderiam evitar a sua morte celular (Callus & Vaux, 2006).

5.1 - Inibidores Ortostéricos

O perfil do inibidor é traçado através da análise da estrutura da caspase por cristalografia de raio-X e /ou de estudos de relação estrutura-atividade inibitória. A análise estrutural detalhada de caspases ligadas a vários inibidores peptídicos tem sido amplamente usada na tentativa de definir se existem algumas propriedades estruturais vinculadas a uma caspase em particular. A descoberta mais importante e que resultou de estudos comparativos das estruturas de caspases veio mostrar uma elevada flexibilidade estrutural e mobilidade do local ativo. Deste modo, esta observação antecipa uma enorme dificuldade em desenhar um inibidor específico baseado apenas em informações estruturais. Apesar disso, esta metodologia tem sido muito útil no desenvolvimento de inibidores das caspases (Poreba *et al.*, 2013).

Com base na literatura, as estruturas de inibidores de caspases podem ser divididas em três regiões: amino-terminal, posição P4; dipéptido região P3-P2 e um grupo electrofílico, posição P10, muitas vezes chamado de “*warhead*”. Uma série de inibidores são sintetizados, em que se varia uma determinada região e o resto se mantém inalterado (Poreba *et al.*, 2013). Desta forma, vários tipos de inibidores sintéticos têm sido descritos na literatura, como irei abordar de seguida.

5.2 - Inibidores alostéricos das caspases

Ao contrário dos inibidores ortostéricos, em que o ponto de partida é a de reproduzir a forma de ligação do substrato, os inibidores alostéricos são mais difíceis de arquitetar. Foram estabelecidas diferentes técnicas para a identificação de locais alostéricos em proteínas. Com base na análise de bases de dados de moléculas pequenas, os modos de ligação distintos a partir do centro ativo podem ser identificados por análises de cinética e por cristalografia de raios-X (Hacker *et al.*, 2011).

A utilização do método “*disulfide trapping*” (utiliza compostos de tiol que formam ligações dissulfureto com resíduos de cisteína da proteína) permitiu a identificação de novos locais alostéricos nas caspases (Hardy *et al.*, 2004). No caso das caspases 1, 3 e 7 foram identificados locais alostéricos que poderiam ser utilizados para inibir a formação de dímeros, nomeadamente dois inibidores FICA (5-flúor-1H-indole-2-ácido carboxilo (2-mercaptoetilo) amida) e DICA (2-(2,4-dichlorofenoxi-N-(2-mercapto-etil)-acetamida) (MacKenzie *et al.*, 2010).

5.3 - Inibidores peptidomiméticos

Nesta classe de inibidores peptidomiméticos incluem-se o pralnacasan, o VX-765 e o emricasan (Figura 8). O uso deste tipo de inibidores de caspases é muitas vezes restrito *in vivo* porque o efeito terapêutico é limitado devido à fraca permeabilidade celular, instabilidade metabólica, toxicidade, dificuldades com a inibição dependente de tempo e falta de especificidade dentro da família de enzimas (MacKenzie *et al.*, 2010).

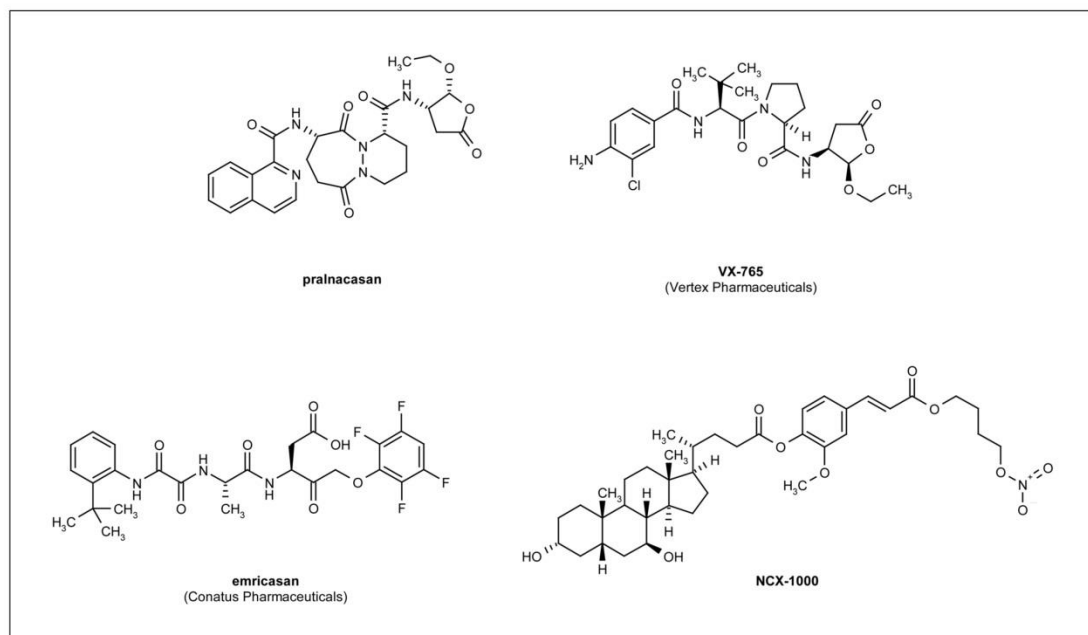


Fig.8- Estruturas químicas dos inibidores peptidomiméticos (adaptado de MacKenzie, Schipper, & Clark, 2010)

O mecanismo molecular e as patologias alvo destes inibidores são descritos na Tabela 1.

Tabela 1-Inibidores peptidomiméticos (adaptado de MacKenzie, Schipper, & Clark, 2010).

Inibidores	Caspases alvo	Aplicação
Pralnacasan (VX-740)	Caspase 1	Artrite Reumatóide
VX-765	Caspase 1	Doenças Inflamatórias
Emricasan (IDN-6556)		Hepatite C

Devido a problemas de seletividade, a maioria destes inibidores não chegaram a ser utilizados em estudos pré-clínicos em modelos animais de patologias humanas (Callus & Vaux, 2006). Apenas 4 inibidores, VX-740 VX-765, IDN-6556 e LB-84451 chegaram a ser utilizados em ensaios clínicos em modelos humanos, tendo dois deles, o VX-740 e o IDN-6556, sido descontinuados na fase 2 desses ensaios (Callus & Vaux, 2006).

5.4 - Pequenas moléculas inibidoras não peptídicas

As pequenas moléculas inibidoras não peptídicas poderão ser mais promissoras do que os inibidores peptidomiméticos uma vez que permitirão contornar as limitações relativas à fraca eficácia terapêutica, desde que ultrapassado o problema da permeabilidade celular. Todas as sulfonamidas, bem como quinonas, epoxi-quinonas e óxido nítrico demonstraram uma promissora eficácia e melhor permeabilidade (MacKenzie *et al.*, 2010).

Os representantes mais promissores desta classe têm como base a estrutura da sulfonamida (Fig. 9). O composto 7 inibe as caspases 3 e 7 ($K_i \sim 15$ e $K_i \sim 47$ nM, respectivamente). Mais recentemente, o inibidor representado pelo número 8 foi identificado como sendo também específico das caspase 3 e 7 e tem sido usado em estudos de imagiologia de apoptose tumoral (Nguyen *et al.*, 2009).

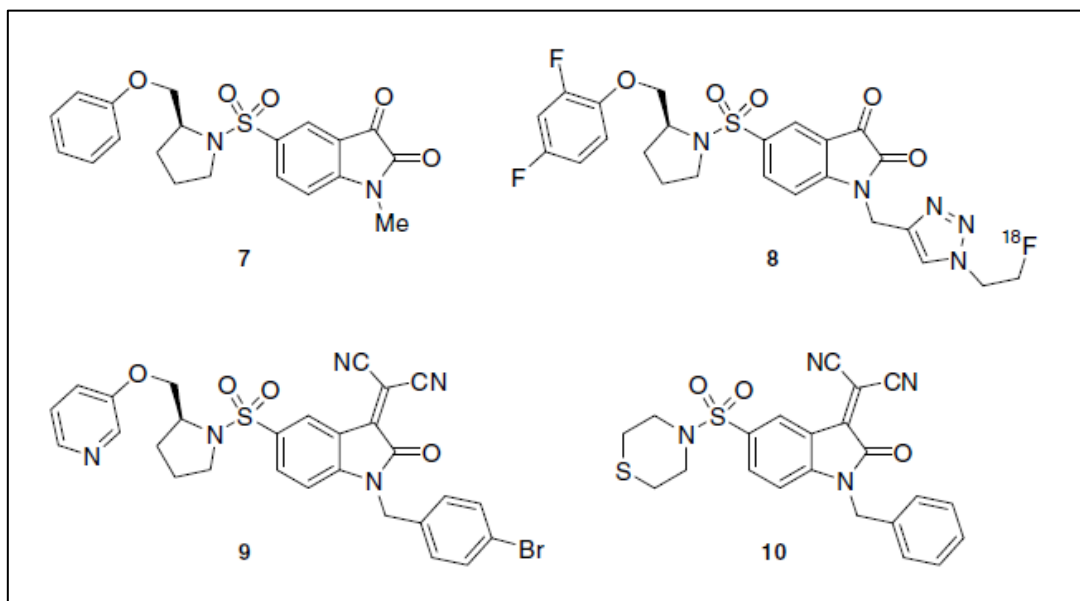


Figura 9 - Sulfonamidas como inibidores heterocíclicos das caspases efetoras 3 e 7 (adaptado de Nguyen *et al.*, 2009).

5.5 - Inibidores naturais

Uma família de inibidores da apoptose, CARPs (*caspase-associated ring proteins*, CARP-1 e CARP-2), que se ligam e regulam negativamente a atividade enzimática de caspases DED foi recentemente isolada. Adicionalmente, vários reguladores negativos de caspases foram identificados em humanos e vírus. Alguns deles são explorados por vírus para escapar às defesas do hospedeiro através da inibição da apoptose, como por exemplo o CrmA (*cytokine response modifier A*, produto do vírus da varíola que inibe a atividade de ICE). Vários outros inibidores foram identificados (Tabela 2): P35, v-FLIP, P49, OpIAP, DIAP1, XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ILP-2, ML-IAP, NAIP e BRUCE (Callus & Vaux, 2006). Aparentemente os IAPs são os reguladores negativos mais importantes das caspases, inibindo a apoptose induzida por uma ampla variedade de estímulos. São conhecidos oito IAP humanos, incluindo XIAP, c-IAP 1, c-IAP2 e Survivina (Callus & Vaux, 2006).

Tabela 2- Especificidade de inibidores de caspases virais e celulares (adaptado de Callus & Vaux, 2006)

Inibidores de caspases	Origem	Caspases alvo	Força de inibição (se conhecida)
CrmA	Vírus Cowpox	Caspase 1 Caspase 8 Caspase 10	Ki 4–10pM Ki<340pM Ki 4–17nM
P35	Baculovírus	De largo espectro, por exemplo, inibe a caspase 1, 3, 6, 8, 7 e 10	Ki 0.1–9nM
P49		Largo espectro; Inibidor de caspases, como p35, mas também inibe as caspases iniciadoras DRONC e caspase 9	_____
OpIAP	Baculovírus	Não inibe diretamente a atividade da caspase	
DIAP1	<i>Drosophila</i>	DRONC	Forte inibidor da ativação DRONC
XIAP	Mamíferos	Caspase 3 Caspase 7 Caspase 9	IC50 0.1–2nM IC50 1–10nM IC50 10nM
cIAP1	Mamíferos	Não inibe diretamente caspases em concentrações fisiológicas	_____
cIAP2	Mamíferos	Não inibe diretamente caspases em concentrações fisiológicas	_____
ILP-2	Humano	Não inibe diretamente caspases em concentrações fisiológicas	_____
ML-IAP	Mamíferos	Não inibe diretamente caspases em concentrações fisiológicas	_____
NAIP	Mamíferos	Não inibe diretamente caspases em concentrações fisiológicas	_____
BRUCE	Mamíferos	Não inibe diretamente caspases em concentrações fisiológicas	_____

6 - Terapias prospectivas

6.1 - Doenças oncológicas

O corpo humano utiliza mecanismos sofisticados de proteção contra o desenvolvimento do cancro. Esses mecanismos consistem no reconhecimento e subsequente reparação de mutações no ADN ou na eliminação da célula defeituosa antes de se tornar numa célula oncogénica. As caspases são intervenientes cruciais do processo apoptótico, logo não é surpreendente que qualquer desequilíbrio ao nível destas proteases ou nas vias em que estão envolvidas possa estar associado com o aparecimento ou desenvolvimento do cancro (Mcilwain *et al.*, 2013).

As mutações hereditárias nos genes *CASP* que codificam para proteínas da família das caspases são relativamente raras. Contudo, certos polimorfismos nos genes *CASP* afetam a abundância ou a atividade enzimática da caspase respetiva e têm, por isso, sido associados à origem do cancro. (Mcilwain *et al.*, 2013).

Apesar do número crescente de quimioterápicos no mercado, os fármacos disponíveis e a sua seletividade não tem sido satisfatória, o que tem levado ao desenvolvimento de novas abordagens que visem um grau de seletividade adequado para as células cancerígenas (Philchenkov *et al.*, 2004). Deste ponto de vista, as caspases ou outros reguladores endógenos representam um alvo terapêutico promissor (Philchenkov *et al.*, 2004). Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para ativação das caspases e subsequente estimulação da apoptose em células cancerígenas, algumas das quais são apresentadas na Tabela 3 (Philchenkov *et al.*, 2004).

Tabela 3- Ação anti-tumoral da ativação das caspases em estudos *in vivo* e *in vitro* (adaptado de Philchenkov, Zavelevich, Krocak, & Los, 2004)

Alvo	Resultados <i>In Vitro</i>	Resultados <i>In Vivo</i>
Caspase 1 e 3	Indução da apoptose em humanos: cancro da próstata (células LNcaP e PC-3)	Inibição do crescimento e diminuição do volume de tumores TRAMP-C2
Caspase 3	Diminuição do crescimento e indução de apoptose em cancro gástrico (células SGC7901)	_____
Procaspase 3	Indução da apoptose em carcinoma do ovário	_____
Caspase 6	Indução da apoptose em células de glioma malignas	Supressão do crescimento
Caspase 8	Indução da apoptose no cancro do cólon (células DLD-1)	_____
Caspase 9	Indução da apoptose em melanomas	Indução de apoptose em células endoteliais

6.2 - Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas (como a doença de Alzheimer, Huntington ou Parkinson) são altamente incapacitantes e caracterizadas pela perda de uma ou mais funções do sistema nervoso (Sharma *et al.*, 2013). Na sua maioria são doenças incuráveis. Uma característica comum das doenças neurodegenerativas é o aumento da apoptose (ou morte celular programada) de alguns tipos específicos de células neuronais. Por isso, a redução da apoptose através da inibição da atividade enzimática das caspases, constitui uma abordagem terapêutica promissora (Sharma *et al.*, 2013). Embora os mecanismos moleculares e celulares destas doenças ainda não se encontrem completamente esclarecidos, nos últimos anos registaram-se alguns avanços ao nível das possibilidades terapêuticas que poderão ser aplicadas, no futuro, no tratamento destas doenças.

6.2.1 - Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de declínio cognitivo em adultos, sobretudo idosos, representando mais de metade dos casos de DA (Forlenza, 2005).

A DA caracteriza-se por distúrbios progressivos de memória e outras funções cognitivas, afetando o funcionamento ocupacional e social (Forlenza, 2005). Nesta doença observa-se uma diminuição no processo de aquisição de novas informações, com agravamento progressivo. Embora haja certa preservação da memória remota em estádios iniciais, observa-se uma perda de memória global ao longo da evolução da doença. O indivíduo torna-se progressivamente incapaz de desempenhar atividades da vida diária (trabalho, lazer, vida social) e de cuidar de si mesmo (vestir-se, alimentar-se), passando a depender de alguém. Na fase avançada da doença observa-se a tríade afasia, apraxia e agnosia, caracterizada pela perda significativa da linguagem, da capacidade de desempenhar tarefas e de nomear pessoas e objetos (Forlenza, 2005).

A doença é caracterizada pela formação de placas neuríticas ricas em peptídeo β -amilóide, tranças neuro fibrilares ricas em proteína Tau hiperfosforilada, gliose e uma resposta neuroinflamatória que envolve astrócitos e microglia, conduzindo inevitavelmente a um progressivo declínio cognitivo global (Weksler, 2004). As placas senis resultam do metabolismo anormal da forma precursora da proteína amiloide (APP), conduzindo à formação de agregados do peptídeo β -amilóide (Weksler, 2004).

Os doentes de Alzheimer não apresentam os sintomas sempre pela mesma ordem ou pelo mesmo nível de gravidade; no entanto, existe um padrão geral de evolução da doença que compreende três estádios principais (Figura 10). O primeiro estádio caracteriza-se por discretas alterações da memória. No segundo estádio, os problemas de memória acentuam-se, com predomínio da memória de curta duração, sendo que a memória para acontecimentos distantes permanece intacta por mais tempo. Torna-se mais difícil interpretar os estímulos (tato, paladar, visão e audição) o que tem repercussões na vida diária sob a forma de: perda de apetite, incapacidade para ler, e alucinações visuais/auditivas. A insónia pode tornar-se um problema pela perda da noção dia/noite. Os pacientes começam a dormir mais de dia, permanecem em vigília durante a noite e a noção de tempo é afetada. Por outro lado, os movimentos tornam-se

menos precisos, menos coordenados e têm cada vez menos equilíbrio postural. Os pacientes tendem a sofrer de instabilidade emocional, podendo tornar-se agitados e agressivos. Os problemas de comunicação agravam-se com a incapacidade para compreender a fala e a escrita. Neste estadio, não é invulgar que os pacientes repitam constantemente as mesmas palavras ou frases. No terceiro estadio, pode-se dizer que o paciente sofre de demência grave. As capacidades cognitivas desapareceram quase por completo e o indivíduo perde a capacidade de entender ou utilizar a linguagem. A incontínência passa a ser total, e perde-se a capacidade para andar, sentar, sorrir e engolir. A progressão dos sintomas pode sofrer grandes variações, no entanto o agravar progressivo dos sintomas ocorre de forma gradual e contínua, habitualmente num período de 2 a 20 anos (Cruz *et al.*, 2004).

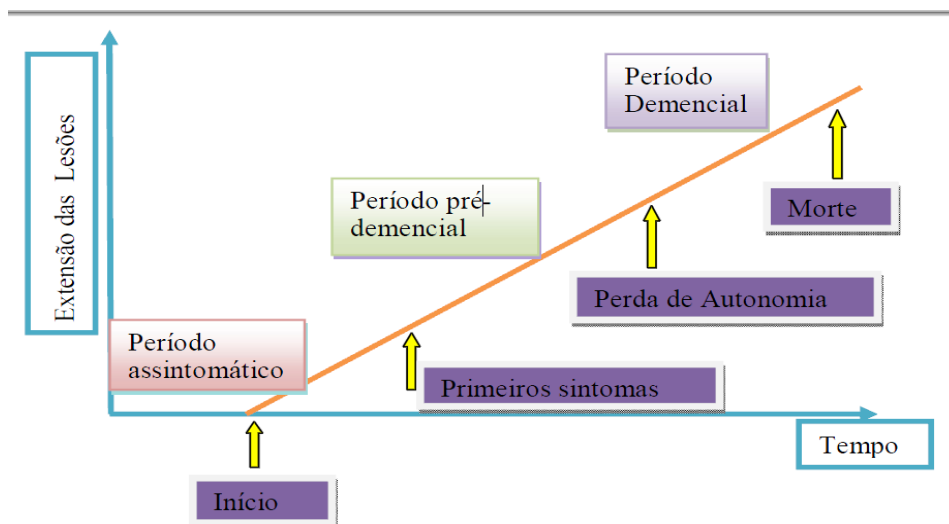


Figura 10- Evolução natural da doença de Alzheimer (adaptado de Cruz, Pais, Teixeira, & Nunes, 2004).

Na DA, é reconhecido que as caspases têm um papel ativo no desenvolvimento de placas de β -amilóide induzindo neurotoxicidade (Figura 11). De facto, vários estudos comprovaram a presença das caspases 1,2,3,5,6,7,8 e 9 em cérebros de doentes afetados com a DA (Madden & Cotter, 2008). A caspase 3, por exemplo, tem sido detetada em neurónios de pacientes com DA juntamente com NTF (fator de necrose tumoral) e placas senis, sugerindo que a caspase 3 tem um papel importante na degeneração

6.2.2 - Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, sendo a segunda patologia neurodegenerativa mais comum a seguir à doença de Alzheimer. Afeta aproximadamente 1% da população com idade acima dos 50 anos. Os sinais clínicos da doença caracterizam-se por tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (Singha & Dikshitb, 2007).

A DP é classicamente caracterizada pela perda de neurónios estriados dopaminérgicos. Contudo, a DP tem uma patofisiologia complexa que ainda não foi completamente elucidada e envolve múltiplas estruturas cerebrais e vias de sinalização (Lo *et al.*, 2002). Estudos epidemiológicos sugerem que a exposição a toxinas ambientais está intimamente associada a um risco aumentado de desenvolvimento de DP (Sherer *et al.*, 2002). A maioria dos estudos centraliza a sua atenção numa única terapêutica que passa por aumentar os níveis de dopamina (terapêutica de reposição) ou introduzir enzimas-chave envolvidas no metabolismo da dopamina (Fahn, 2006).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que neurotoxinas específicas, tais como rotenona, podem induzir neurotoxicidade através da ativação de caspase-3 (Sherer *et al.*, 2002). Assim, uma estratégia terapêutica promissora consiste em impedir a morte dos neurónios na fase precoce da doença e, dessa forma, tratar ou retardar a progressão da doença (Sherer *et al.*, 2002). Uma vez que esses mesmos estudos sugerem que a caspase 3 desempenha um papel central no processo de apoptose do neurónio, esta enzima pode constituir um alvo atrativo para a terapia anti-apoptótica na DP (Sherer *et al.*, 2002).

A perda de neurónios é geralmente acompanhada pela morte de astrócitos e ativação da microglia. Estudos mais recentes revelaram que a ativação da microglia e, subsequentemente, a neurotoxicidade mediada por inflamação são fundamentais na patogénese da DP. Para além disso, a inibição da caspase 3 pode efetivamente bloquear a ativação da microglia e desempenhar, por isso, um duplo efeito: anti-apoptótico e anti-inflamatório (Burguillos *et al.*, 2011).

A tecnologia do RNA de interferência (RNAi), ao induzir o silenciamento da expressão de um gene específico através da inibição da sua transcrição, representa uma abordagem terapêutica promissora em doenças neurodegenerativas. No caso de DP e DA, esta metodologia aplicar-se-ia à caspase-chave do processo fisiopatológico, ou seja,

à caspase 3 através da regulação negativa da expressão do gene respectivo. Contudo, muitas barreiras naturais, nomeadamente a barreira hemato-encefálica, terão, ainda, de ser contornadas para se alcançar uma terapia segura e eficiente destas doenças baseadas no uso de siRNA ou RNA hairpin curto (shRNA) (Wood *et al.*, 2003).

6.3 - Doenças inflamatórias (Inflamassoma)

A imunidade natural ou inata é considerada como o primeiro sistema de proteção do organismo contra a infeção por microorganismos. Este é um mecanismo inicial não específico mas muito importante para ativação da imunidade celular (linfócitos) e humoral (anticorpos) que são mecanismos de defesa específicos contra as moléculas antigénicas do agente patogénico (Martinon *et al.*, 2009).

Os sensores de reconhecimento de ácidos nucleicos de origem microbiana ou do próprio hospedeiro são importantes na ativação da imunidade natural atuando como indutores da produção de interferon gama e da formação do inflamassoma, ativando diferentes mecanismos de imunidade e processos patológicos distintos (Martinon *et al.*, 2009).

O inflamassoma é um complexo multiproteico composto pelas proteínas NLR (*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing proteins*), adaptador ASC (da caspase 1) e a enzima caspase 1 (caspase inflamatória). A ativação de proteínas NLR leva ao recrutamento da proteína adaptadora ASC e da caspase-1 com formação de um complexo pentamérico ou heptamérico. Assim, o mecanismo de ativação da caspase iniciadora depende da ativação de uma plataforma molecular- o inflamassoma (Davis *et al.*, 2011). Deste modo, também no caso de doenças inflamatórias, como é o caso da artrite reumatóide, a inibição das caspases, especificamente a caspase 1, poderá representar um potencial alvo terapêutico.

Capítulo III – Conclusões e perspectivas futuras

As caspases são sintetizadas na célula como precursores inativos (pró-caspases) e são ativadas por clivagem proteolítica (catalisada por outras caspases, já ativadas). Uma vez ativadas, as caspases clivam e ativam outras pró-caspases, resultando numa cascata proteolítica amplificada e irreversível.

Apesar da dificuldade observada na obtenção de um fármaco seletivo para as caspases, o conhecimento científico atual torna evidente que as caspases são um importante alvo terapêutico para a inibição da apoptose. No entanto, a inibição da apoptose terá que ser suficientemente seletiva para evitar o bloqueio da apoptose normal, necessária nos organismos multicelulares. Apesar dos avanços já registados neste domínio, existe ainda um largo campo de investigação em aberto para o desenvolvimento de inibidores de caspases e para o estudo do seu potencial no tratamento de doenças oncológicas, neurodegenerativas e inflamatórias, entre outras.

Referências bibliográficas

- Alnemri, E. et al., 1996. *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 87(2), 171.
- Burguillos, M. et al., 2011. *Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity*. Nature, 472(7343), 319–324.
- Callus, B. & Vaux, D., 2006. *Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical*. Nature Publishing Group, 14(1), 73-78.
- Castro, R. et al., 2010. *Cell Death Targets and Potential Modulators in Alzheimer's Disease*. Curr Pharm Des, 16(25), 2851-2864.
- Chowdhury, I., Tharaken, B. & Bhat, G., 2008. *Caspases- an update: Comparative Biochemistry and Physiology*. Biochemistry & Molecular Biology, 151(1), 10-27.
- Cohen, G., 1997. *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 326(1), 1-16.
- Crawford, E. & Wells, J., 2011. *Caspase substrates and cellular remodeling*. Annu Rev Biochem, 80, 1055–1087.
- Cruz, T., Pais, J., Teixeira, A. & Nunes, B., 2004. *The initial symptoms of Alzheimer disease: caregiver perception*. Acta Med Port, 17(6), 437-444.
- Davis, B., Wen, H. & Ting, J., 2011. *The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases*. Annu Rev Immunol, 29, 707-735.
- Degterev, A., M., B. & Yuan, J., 2003. *A decade of caspases*. American Association for Cancer Research, 22(53), 8543-8567.
- Earnshaw, W., Martins, L. & Kaufmann, S., 1999. *Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis*. Rev Biochem, 68, 383-424.
- Fahn, S., 2006. *Levodopa in the treatment of Parkinson's disease*. J Neural Transm Suppl, 71, 1–15.
- Faris, A., Lotfy, M. & Wyse, R., 2010. *Swords of Cell Death: Caspase Activation and Regulation*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 11(2), 271-280.

- Forlenza, O., 2005. *Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease*. Rev Psiq Clin, 32(3), 137-148.
- Hacker, H., Sisay, M. & Gutschow, M., 2011. *Allosteric modulation of caspases*. Pharmacology & Therapeutics, 132, 180-195.
- Hardy, J. et al., 2004. *Discovery of an allosteric site in the caspases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(24), 12461–12466.
- Hoeijmakers, J., 2001. *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 411, 366-374.
- Ivana, G., Andréa, R. & Adriana, R., 2007. *Apoptosis: Programmed Cell Death*. Revista Brasileira de Cancerologia, 53(3), 335-343.
- Jäger, R. & Zwacka, R., 2010. *The Enigmatic Roles of Caspases in Tumor Development*. J Cancers, 2(4), 1952-1979.
- Kaplowitz, N., 2000. *Cell death at the millennium. Implications for liver diseases*. Clin Liver Dis, 4(1), 1-23.
- Lawen, A., 2003. *Apoptosis—an introduction*. BioEssays, 25(9), 888–896.
- Lee, D. et al., 2001. *Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7*. Journal of Medicinal Chemistry, 44(12), 2015–2026.
- Lo, B. et al., 2002. *Alpha-Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci USA, 99(16), 10813–10818.
- Lum, J. & DeBerardinis, R. et. al., 2005. *Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty*. Nat Rev Mol Cell Biol, 6, 439-448.
- MacKenzie, S., Schipper, J. & Clark, C., 2010. *The potential for caspases in drug discovery*. National Institutes of Health, 13(5), 568–576.
- Maclachlan, T. & El-Deiry, W., 2002. *Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase 6*. Proc Natl Acad Sci USA, 99(14), 9492-9497.

- Madden, S. & Cotter, T., 2008. *Cell death in brain development and degeneration: control of caspase expression may be key!*. Mol Neurobiol, 37(1), 1-6.
- Malumbres, M. & Barbacid, M., 2001. *To cycle or no to cycle : a critical decision in cancer*. Nature, 1, 222-231.
- Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J., 2009. *The inflammasomes: guardians of the body*. Annu Rev Immunol, 27, 229-265.
- Mcilwain, D., Berger, T. & Mak, T., 2013. *Caspase Functions in Cell Death and Disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 5(4), 1-28.
- Mooi, W. & Peeper, D., 2006. *Oncogene-induced cell senescence* . N Engl J Med, 10, 1037-1046.
- Motlagh, H., Wrabl, J., Jing, L. & Hilser, V., 2014. *The ensemble nature of allostery*. Nature, 508(7496), 331–339.
- Nguyen, Q. et al., 2009. *Positron emission tomography imaging of drug-induced tumor apoptosis with a [18F]-labeled isatin sulfonamide*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(38), 16375–16380.
- Okada, H. A. M. T., 2004. *Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour*. Nat Rev Cancer, 4, 592-603.
- Otin, L. & Overall, C., 2002. *Protease degradomics: A new challenge for proteomics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 3(7), 509–519.
- Patel, T., 2000. *Apoptosis in hepatic pathophysiology*. Clin Liver Dis, 4(2), 295-317.
- Philchenkov, A., Zavelevich, M., Krocak, T. & Los, M., 2004. *Caspases and cancer: Mechanisms of inactivation and new treatment modalities*. Exp Oncol, 26(2), 82–97.
- Pop, C. & Salvesen, G., 2009. *Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation*. Journal of Biological Chemistry, 284(33), 21777-21781.
- Pope, R. & Tschopp, J., 2007. *The role of interleukin-1 and the inflammasome in gout*. Arthritis Rheum, 56(10), 3183-3188.

Poreba, M., Strózyk, A., Salvesen, G. & Drag, G., 2013. *Caspase Substrates and Inhibitors*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 5(8), 1-20.

Sharma, S., Basu, A. & Agrawal, R., 2013. *Pharmacophore Modeling and Docking Studies on Some Nonpeptide-Based Caspase-3 Inhibitors*. BioMed Research International, 2013, 1-15.

Sherer, T. et al., 2002. *An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alphasynuclein metabolism and oxidative damage*. J Neurosci, 22(16), 7006–7015.

Shi, Y., 2001. *A structural view of mitochondria-mediated apoptosis*. Nat. Struct. Biol., 8(5), 394–401.

Singha, S. & Dikshit, M., 2007. *Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: Involvement of nitric oxide*. Brain Research, 54(2), 238-244.

Slee, E. et al., 1999. *Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner*. Journal of Cell Biology, 144(2), 281–292.

Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V., 2000. *Apoptosis signaling*. Annu. Rev. Biochem, 69, 217-245.

Thomberry, N. et al., 1997. *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis*. J Biol Chem, 272(29), 17907-17911.

Tsai, C., Del Sol, A. & Nussinov, R., 2008. *Allostery: Absence of a Change in Shape Does Not Imply that Allostery Is Not at Play*. Journal Mol Biol, 378(1), 1–10.

Weksler, M., 2004. *The immunotherapy of Alzheimer's disease*. Immun Ageing, 1(2), 1-7.

Wood, M., Trulzsch, B., Abdelgany, A. & Beeson, D., 2003. *Therapeutic gene silencing in the nervous system*. Hum Mol Genet, 12(2), 279–284.