

André Daniel Pereira de Magalhães Mota

Porque é que as Bactérias se Suicidam



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2016

André Daniel Pereira de Magalhães Mota

Porque é que as Bactérias se Suicidam



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2016

Porque é que as Bactérias se Suicidam

André Daniel Pereira de Magalhães Mota

Projeto de Pós Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dra. Anabela Teixeira Prata Castro

Porque é que as Bactérias se Suicidam

Resumo

Manter a homeostasia celular não é um processo fácil, contudo, existe um programa genético que se ocupa desta tarefa, a designada morte celular programada (PCD do inglês *Programmed Cell Death*).

A PCD é associada frequentemente á apoptose, no entanto, outras vias foram já descritas tais como a necroptose, a entose, a autofagia e a piroptose (Cabon *et al.*, 2013).

Os seres multicelulares não são os únicos a realizar este processo, a PCD tem importantes funções nas bactérias, nomeadamente, facilitar a troca de material genético, eliminar as mutações de uma população, reduzir o consumo de nutrientes quando existem poucos recursos e reduzir o risco de infeção viral. É cada vez mais evidente que as bactérias vivem em comunidades complexas e que de certa forma se assemelham a um organismo multicelular (Koksharova, 2013).

As bactérias respondem a estímulos na população e são capazes de alterar o padrão da expressão dos seus genes, por um fenómeno chamado de *quorum sensing* (QS), que traduz-se na libertação e deteção de pequenas moléculas que permitem a comunicação entre os microrganismos inferindo alterações a nível genético, a nível das infeções e a nível da morte celular programada (Popat *et al.*, 2015). Atendendo a estes fundamentos, entender esta comunicação entre bactérias e a sua relação com o hospedeiro, a nível celular e molecular é essencial para identificar novos alvos e desenvolver novas estratégias para o combate às infeções bacterianas no futuro (Holm e Vikström, 2014).

O objetivo do presente trabalho consiste na revisão bibliográfica acerca dos estudos realizados sobre o motivo pelo qual ocorre o suicídio bacteriano. Para atingir esta meta realizar-se-á uma pesquisa bibliográfica em motores de busca e bases de dados da especialidade.

Palavras-chaves: PCD, apoptose, PCD bacteriano, *quorum-sensing*, interação bactéria-hospedeiro.

Abstract

Maintain cellular homeostasis is not an easy process, however, there is a genetic program that takes care of this task, the designated programmed cell death (PCD English Programmed Cell Death).

The PCD is often associated with apoptosis, however, other methods have been described such as necroptosis, entosis, autophagy and pyroptosis (Cabon *et al.*, 2013).

The multicellular beings are not the only ones to carry out this process, the PCD have important functions in bacteria, in particular, facilitate the exchange of genetic material, eliminate the changes in a population, reduce the consumption of nutrients when there are few resources and reduce the risk of viral infection. It is increasingly evident that the bacteria live in complex communities and somewhat resembles a multicellular organism (Koksharova, 2013).

The bacteria respond to stimuli in the population and are able to change the pattern of expression of the genes, by a phenomenon called quorum sensing (QS), which translates into the release and detection of small molecules that allow communication between inferring microorganisms changes at the genetic level, at the level of infection and cell death (Popat *et al.*, 2015). Given these fundamentals, understand the communication between bacteria and their relationship with the host cell and molecular level is essential to identify new targets and develop new strategies to combat bacterial infections in the future (Holm and Vikström, 2014).

The aim of this work is the literature review about the studies on why occurs bacterial suicide. To achieve this goal will be performed a literature search on search engines and specialty databases.

Agradecimentos

Não cabe nestas breves linhas o que me vai na alma, no entanto aqui quero deixar um ténue esboço de agradecimento.

À Professora Doutora Anabela Castro uma palavra de grande estima e consideração pelo seu trabalho e pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, tão indispensáveis para a concretização deste trabalho.

Aos meus colegas da faculdade pela colaboração amigável e indispensável e a todos os bons momentos que me possibilitaram ao longo do meu percurso académico.

A toda a minha família que, como é hábito me entusiasmar, aturaram e apoiaram. Sem esta paciência, penso que nunca este trabalho teria atingido o seu final.

A todos o meu sincero obrigado.

Índice Geral

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Índice de figuras	v
Índice de tabelas	vi
Abreviaturas	vii
Introdução	1
Capítulo I	4
1.1. Morte Celular	4
1.2. Apoptose	5
1.2.1. As caspases	6
1.2.2. Vias de sinalização da apoptose	7
1.3. Morte Celular Programada (PCD)	9
Capítulo II	12
2.1. Morte Celular Programada em bactérias	12
2.2. Bactérias análogas a organismos multicelulares	13
i. Esporulação	15
ii. Troca de informação genética	16
iii. A formação de biofilmes	16
2.2.1. PCD em populações bacterianas	16
i. Autólise durante a esporulação	18
ii. Comportamento fraticida durante o intercâmbio genético	19
iii. A morte programada na propagação de mutações	19
iv. O contributo de PCD no desenvolvimento de biofilmes	19
2.3. <i>Quorum sensing</i>	20
2.4. O comportamento social	22
i. O conceito de altruísmo	24
ii. PCD em resposta ao <i>stress</i>	25
2.5. Sistemas TA	25
2.6. O conceito de Fenoptose	28
Conclusões	30
Bibliografia	32

Índice de figuras

Figura 1. Esquema representativo da ativação das caspases envolvidas na apoptose.	6
Figura 2. Modelo representativo das vias intrínseca e extrínseca da apoptose.	8
Figura 3. Divergências entre os processos eucariótico e bacteriano ao dano celular e ativação de PCD.	12
Figura 4. Imagens de culturas monoespécie bacterianas. É possível observar o elevado nível de organização celular e espacial.	14
Figura 5. Exemplos de morte celular programada bacteriana.	17
Figura 6. Representação do mecanismo de comunicação em bactérias. A detecção destes auto-indutores representados a vermelho, apenas é possível quando as bactérias atingem um número populacional adequado, um <i>quórum</i> .	21
Figura 7. Esquema representativo da cooperação. Benefícios reprodutivos diretos explicam a cooperação mutuamente benéfica, ao passo que os benefícios reprodutivos indiretos explicam a cooperação altruísta. Dentro destas categorias fundamentais, os diferentes mecanismos podem ser classificados de diversas formas	23
Figura 8. Sistemas TA bacterianos. Em todos os sistemas TA, em resposta a vários estímulos a antitoxina é degradada, permitindo que a toxina tenha ação sobre o seu alvo resultando na paragem do crescimento ou na morte celular.	26

Índice de tabelas

Tabela 1. Exemplos de diversos tipos de PCD para eucariotas multicelulares.	11
--	----

Abreviaturas

APAF-1 – do inglês *Apoptotic protease-activating factor 1*

ATP – Adenosina trifosfato

Bak – do inglês *Antagonist killer 1*

Bax – do inglês *Associated X protein*

Bcl-2 – do inglês *B-cell leukemia/Lymphoma 2* – Família das proteínas linfoma de células B2

BCL-X_L – do inglês *BCL -2-related gene, long isoform* – Gene relacionado ao BCL -2, isoforma longa

Bid – do inglês *BH3 interacting domain death agonist*

Caspases – do inglês *Cysteine-aspartic acid proteases* – Cisteína protease de ácido aspártico

c-FLIP – do inglês *Cellular FLICE-like inhibitory protein*

DISC – do inglês *Death-inducing signaling complex*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDF - Factor de morte extracelular

EPS – Substâncias poliméricas extracelulares

MazE – Toxina do módulo toxina-antitoxina induzido pelo *stress*, mazEF

mazF – Antitoxina do módulo toxina-antitoxina induzido pelo *stress*, mazEF

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NCCD – do inglês *Nomenclature Comittee on Cell Death*

PCD – do inglês *Programmed cell death*

PezA – Toxina do sistema toxina-antitoxina induzido pelo *stress*, PezA/PezT

PezT – Antitoxina do sistema toxina-antitoxina induzido pelo *stress*, PezA/PezT

PG – Peptidoglicano

QS - *Quorum sensing*

RNA - Ácido ribonucleico

TA - Toxina-antitóxina

ToxI – Antitoxina do sistema toxina-antitoxina induzido pelo *stress*, ToxIN

ToxIN – Sistema toxina-antitoxina induzido pelo *stress*

ToxN – Toxina do sistema toxina-antitoxina induzido pelo *stress*, ToxIN

Introdução

“There can be no doubt that a tribe including many members who... are always ready to aid one other, and sacrifice themselves for the common good would be victorious over most other tribes; and this would be natural selection”.

Darwin

O suicídio celular é segundo a sua definição um ato voluntário e premeditado. As células recebem determinados estímulos, há uma decisão de atuar, uma “decisão celular” e através de um mecanismo, a morte da célula sucede. Este mecanismo é a morte celular programada (PCD do inglês *programmed cell death*).

Em eucariotas, a morte é essencial para a vida. De facto, a PCD é fundamental para diversos processos biológicos, incluindo: a embriogénese, a homeostasia tecidual, a resposta imunológica, a ação hormonal, a ação de agentes patogénicos, o envelhecimento e o *stress* oxidativo. A razão pela qual um organismo unicelular ativa o programa que conduz à sua morte é, aparentemente contraintuitivo e possivelmente por esse motivo, a morte celular em procariotas recebeu muito menos atenção nos últimos anos (Allocati *et al.*, 2015).

A morte celular programada apresenta uma diversidade de diferentes programas a que os seres multicelulares e unicelulares podem recorrer no crepúsculo da sua existência, contudo, fazem-no por diferentes motivos (Cabon *et al.*, 2013).

As bactérias são organismos altamente qualificados para o combate biológico, elas habitam o planeta há milhões de anos demonstrando uma capacidade de sobrevivência e adaptação aos diversos habitats com constantes variações, sem paralelo. As bactérias não são conhecidas por viver individualmente na natureza ou no laboratório, elas são seres sociais que formam colónias microbianas, biofilmes e agregados, ou seja, elas

existem na forma de populações de células o que as torna análogas a organismos multicelulares (Koksharova, 2013; Sedwick, 2011). Talvez o benefício mais importante desta associação seja a divisão do trabalho, que uma vez associado à adesão célula-a-célula e a uma comunicação intercelular coordenada permite que toda a população possa funcionar de forma mais eficiente, desenvolvendo comportamentos de grupo complexos (Dorado *et al.*, 2016). Esta forma de sinalização intercelular conhecida como *quorum sensing*, otimiza as atividades metabólicas e comportamentais de uma comunidade de bactérias para a vida conjunta (Sifri, 2008).

A organização multicelular oferece deste modo, muitas vantagens, sob este tipo de organização, a regulação da morte é necessária para promover a sua adaptação, estando intrinsecamente ligada com a execução de importantes processos como: a resposta ao *stress*, o desenvolvimento, transformação genética e formação de biofilme (Allocati *et al.*, 2015; Koksharova, 2013).

Na verdade uma comunidade bacteriana pode induzir a morte de uma parte da população em resposta a diversas condições de *stress* para favorecer a sobrevivência da colónia, na maioria destes casos, a PCD é induzida através de mecanismos toxina-antitoxina (TA) (Allocati *et al.*, 2015).

Considera-se de facto que o sacrifício de uma bactéria em prol da comunidade como um ato altruísta, este evento, em particular, fomentou a realização deste trabalho: o suicídio bacteriano.

A questão acima mencionada entronca com outras, das quais se salientam:

- i. compreender o motivo que leva as bactérias a se destruírem
- ii. desvendar se existem benefícios associados a este processo
- iii. identificar o(s) mecanismo(s) responsáveis
- iv. que utilidade terá este conhecimento para a terapia antibacteriana.

Assim, na introdução foca-se essencialmente o objeto deste estudo no qual se pretende descobrir o motivo do suicídio bacteriano. No desenvolvimento deste trabalho será feita uma visão condutora, para responder às questões acima formuladas.

No primeiro capítulo focaremos alguns aspetos cruciais sobre o que é a morte celular programada (PCD), falar do seu principal mecanismo, a apoptose, e referenciar outras formas de PCD.

No segundo capítulo será abordado o tema da PCD bacteriana, serão abordados os motivos e as condições que poderão induzir a este processo. Nesse âmbito iremos falar da multicelularidade bacteriana, do *quorum sensing* e do comportamento social bacteriano.

É também necessário demonstrar como todo o processo é feito, e nesse sentido serão abordados os sistemas toxina-antitoxina, uma vez que representa o tema fulcral deste trabalho, será enfatizada a sua importância no âmbito deste trabalho e a sua significância na área de investigação.

Para concluir o segundo capítulo será apresentado o conceito de fenoptose.

Capítulo I

1.1. Morte Celular

Morrer, é um processo natural e partilhado por todos os organismos vivos, para morrer uma célula terá que atingir um ponto de não retorno, algo que sucede quando perde a sua integridade membranar, é fagocitada por células adjacentes ou é sujeita a uma extensa fragmentação interna, tornando-se incapaz de executar as suas funções.

A morte celular pode ser classificada de acordo com o seu aspeto morfológico, critérios enzimáticos, aspetos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou por características imunológicas (Kroemer *et al.*, 2009; Galluzzi *et al.*, 2012).

A problemática da morte celular, é frequentemente definida por critérios morfológicos, sem o cuidado de incluir os mecanismos bioquímicos precisos. O uso errado de diferentes conceitos ou esta falta de clareza na atribuição dos mesmos lançou a confusão na comunidade científica tornando-se deste modo fundamental uma extensiva revisão nesta área de estudo. Esta tarefa ficou ao cuidado de um comité formado por um grupo de especialistas, designado Comité de Nomenclatura em Morte Celular (NCCD do inglês *Nomenclature Committee on Cell Death*) que desde 2005 têm feito importantes recomendações no intuito de facilitar a comunicação entre cientistas e impulsionar o compasso das descobertas (Hacker, 2013).

Os motivos que podem levar uma célula ao “ponto-sem-retorno” variam, desde o mais comum processo degenerativo, intrínseco a todos os seres vivos, processos oportunistas como as infeções, processos associados a lesão como traumatismos e toxinas, ou até patológicos como o cancro. Contudo, as células não morrem todas de forma acidental, elas podem responder a todos estes eventos, ativando um programa celular, geneticamente controlado, intitulado de morte celular programada (Chaitanya *et al.*, 2015).

Desde meados do século IX, que a morte celular foi observada como parte de um processo fisiológico de organismos multicelulares, tais como, plantas e animais. Com a descoberta do microscópio, foi possível observar as células que morrem, e o termo necrose é então utilizado até 1971 para todos os tipos de morte celular. Quando Kerr, Wyllie e Currie observaram uma morte não patológica em certos tecidos, chamaram-lhe

de “necrose controlada” antes de optar pelo nome apoptose em 1972. O termo apoptose é de origem grega onde o prefixo *apo* e o sufixo *ptosis* referem-se à queda das folhas das árvores no Outono (Kerr *et al.*, 1971).

1.2. Apoptose

A apoptose é um processo complexo, altamente coordenado, que envolve variadas moléculas sinalizadoras e outros componentes, que resultam na eliminação da célula alvo. Foi outrora descrito por Kerr *et al.* (Sarvothaman *et al.*, 2015) como um padrão distinto de eliminação celular, caracterizado por alterações morfológicas específicas. As alterações a que se refere, são inicialmente caracterizadas pela retração da célula, perda de aderência com a matriz celular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação contínua, que resulta na formação de corpos apoptóticos, num processo designado por vesiculação (*blebbing*). Os corpos apoptóticos impedem a libertação de componentes imunogénicos (como ácidos nucleicos, metabolitos oxidativos e enzimas lisossomais) das células que entraram em apoptose, prevenindo deste modo um processo inflamatório e consequente resposta autoimune. Os corpos apoptóticos são depois fagocitados por macrófagos ou outras células vizinhas, em resposta a marcadores de superfície celulares da apoptose, como a fosfatidilserina (Bayles, 2014; Sarvothaman *et al.*, 2015).

As moléculas envolvidas no controlo das vias de ativação da apoptose incluem proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas para além das caspases, em suma, todo este processo permite aos seres eucariotas multicelulares eliminarem as células desnecessárias, danificadas, células que completaram o seu ciclo biológico e células potencialmente perigosas que resultaram de mutações, contribuindo assim para a preservação da homeostasia dos sistemas biológicos (Koksharova, 2013).

Contudo, no que respeita ao NCCD e à comunidade científica atual, o conceito de apoptose está definido e aceite como uma forma de morte celular programada, ativada por uma via de sinalização apoptótica, especificamente a ativação de caspases através da via intrínseca ou extrínseca (Hacker, 2013).

1.2.1. As caspases

Como já foi referido anteriormente, a apoptose é um programa de morte celular que envolve o desmantelamento de componentes intracelulares, sem provocar inflamação ou dano às células vizinhas. O seu mecanismo molecular inclui uma ativação sequencial de uma série de proteases de cisteína, as caspases (Figura 1). As caspases estão presentes no citoplasma da maioria das células, geralmente na sua forma inativa, a pró-caspase (Tower, 2015).

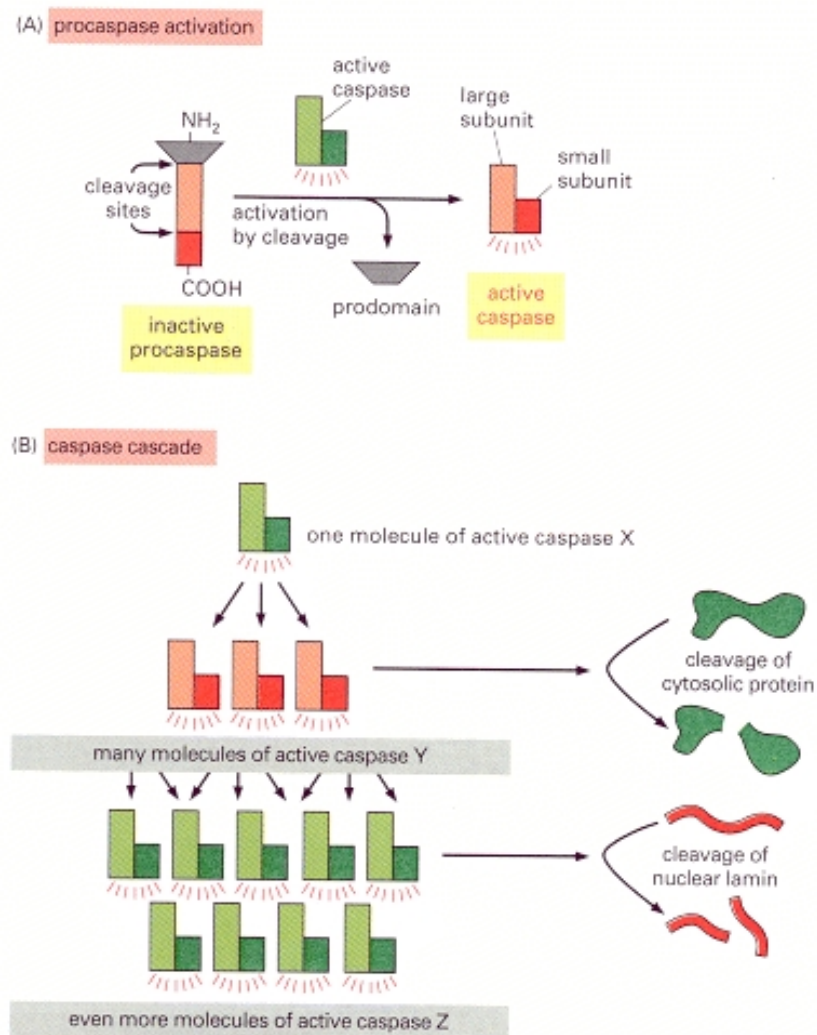


Figura 1. Esquema representativo da ativação das caspases envolvidas na apoptose (Alberts, 2002).

- (A) Ativação de uma caspase por clivagem proteolítica e dimerização
- (B) Cascata auto-amplificadora de caspases

As caspases são inicialmente produzidas como pró-caspases monoméricas inativas que sofrem dimerização e frequentemente clivagem para a sua ativação (Figura 1-A). A montagem em dímeros é facilitada por várias proteínas adaptadoras que se ligam a regiões específicas no prodomínio da pró-caspase. O mecanismo exato de montagem depende do adaptador específico envolvido. Caspases diferentes têm proteínas diferentes, domínios proteicos de interação nos seus pró-domínios, permitindo-lhes complexar-se com adaptadores diferentes (Mcllwain *et al.*, 2013).

As caspases podem ser classificadas de acordo com o seu pró-domínio e o seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras ou executoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, e são responsáveis pela clivagem de substratos (Grivicich, 2007).

Em suma, as caspases iniciadoras ativam as caspases executoras que, subsequentemente coordenam as suas atividades para clivar proteínas estruturais principais e ativar outras enzimas. Uma vez ativada, uma única caspase executora pode clivar e ativar outras caspases executoras, levando a um circuito de *feedback* acelerado de ativação de caspases ou por vezes chamado de cascata auto-amplificadora (Figura 1-B) (Mcllwain *et al.*, 2013).

1.2.2. Vias de sinalização da apoptose

A apoptose é um processo inerente à célula e geneticamente programado que é desencadeado por estímulos intrínsecos ou extrínsecos, e dessa integração pode resultar a ativação do processo de execução apoptótico.

As células contêm um conjunto de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl-2, preparadas para entrar na via apoptótica quando o seu equilíbrio é alterado. As proteínas pró-apoptóticas da família bcl-2 incluem várias proteínas pró-apoptóticas da classe “BH3-only” (Bid, Bim e Puma) que promovem a permeabilização da mitocôndria e ativação de outros membros, Bad e Bax, responsáveis pela formação de poros na membrana mitocondrial. As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x e Bcl-xl) ligam-se às proteínas pró-apoptóticas inibindo a formação de poros, de acordo com a Figura 2 (Tower, 2015).

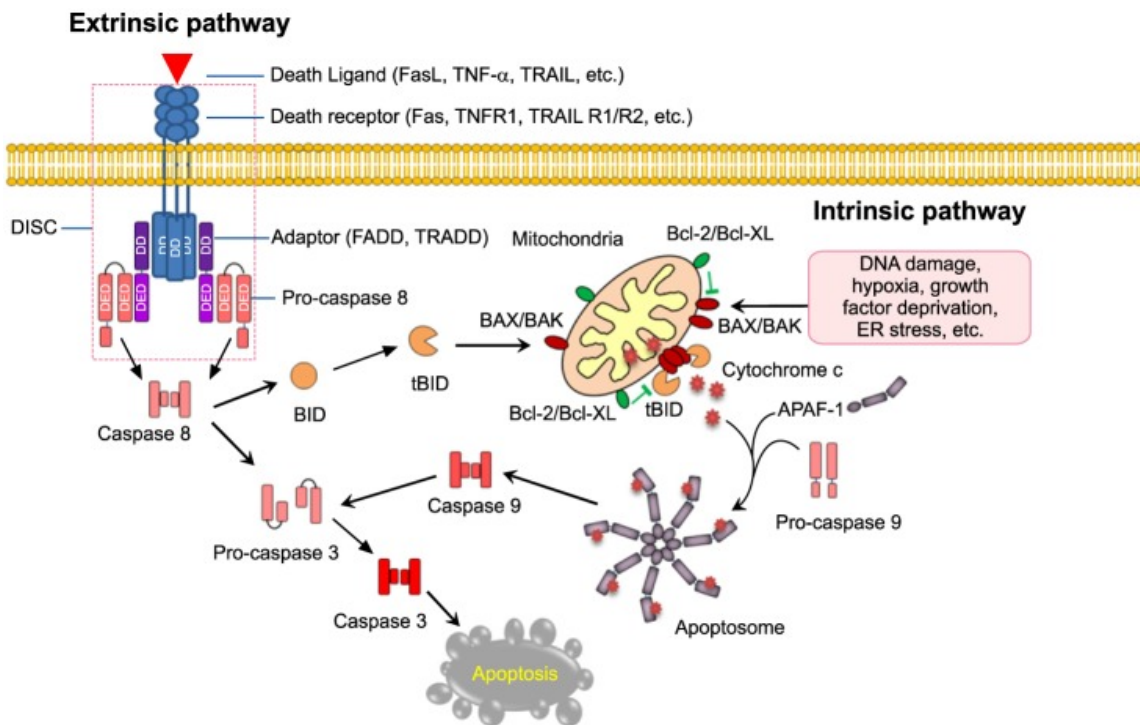


Figura 2. Modelo representativo das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Sarvothaman *et al.*, 2015).

Na via intrínseca, a cascata sinalizadora é ativada por um vasto número de fatores promovidos pelo *stress* celular, incluindo os danos no ácido desoxirribonucleico (ADN), ativação de oncogenes, hipoxia, diminuição da concentração de fatores de crescimento, *stress* oxidativo e radiação. O sinal de morte é detetado inicialmente pelas proteínas “BH3-only”, as quais, em seguida, interagem com os mediadores da apoptose *downstream* (Bak e Bax). O Bak e Bax vão sofrer distintas alterações conformacionais, conduzindo à permeabilização da membrana externa mitocondrial e à libertação subsequente de compostos apoptogénicos, tais como, o citocromo *c*. O citocromo *c* libertado liga-se ao fator de ativação da apoptose 1 (APAF-1) para facilitar a formação do apoptossoma (um complexo heptamérico em forma de roda) (Figura 2), que pode em seguida, recrutar e ativar a pró-caspase-9. Como consequência, a caspase-9 ativa as caspases executoras (caspase-3, -6, -7), levando eventualmente à apoptose (Tower, 2015).

A via extrínseca é iniciada pela ligação de recetores de morte (*death receptors*) com

respetivos ligandos (*death ligands*), esta ligação inicia uma via de sinalização em cascata que resulta na morte da célula. As moléculas adaptadoras possuem um domínio de morte (*death domain*) e um domínio efetor (*death effector domain*). O domínio de morte medeia a associação com o recetor de morte; esta associação conduz ao recrutamento do iniciador das caspases (caspase-8/caspase-10) para o complexo recetor do ligando. A molécula do adaptador em seguida medeia a interação entre o recetor de morte e o iniciador da caspase. Este complexo de sinalização, composto pelo recetor de morte, a molécula do adaptador, e a pró-caspase, é designado por complexo de sinalização indutor de morte (DISC do inglês *death inducing signaling complex*). No complexo DISC, a acumulação de pró-caspase-8 leva à sua ativação autocatalítica em caspase-8, que, em seguida, transmite o sinal de morte para as caspases efetoras resultando na morte celular programada da célula (Sarvothaman *et al.*, 2015).

Ambas as vias (extrínseca e intrínseca) em regra desencadeiam a ativação de uma cascata de enzimas proteolíticas, as caspases, nomeadamente as responsáveis pela morfologia celular característica da apoptose. Esta cascata conduz à degradação por clivagem de cerca de um milhar de substratos diferentes, que vão desde a atividade da proteína cinase de enzimas de reparação do DNA, passando por proteínas de replicação ou de tradução, sem esquecer as proteínas estruturais. O aspeto morfológico da célula é assim alterado: o volume celular é reduzido, ocorre a vesiculação da membrana plasmática, a cromatina condensa-se, o ADN é fragmentado e formam-se os corpos apoptóticos. Estes são então identificados e eliminados *in vivo* pelos fagócitos, em parte, graças á externalização dos resíduos de fosfatidilserina da camada lipídica interna para a camada lipídica externa da membrana plasmática (Capon *et al.*, 2013).

Existem dois pontos de convergência entre as duas vias, como a proteína Bid (Figura 2), membro da família Bcl-2, que ativa a via mitocondrial após clivagem pela caspase-8. Este mecanismo pode ser um meio para amplificar o sinal apoptótico (Capon *et al.*, 2013).

1.3. Morte Celular Programada (PCD)

A morte celular programada é um importante mecanismo no desenvolvimento de todos os organismos. Nos organismos superiores, esta é necessária para a formação de

estruturas como os dedos, órgãos e o tubo neural, mas contribui também na destruição de estruturas como a cauda de um girino ou de tecido mamário em machos, é útil na manutenção do número de células no organismo, eliminando bilhões de células a cada hora da medula óssea e intestino, e é também responsável por eliminar células anormais (cancerígenas, infetadas, com danos no ADN) (Alberts *et al.*, 2002).

O conceito de morte celular programada é utilizado atualmente para descrever um programa que induz a morte celular como consequência de uma via sinalizadora, ativa na célula. Podemos afirmar que a morte celular programada ou PCD representa um termo genérico para todos os tipos de mortes observadas nos organismos e células (Hacker, 2013; Chaitanya *et al.*, 2015).

O termo apoptose é hoje em dia a primeira palavra que vem à mente de um cientista quando se fala de morte celular programada, no entanto, e apesar da apoptose dita clássica ser possivelmente a forma mais frequente de morte celular programada, outros tipos não apoptóticos de morte celular (Tabela 1), e numerosas vias ditas alternativas ou atípicas são agora conhecidas e poderão também ter importância biológica (Chaitanya *et al.*, 2015).

Estas vias de sinalização podem mesmo ser preferidas à apoptose, elas são provavelmente o resultado da redundância do presente sistema de destruição celular que é necessário para a reparação e manutenção da homeostasia tecidual, bem como a eliminação de agentes patogénicos e a destruição de células com potencial tumoral (Cabon *et al.*, 2013). Na verdade, as células podem ter diferentes respostas celulares a um mesmo estímulo de morte celular, há até evidências da existência de uma rede bioquímica partilhada entre a necrose e a apoptose, o que poderá permitir a conversão de um processo apoptótico em curso por um processo necrótico se fatores como a disponibilidade das caspases ou da adenosina trifosfato (ATP) intracelular, diminuírem ou deixarem de existir (Elmore, 2007). Se uma célula morre por um processo ou outro, depende em parte da natureza do sinal de morte celular, do tipo de tecido, do estado de desenvolvimento do tecido, do meio fisiológico e da decisão celular tomada. Em suma a PCD poderá ser vista deste modo como um conjunto de uma variada gama de programas, vias ou decisões de suicídio que as células podem utilizar para manutenção de homeostasia numa busca contínua pelo aumento da complexidade biológica.

Tabela 1. Exemplos de diversos tipos de PCD para eucariotas multicelulares (Kroemer *et al.*, 2009).

Tipo de morte celular	Características Morfológicas	Notas
Apoptose	Arredondamento da célula. Retração de pseudópodes. Redução do volume celular e nuclear (<i>pyknosis</i>). Fragmentação nuclear (<i>Karyorrhexis</i>). Pouca ou nenhuma modificação dos organelos citoplasmáticos. Vesiculação da membrana plasmática (blebbing). Fagocitose macrocítica, <i>in vivo</i> .	"Apoptosis" é o termo original introduzido por <i>Kerr et al.</i> para definir um tipo de morte celular com características morfológicas específicas. A apoptose não é um sinónimo de morte celular programada ou de ativação das caspases.
Autofagia	Sem condensação da cromatina. Vacuolização massiva do citoplasma. Acumulação de vacúolos autofágicos (de dupla membrana). Reduzida ou nenhuma captação pelas células fagocíticas, <i>in vivo</i> .	"Morte celular autofágica" define que a morte celular ocorre com autofagia, embora possa erradamente sugerir uma forma de morte que ocorre por autofagia, uma vez que este processo frequentemente promove a sobrevivência celular
Cornificação	Eliminação dos organelos citosólicos. Alteração da membrana plasmática. Acumulação de lípidos nos grânulos F e L. Extrusão de lípidos no espaço extracelular. Descamação (perda de corneócitos) pela ativação da protease.	Formação do "Envelope cornificado" ou "queratinização" é um processo específico da pele para criar uma barreira funcional. Embora a apoptose possa ser induzida por lesão da camada epidérmica basal (e.g. Radiação UV), a cornificação é exclusiva das camadas superiores (camada granular e do estrato córneo).
Necrose	Dilatação citoplasmática (oncosis). Rutura da membrana plasmática. Dilatação dos organelos citoplasmáticos. Condensação da cromatina moderada.	"Necrose" identifica, de forma negativa, a morte celular sem as características da apoptose ou autofagia. Note-se que a necrose pode ocorrer de uma forma regulada, envolvendo uma sequência precisa de sinais.

Capítulo II

2.1. Morte Celular Programada em bactérias

Seria fantástico se o princípio da apoptose pudesse ser aplicado a todos os membros individuais de uma população de seres unicelulares, de facto a cooperação e comportamento altruísta nestas comunidades são fascinantes e a ideia que a apoptose é uma peça vital nestes eventos é perigosamente atrativo, no entanto, não devemos correr o risco de tirar conclusões apressadas baseadas em provas insuficientes. Este entusiasmo corrente que transfere conceitos de apoptose multicelular para eucariontes unicelulares e bactérias incorre o risco de cimentar bases de conhecimento erradas, simplificando excessivamente a sua biologia.

Se recordarmos o que foi dito no capítulo anterior, saberemos que para que a apoptose ocorra é necessário entre outros eventos bioquímicos, que se dê a ativação das caspases. Por acréscimo, a apoptose em mamíferos, e provavelmente em todos os organismos multicelulares, existe, devido a que o organismo auferir um benefício da morte das suas células individuais, e tais benefícios não são óbvios em organismos compostos por uma única célula. Quando somos confrontados com uma situação completamente diferente (como na “apoptose” bacteriana) onde nem o motivo nem a via foram ainda totalmente formulados, a sua definição torna-se problemática e por este facto, alguns eventos são vistos como fenómenos semelhantes a eventos da apoptose em mamíferos (Figura 3) (Hacker, 2013).

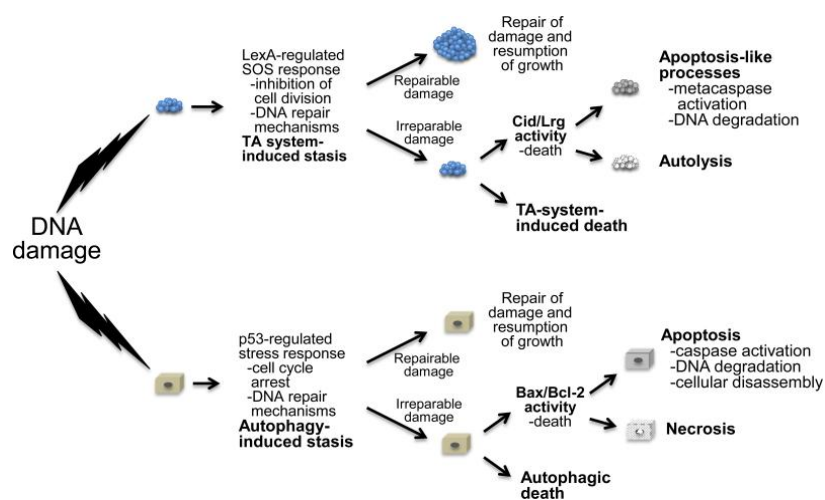


Figura 3. Divergências entre os processos eucariótico e bacteriano ao dano celular e ativação de PCD (Bayles, 2014).

2.2. Bactérias análogas a organismos multicelulares

As bactérias são organismos sociais, estas existem na natureza formando populações de células, vivem e morrem em comunidades complexas que em muitos aspetos se assemelham a um organismo multicelular. Uma cultura em suspensão é na sua essência uma construção laboratorial, dado que a maioria das bactérias sobrevivem e proliferam agregadas a superfícies. Quando examinamos culturas de superfície, observamos que as bactérias diferenciam-se morfológica e bioquimicamente, e interagem de forma a produzir populações espacialmente organizadas (Figura 4), (Shapiro, 1998; Koksharova, 2013).

De facto esta interação surge muito cedo, as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) maximizam o contacto célula-a-célula, alongando uma ao lado da outra, de tal forma que se inocularmos um meio, estas alinham-se durante as duas primeiras horas após inoculação. Após 24h já exibem uma organização espacial considerável. Deste modo não é de todo descabido considerar que populações como esta podem até ser vistas como formações holísticas, dividindo as funções bioquímicas entre os membros da comunidade microbiana (Shapiro, 1998; Koksharova, 2013).

Para considerarmos estes feitos, devemos recordar que as bactérias cultivadas em laboratórios são alimentadas com substratos simples que são rapidamente digeridos pelas células individuais, mas na natureza muitas bactérias degradam polímeros orgânicos complexos, o que exige a ação conjugada de várias células. Algumas bactérias como o *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e *Myxococcus xanthus* (*M. xanthus*) alteram a morfologia da colónia para sobreviver à privação de nutrientes e temperaturas desfavoráveis ou para aprisionar organismos, respetivamente, outras trabalham em conjunto para sintetizar proteínas complexas como a catalase ou formarem biofilmes (talvez as mais difundidas estruturas multicelulares procarióticas na natureza).

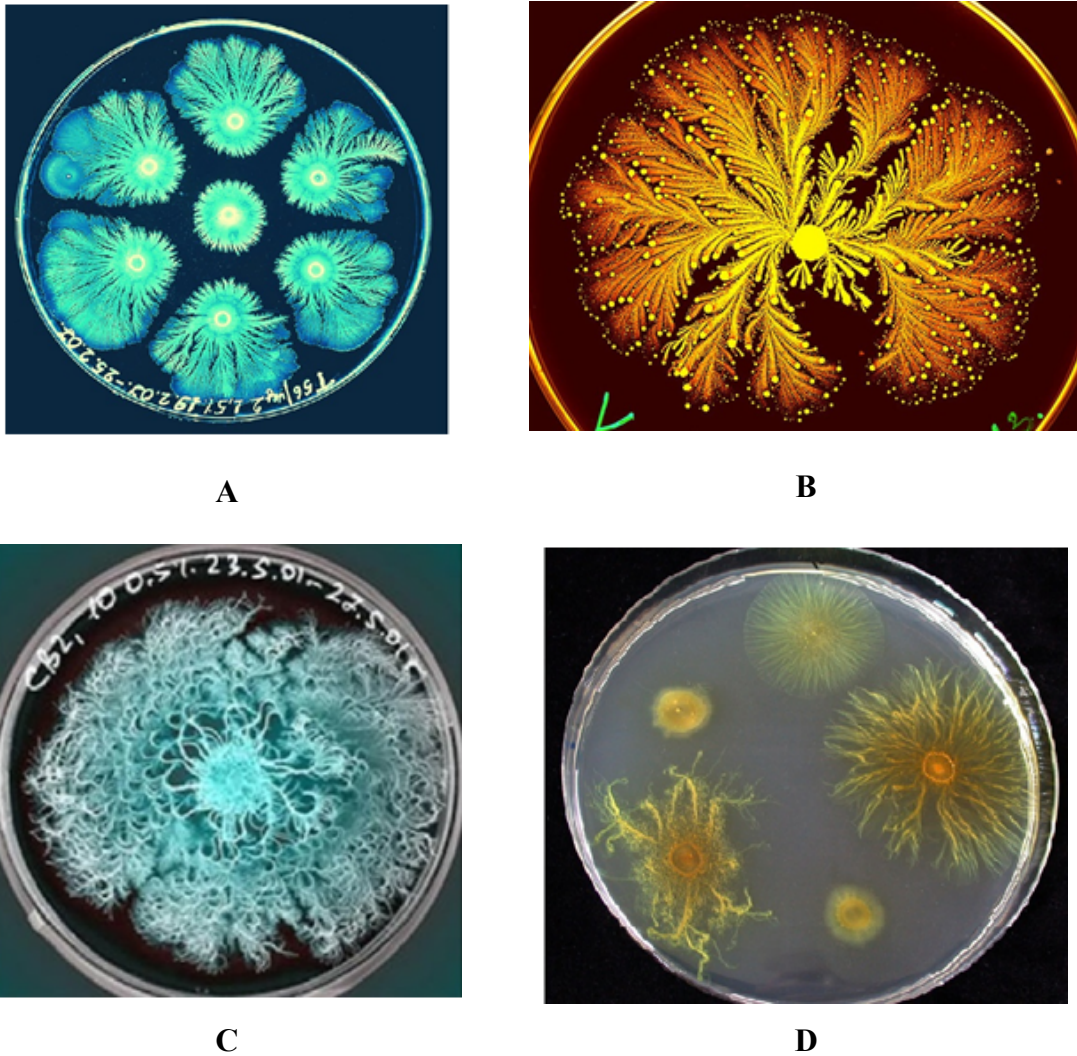


Figura 4. Imagens de culturas monoespécie bacterianas. É possível observar o elevado nível de organização celular e espacial (Adaptado de <http://ucsdnews.ucsd.edu/archive/newsrel/science/12-09BacteriaDecision.asp> (*Bacillus subtilis*), <http://www.smithsonianmag.com/science-nature/colonies-of-growing-bacteria-make-psychedelic-art-22351157/?no-ist> (*Paenibacillus vortex*), <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=6746> (*Paenibacillus dendritiformis*), <https://www.mpg.de/482874/pressRelease20030903> (*Myxococcus xanthus*)).

- (A) Colónias da bactéria *Paenibacillus dendritiformis* libertam toxinas quando outras colónias se aproximam criando um espaço desabitado entre elas,
- (B) *Paenibacillus vortex* exposta a uma substância quimioterápica,
- (C) Colónias de *Bacillus subtilis* exibem estruturas complexas por vezes formadas sobre condições de *stress*,
- (D) Duas estirpes de *Myxococcus xanthus* desenvolveram a capacidade de "swarming social" para perseguir e matar outros organismos em grandes grupos.

O conceito da multicelularidade bacteriana assenta em quatro princípios:

- I. As células bacterianas têm capacidades de comunicação e decisão que lhes permitem coordenar o crescimento, movimento e atividades bioquímicas.
- II. Os exemplos do comportamento da comunicação e coordenação são comuns (possivelmente ubíquos) entre bactérias e não estão limitados a alguns grupos com vocação multicelular.
- III. As populações bacterianas obtêm benefícios adaptativos da cooperação multicelular e da sua capacidade de integrar diversas atividades de células diferentes. Estes benefícios incluem:
 - i. Proliferação mais eficiente resultante da divisão celular do trabalho;
 - ii. Acesso a recursos e nichos que não podem ser utilizados por células isoladas;
 - iii. Defesa coletiva contra antagonistas que eliminam células isoladas;
 - iv. Otimização da sobrevivência da população por diferenciação em tipos de células distintos (Shapiro, 1998).

As células geneticamente idênticas são capazes de se diferenciar em vários fenótipos com atributos únicos. Esta estratégia de sobrevivência permite que uma população possa continuamente atribuir células especializadas para lidar com possíveis alterações drásticas das condições do seu ecossistema (Ben-Jacob, 2014).

i. Esporulação

A mais óbvia diversificação é a formação de esporos ou outras formas latentes de resistência, quando as outras táticas de sobrevivência falham, a esporulação é o destino escolhido pela maioria das células (Ben-Jacob, 2014).

A esporulação está sujeita a uma sinalização intracelular e uma regulação multicelular, mais ainda, está frequentemente ligada a elaborados processos de morfogénese multicelular (Figura 5-d). Assim, a formação de esporos pode ser considerada uma função da totalidade da população interativa.

Casos observados incluem bactérias, tais como: *B. subtilis*, *M. xanthus* e *Streptomyces coelicolor*, *Fibrobacter succinogenes* e *Clostridia* spp. (Shapiro, 1998).

ii. Troca de informação genética

Além da esporulação, as populações de *B. subtilis* podem desenvolver subpopulações competentes na absorção de ADN com potencial para incorporar nova informação genética, fomentando assim o desenvolvimento de novas habilidades de proliferação e sobrevivência.

Na *B. subtilis*, as células competentes podem obter ADN de qualquer fonte. Um tipo diferente de competência ocorre em *Neisseria gonorrhoeae*, esta população utiliza a permuta de ADN com a finalidade de estimular a recombinação (conversão de genes). Estes eventos alteram a estrutura primária das proteínas de superfície das bactérias. Estas variações antigênicas na estrutura da proteína de superfície permitem que as populações de *Neisseria* consigam modular as propriedades de agregação e de virulência, iludindo a vigilância imunológica (Shapiro, 1998).

iii. A formação de biofilmes

Os biofilmes a nível estrutural e dinâmico são sistemas biológicos complexos. São estruturas sésseis multicelulares caracterizadas por células embebidas numa matriz produzida pelos próprios de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e intercalados com canais de água abertos. Estes existem em ambas comunidades, mono e multi-espécies e são universalmente conhecidos por protegem as bactérias de condições de *stress* assim como de outros microrganismos que habitam no mesmo ambiente. Os biofilmes estão associados com a resistência a uma ampla gama de agentes antimicrobianos, contribuindo para a resistência aos tratamentos por antibióticos (Allocati *et al.*, 2015).

2.2.1. PCD em populações bacterianas

Dentro destas formas de organização, a regulação da morte torna-se uma questão importante, contribuindo para todos estes processos fundamentais, sendo por conseguinte essencial para o desenvolvimento capaz de uma população bacteriana. Uma população bacteriana ao agir como um organismo multicelular irá utilizar programas de PCD, sacrificando uma parte da colónia para promover a sobrevivência das células restantes (Figura 5).

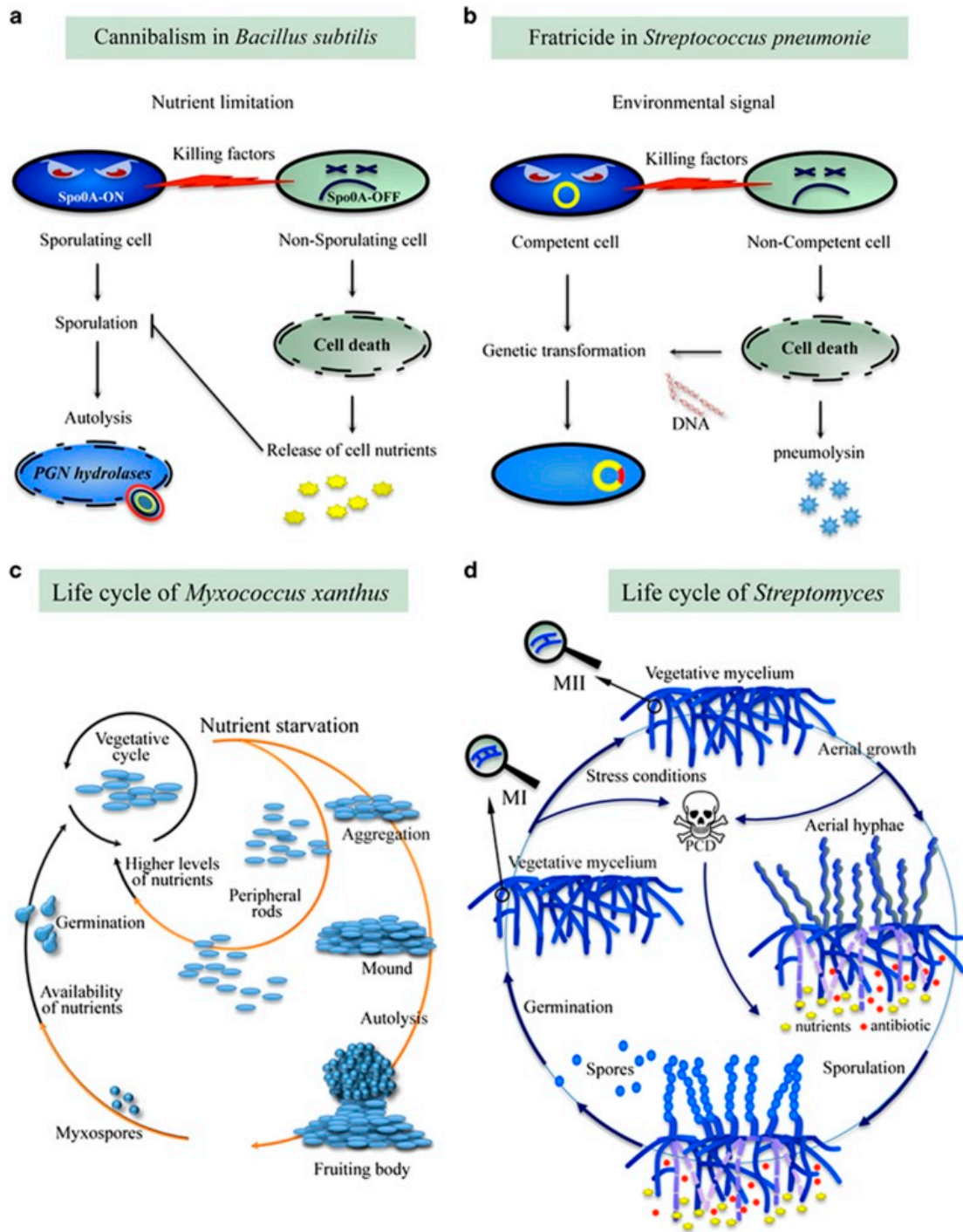


Figura 5. Exemplos de morte celular programada bacteriana (Allocati *et al.*, 2015).

- (a) Canibalismo na *B. subtilis* - A privação de nutrientes em *B. subtilis* pode induzir a esporulação ou a não esporulação. A morte de células não esporulantes resulta na libertação de nutrientes que suporta a esporulação. A célula mãe na população esporulante, também ativa mecanismos de PCD para libertar o esporo maduro.
- (b) Células competentes de *S. pneumoniae* induzem a morte de células não competentes, para poder incorporar o DNA destas células e recombiná-lo com o seu.

- (c) Sob a falta de nutrientes de *M. xanthus*, uma pequena percentagem de células permanece indiferenciada em forma de bacilos, a maioria das células é submetida à formação de corpos de frutificação. Durante este processo, um grande número de células são lisadas, de forma a libertar nutrientes para as células restantes que se diferenciam em mixoesporos. Quando os nutrientes estão disponíveis, uma nova colónia surge da proliferação dos bacilos periféricos e da germinação dos mixoesporos.
- (d) No ciclo de *Streptomyces* uma parte do micélio morre segundo um processo extremamente organizado de PCD que ocorre em duas fases: Sob condições de stress, uma parte das células MI (MI, primeiro micélio), é submetida a PCD enquanto que as restantes células viáveis diferenciam-se em células multinucleadas MII (MII, segundo micélio). Na segunda fase de PCD, uma parte das células MII morre, libertando nutrientes para alimentar o micélio aéreo, que se desenvolve a partir das restantes células viáveis MII e eleva-se acima da superfície. As células apicais da hifa aérea diferenciam-se em esporos que se podem agora, espalhar pelo ambiente.

i. Autólise durante a esporulação

Na esporulação de *B. subtilis*, a célula mãe é ativamente lisada antes da libertação do esporo.

A função óbvia da autólise da célula-mãe é eliminar uma barreira que poderia interferir com a expansão de um esporo a germinar.

Durante os primeiros eventos de esporulação, antes que o processo se torne irreversível, uma parte das células *B. subtilis* podem produzir fatores extracelulares para induzir um programa de morte e canibalizar células-irmã que libertam nutrientes, causando o atraso ou bloqueio completo da esporulação (Figura 5-a). Assim sendo, as bactérias não só obtêm benefícios nutricionais através do consumo dos seus parentes como também podem eliminar potenciais concorrentes e predadores se viverem em comunidades mistas. Na ausência de canibalismo, todas as bactérias vão esporular ao mesmo tempo, o que retardaria o regresso à vida vegetativa se as condições do meio se alterassem com aumento de nutrientes.

Em condições de *stress* nutricional, a maioria das bactérias *M. xanthus* agrega-se para formar uma massa chamada corpo de frutificação (Figura 5-c), no interior destas estruturas, até 90% das células submetem-se à lise celular, libertando o seu conteúdo que alimenta as restantes células. (Lewis, 2000; Allocati *et al.*, 2015).

ii. Comportamento fratricida durante o intercâmbio genético

Em alguns casos, as bactérias em resposta aos sinais ambientais, podem induzir um programa de morte em células vizinhas a fim de adquirir o seu material genético. Na verdade, na estirpe *S. pneumoniae*, as células competentes para transformação genética natural, produzem toxinas que irão matar bactérias irmãs não competentes e absorver o ADN e incorporá-lo no seu por recombinação. Em adição, a lise das células mortas provoca a libertação de pneumolisina (Figura 5-b), um fator de virulência chave que contribui para a patogénese da doença pneumocócica em seres humanos (Allocati *et al.*, 2015).

iii. A morte programada na propagação de mutações

Uma proposta para este comportamento reside no facto que algumas células que coexistem em populações sujeitas a elevado nível de *stress*, sofrem alterações extensas no seu ADN, não sobrevivendo, contudo, doam fragmentos dos seus genomas rearranjados a outras células, que passam a proliferar como mutantes adaptados em meios seletivos.

Em suma, uma célula hipermutável tem pouca probabilidade de sobreviver, mas uma população que contenha muitas bactérias hipermutáveis pode multiplicar as suas possibilidades para o sucesso, representando uma clara vantagem quando em dificuldades, sacrificado uma subpopulação para o estado hipermutável (Shapiro, 1998).

iv. O contributo de PCD no desenvolvimento de biofilmes

As comunidades de biofilme multicelulares fornecem um contexto ideal para a compreensão da PCD bacteriana. Por exemplo, os estudos de desenvolvimento de biofilme demonstraram a importância da morte celular e da lise na libertação de ADN, que fica incorporado na matriz do biofilme e que serve como uma molécula de adesão. Além disso, os biofilmes bacterianos como conjuntos interdependentes de células diferenciadas com estruturas e funções especializadas são semelhantes a organismos eucarióticos multicelulares complexos, em que a ativação da PCD tem um papel proeminente no desenvolvimento destes (Bayles, 2014).

Com estes novos conceitos, é possível adicionar maior rigor à interpretação do processo de PCD bacteriano abordado no início deste capítulo, sendo que, em todas as suas

funções exercidas sobre eucariontes multicelulares, a apoptose e outras formas de morte celular programada podem ser consideradas como fenómenos análogos, ou melhor, uma evolução da morte de um indivíduo unicelular num clone, onde a reprodução está reservada a células especializadas. Mais ainda, é possível associar a PCD com o sacrifício de um indivíduo numa espécie eusocial, onde a reprodução está reservada a uns poucos indivíduos (Libertini, 2012).

2.3. *Quorum Sensing*

A comunicação celular e sinalização são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de todos os organismos multicelulares. Os sofisticados sistemas de comunicação, denominados por *quorum sensing* (QS), são também utilizados por bactérias para coordenar várias atividades biológicas, incluindo a bioluminescência, a expressão de fatores de virulência, formação de biofilme, esporulação assim como processos reprodutivos (Bassler, 2002; LaSarre e Federle, 2013).

Torna-se então claro que os genes regulados por QS codificam não apenas fatores de virulência clássicos, como outras proteínas, incluindo as que estão envolvidas em processos metabólicos básicos. Com efeito, uma porção significativa do genoma bacteriano e proteoma pode ser influenciado pela sinalização de *quorum*, o que sugere que QS é um mecanismo usado por bactérias patogénicas não apenas para modular a produção de fatores de virulência, como para se adaptarem às necessidades metabólicas da vida em comunidades (Li e Tian, 2012; Sifri, 2008).

Esta forma de sinalização intercelular otimiza as atividades metabólicas e comportamentais de uma comunidade de bactérias para a vida conjunta. O QS pode ser caracterizado como um meio de comunicação entre bactérias, onde a sinalização competitiva ou cooperativa pode ocorrer entre grupos de bactérias ou entre bactérias e o hospedeiro (Sifri, 2008).

O *Quorum-sensing* é conseguido através da produção, libertação e subsequente deteção e resposta, a limiares de concentração de moléculas sinalizadoras designadas auto-indutores. A acumulação de uma concentração estimuladora de um auto-indutor extracelular só pode ocorrer quando um número suficiente de células, “um *quorum*”,

está presente (Figura 6) (Bassler, 2002).

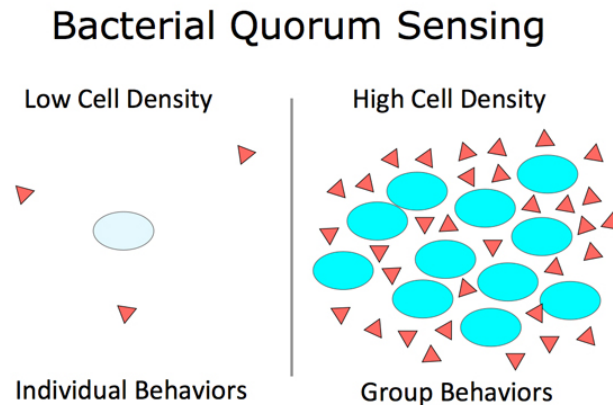


Figura 6. Representação do mecanismo de comunicação em bactérias. A deteção destes auto-indutores representados a vermelho, apenas é possível quando as bactérias atingem um número populacional adequado, um *quorum* (http://mmg-233-2014-genetics-genomics.wikia.com/wiki/Quorum_Sensing).

Deste modo, o presente sistema fornece às bactérias, meios para expressar comportamentos específicos, que só ocorrem enquanto crescem em comunidades sociais (Sifri, 2008).

Através de estudos de comportamentos coletivos e de moléculas de sinalização intercelulares, começa-se a compreender as extensas capacidades de comunicação e coordenação que aumentam o poder bacteriano de operar na biosfera. Coletivamente e de forma coordenada, as bactérias agem com mais eficiência do que poderiam como agentes autônomos. A chave para a multicelularidade bacteriana reside na capacidade de cada célula individualmente, receber, interpretar e responder à informação das células vizinhas. Por outras palavras, o reconhecimento da multicelularidade bacteriana aprofunda a nossa apreciação das capacidades de processamento de informação de células bacterianas individuais. A transferência significativa de informação entre componentes e do sistema como um todo é essencial à noção de organismo (Lyons & Kolter, 2015; Shapiro, 1998).

2.4. O comportamento social

Os organismos evoluem para se adaptarem a um ambiente dinâmico. Através do consumo de recursos, formação de colónias e eliminação de resíduos, estes organismos modificam o seu ambiente, criando um *feedback* ecológico que altera as pressões seletivas existentes e cria outras. Este nicho ecológico também inclui outros microrganismos. Os indivíduos da mesma e de diferentes espécies impõem a seleção um ao outro, criando um ambiente seletivo em constante alteração que evolui juntamente com os traços que o selecionam, em que os organismos são ambos o sujeito e o objeto da evolução (Van Dyken e Wade, 2012).

Quando, em 1964, Hamilton se debruçou acerca deste tema, verificou que as espécies tendem a evoluir a nível comportamental de forma a maximizar a sua reprodução (*inclusive fitness*) (Hamilton, 1964).

Segundo a sua visão, os indivíduos maximizam a sua reprodução através do seu impacto sobre a reprodução de indivíduos relacionados (efeitos reprodutivos indiretos ou *indirect fitness*), bem como diretamente através do seu impacto sobre a sua própria reprodução (efeitos reprodutivos diretos ou *direct fitness*) (West *et al.*, 2007).

Esta teoria da evolução social, ainda hoje válida, veio desvendar os mistérios da cooperação entre indivíduos, de acordo com a interpretação de Sachs *et al.* (2004). Os comportamentos cooperativos são todos os que fornecem um benefício para o destinatário, incluindo: os comportamentos que são custosos (-/+) e os benéficos (+/+) para o autor. Deste modo, esta definição inclui todos os comportamentos altruístas e alguns mutualmente benéficos (West *et al.*, 2007).

A explicação teórica para a evolução da cooperação ou qualquer outro tipo de comportamento pode então ser dividido em duas categorias: benefícios reprodutivos diretos e benefícios reprodutivos indiretos (Figura 7).

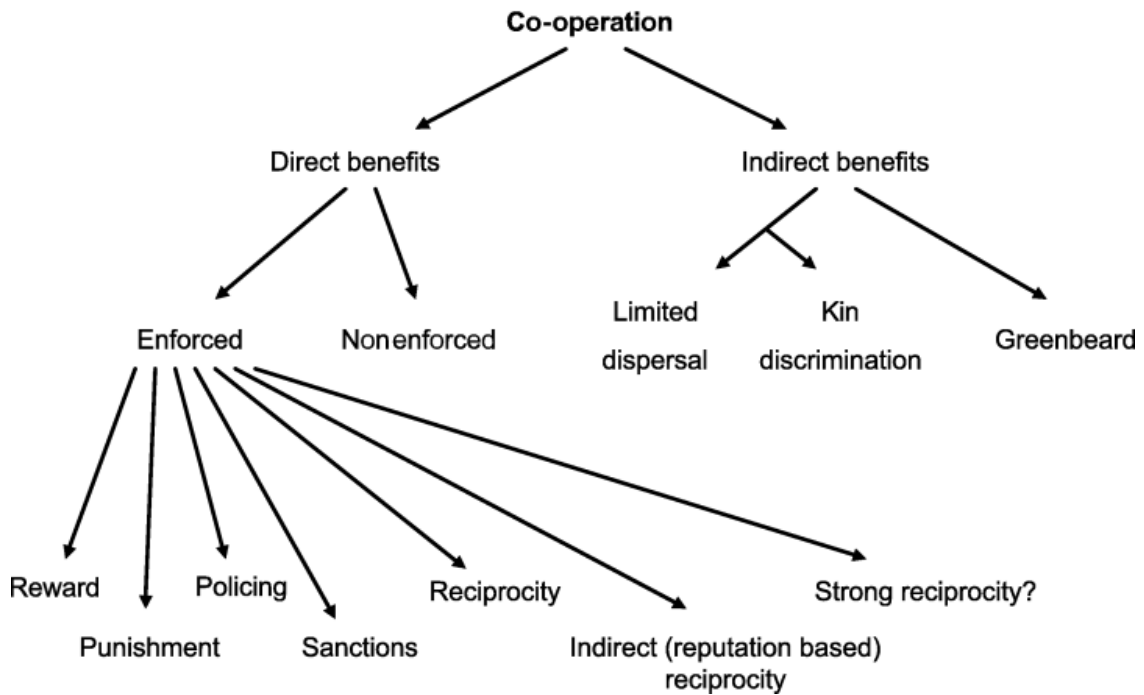


Figura 7. Esquema representativo da cooperação. Benefícios reprodutivos diretos explicam a cooperação mutuamente benéfica, ao passo que os benefícios reprodutivos indiretos explicam a cooperação altruísta. Dentro destas categorias fundamentais, os diferentes mecanismos podem ser classificados de diversas formas (West *et al.*, 2007).

Determinados comportamentos fornecem benefícios reprodutivos diretos (*direct fitness*) ao indivíduo que executa o comportamento, o que supera o custo de o realizar, fundamentalmente a essência de um comportamento (+/+). Por exemplo, um maior tamanho de grupo pode proporcionar benefícios para todos os indivíduos, como uma maior sobrevivência ou maior sucesso na captação de nutrientes, e com este intuito, as células desta população ir-se-ão dedicar às funções que lhes foram atribuídas. Coloca-se assim a hipótese da existência nestas comunidades de mecanismos que visam a cooperação, podendo em alguns casos favorecer os cooperadores ou punir os “batoteiros” (West *et al.*, 2007).

Por vezes, um outro tipo de comportamento cooperativo pode ocorrer, no qual o autor cede os benefícios reprodutivos garantindo a reprodução de outros indivíduos, mas afe de benefícios reprodutivos indiretos. Este tipo de comportamento tem obviamente maior custo para o autor e oferece grandes benefícios ao recetor, é o que podemos associar ao conceito de comportamento altruísta (-/+).

A forma mais fácil e comum deste comportamento ocorrer é quando os genes são

idênticos por descendência ou seja, ajudando a reproduzir um parente próximo, o indivíduo passa os seus próprios genes para a próxima geração, ainda que de forma indireta. A sua estrutura assenta em dois mecanismos: o primeiro é que esta cooperação se destina preferencialmente a parentes (*kin discrimination*), o segundo funda-se no conceito da dispersão limitada (viscosidade populacional) mantendo os parentes próximos uns dos outros, permitindo que a cooperação seja indiscriminadamente dirigida a todos os vizinhos (que tendem a ser os parentes) (West *et al.*, 2007; Doncaster *et al.*, 2013).

No entanto uma outra forma adicional existe nesta segunda série de explicações que não se relaciona com o parentesco entre os indivíduos da comunidade, neste cenário, para obter *indirect fitness* a cooperação será dirigida a não-parentes que partilhem o mesmo gene cooperativo. Este conceito ou mecanismo *greenbeard* requer um único gene (ou número de genes intimamente ligados) que é responsável pelo comportamento cooperativo e pode ser reconhecido pelos outros indivíduos (Blower, 2012; Refardt, 2013; West *et al.*, 2007).

i. O conceito de altruísmo

O altruísmo no seu sentido comum ou nativo, significa promover os interesses de outros, é um fenómeno geral que envolve ter os interesses de outros como os nossos.

Em termos evolutivos, altruísmo é um comportamento de autossacrifício que resulta em um aumento da probabilidade dos genes de um outro indivíduo serem representados na próxima geração, relaciona-se com as consequências reprodutivas desse comportamento. O altruísmo evolutivo, nesta definição, não tem qualquer ligação com as motivações ou outros mecanismos psicológicos que estão envolvidos neste tipo de comportamento, que mais não são do que engenhos sociais.

O altruísmo evolutivo pode ocorrer em qualquer organismo vivo e envolve a doação de benefícios reprodutivos, e será a este a que nos referimos quando se fizer uso futuro da palavra altruísmo (Scott e Seglow, 2007).

ii. PCD em resposta ao *stress*

Uma comunidade bacteriana pode induzir a morte de uma parte da população em resposta a diversas condições de *stress* para favorecer a sobrevivência da colónia. Na maioria destes casos, a PCD é induzida através de mecanismos toxina-antitoxina (TA), permitindo às bactérias ter a capacidade de controlar a morte celular sob diversas condições como: o *stress* oxidativo, exposição a radiação, privação de nutrientes, temperaturas elevadas, toxicidade e muitas outras. Assim, estes sistemas desempenham um papel importante na sobrevivência celular quando as bactérias são sujeitas a dano celular ou várias outras condições de *stress*.

2.5. Sistemas TA

Os mecanismos genéticos de PCD não são totalmente compreendidos. Muita atenção tem sido focada no estudo destes sistemas, encontrados em *E. coli* e em muitas outras bactérias, incluindo bactérias patogénicas (Koksharova, 2013).

Nos seus estágios iniciais de descoberta, sistemas toxina-antitoxina (TA) procarióticos foram confinados a plasmídeos bacterianos, onde eles atuariam para mediar a manutenção e estabilidade destes, eliminando qualquer célula filha sem plasmídeos que se pudesse desenvolver. A sua eventual descoberta como elementos quase ubíquos e repetitivos nos cromossomas bacterianos levou a uma riqueza de conhecimentos e debate científico quanto à sua diversidade e funcionalidade no estilo de vida procariota (Chan *et al.*, 2016).

Os sistemas TA estão normalmente organizados em operões com dois genes continuamente a codificar uma proteína estável que destrói um processo celular essencial (como: a tradução, replicação, síntese de ATP e síntese da parede celular) e uma antitoxina instável que impede a sua toxicidade. As toxinas e antitoxinas formam um complexo estável inibindo a atividade da toxina em condições de crescimento normais (Allocati, 2015; Chan *et al.*, 2016).

Os sistemas TA têm sido associados a múltiplas funções celulares procarióticas, tais como sendo medidores de PCD, bem como persistência, formação de biofilme, como armas de defesa contra infeções de bacteriófagos e como fatores de virulência em

bactérias patogénicas. Assim, é evidente que estas antitoxinas desempenham um papel essencial na modulação do estilo de vida procariótica (Chan *et al.*,2016).

Os sistemas TA são atualmente classificados em cinco grupos (tipo I a V) de acordo com a natureza da antitoxina e o modo de interação entre a toxina e antitoxina (Figura 8).

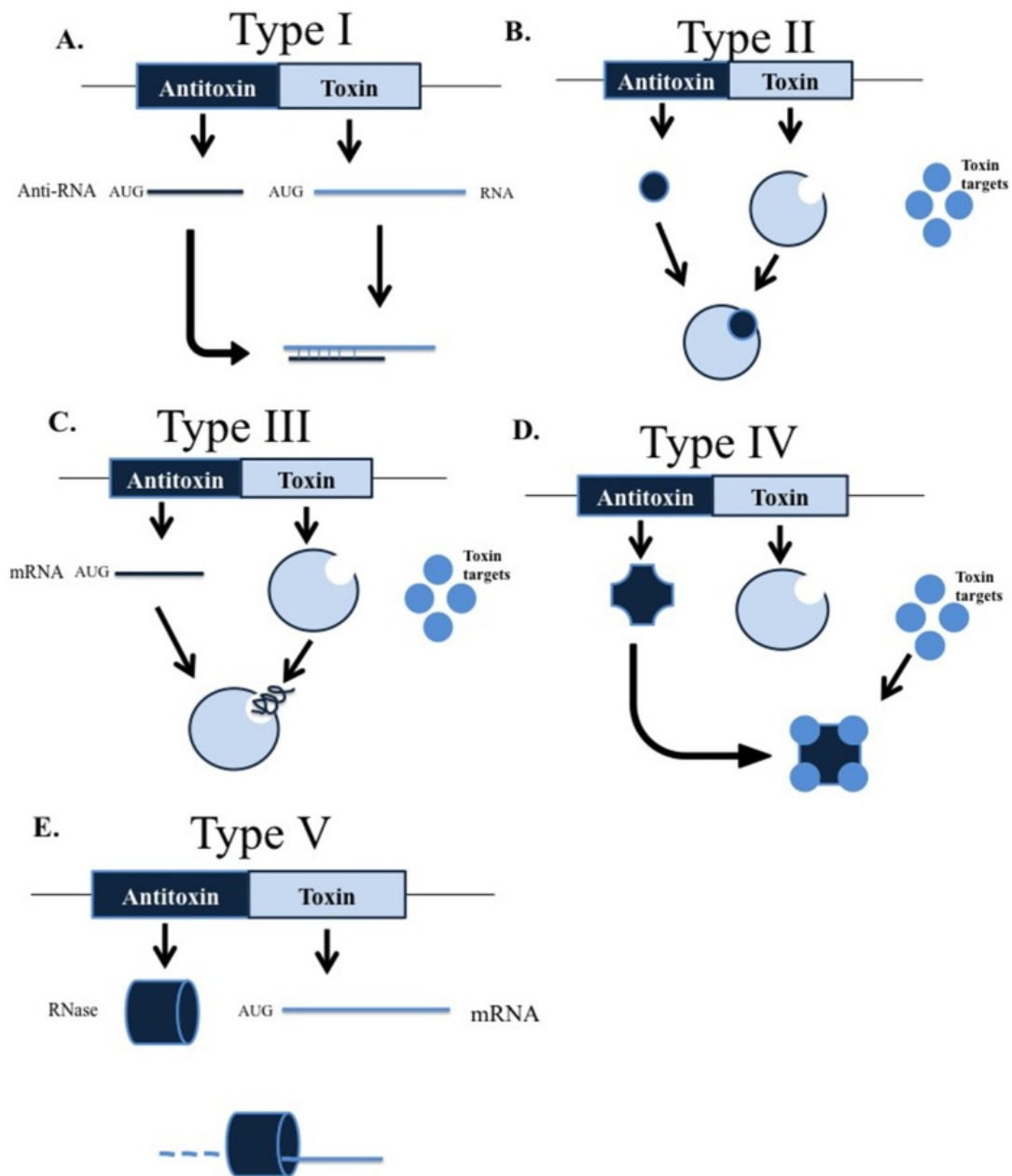


Figura 8. Sistemas TA bacterianos. Em todos os sistemas TA, em resposta a vários estímulos a antitoxina é degradada, permitindo que a toxina tenha ação sobre o seu alvo resultando na paragem do crescimento ou na morte celular (Fernández-Garcia *et al.*, 2016).

- (A) Tipo I: A antitoxina antisense mRNA liga-se ao mRNA da toxina, bloqueando a sua tradução. A perda do instável antisense RNA permite a transcrição da cadeia no sentido direto.
- (B) Tipo II: Toxina e antitoxina são proteínas e são geralmente transcritas no mesmo operão, formando um complexo inativo.
- (C) Tipo III: O complexo TA é formado pela união da toxina proteína com a antitoxina mRNA.
- (D) Tipo IV: A antitoxina previne o efeito da toxina ligando-se ao seu substrato, bloqueando a sua ação.
- (E) Tipo V: A antitoxina mRNA codifica uma RNase que degrada a toxina mRNA.

Em sistemas TA de tipo I, temos o exemplo do sistema *hok/sok* que medeia a manutenção do plasmídeo, induzindo a morte de células isentas de plasmídeos.

O mecanismo molecular através do qual estas toxinas matam a célula ainda não está claro, mas está provavelmente associado à despolarização da membrana e ao aumento da permeabilidade membranar (Allocati, 2015).

Em sistemas TA tipo II, dois genes, que codificam duas pequenas proteínas, estão organizados num operão e são regulados ao nível da transcrição. As duas proteínas formam um complexo estável TA que inibe os efeitos nocivos da toxina (Figura 1b). O primeiro sistema TA tipo II descrito foi o módulo *mazE/mazF* que está amplamente difundido entre as bactérias e baseia-se na atividade da toxina MazF. A consequente redução drástica da concentração de MazE liberta a toxina MazF provocando a morte celular. Em *M. xanthus*, um homólogo MazF tem um papel crucial na formação do corpo de frutificação. Um estudo recente coloca a hipótese de que a morte celular mediada por *mazEF* em *E. coli* é um fenómeno populacional que requer a presença de um fator QS, designado fator de morte extracelular (EDF). O EDF é um pentapéptido linear que afeta especificamente a toxina, amplificando significativamente a sua atividade enzimática. Mais recentemente, EDF's foram também encontrados em bactérias de Gram-positivo *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) e em Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Os EDF's de *B. subtilis* e *P. aeruginosa* demonstraram ser capazes de desencadear *E. coli* *mazEF*, fornecendo o primeiro exemplo de um fator QS, participando na morte celular bacteriana interespecies. Deste modo, tem sido proposto que a indução do mecanismo de suicídio altruísta por EDF's,

pode ser utilizado por uma espécie bacteriana em condições de *stress*, para matar outra numa população mista. EDF's têm o potencial para serem explorados para gerar uma nova classe de antibióticos que desencadeiam a morte pelo exterior das células bacterianas (Allocati, 2015).

Os membros da família TA epsilon/zeta estão também envolvidos na virulência de vários agentes patogénicos humanos. Um exemplo é o sistema epsilon zeta pneumocócica (PezA/PezT) em *S. pneumoniae*. A toxina PezT fosforila o precursor PG, uridina difosfato-N-acetilglucosamina, levando à inibição de MurA. Esta enzima catalisa umas das primeiras etapas da síntese de PG, deste modo, o seu bloqueio resulta na autólise de bactérias de crescimento rápido. Como consequência, a toxina formadora de poros, a pneumolisina, um importante fator de virulência que acelera a progressão da infeção, é libertado (Allocati, 2015, Schuster, 2016).

Um exemplo de um sistema TA tipo III é o sistema ToxIN, pela primeira vez identificado num plasmídeo de um patogénico de Gram-negativo formalmente conhecido como *Erwinia carotovora*. A toxina ToxN tem atividade endonucleolítica e desempenha um papel crítico na indução da morte celular após a infeção por fagos. Neste sistema, o suicídio altruísta de uma célula infetada reduz a infeção por fagos dentro da população. O sistema de infeção abortiva funciona como um típico sistema TA tipo III através de um mecanismo RNA-proteína (Figura 1c). Durante a infeção por fagos, o ratio ToxI:ToxN altera-se, provavelmente devido a alterações no hospedeiro ou translação ou degradação do DNA bacteriano, resultando na libertação da toxina ativa que consequentemente cliva os RNAs celulares e do fago (Allocati, 2015; Schuster, 2016).

2.6. O conceito de Fenoptose

“Worn-out individuals are not only valueless to the species, but they are even harmful, for they take the place of those which are sound”.

August Weismann

A hipótese da morte programada de um organismo foi inicialmente proposta por um estudioso alemão August Weismann na década de 1980.

Segundo a sua teoria, um mecanismo geneticamente programado de morte celular surgiu como resultado da seleção natural para eliminar indivíduos desgastados, permitindo libertar espaço e recursos para gerações mais jovens. No final dos anos 90, Skulachev sugeriu o termo “phenoptosis” para definir a morte celular de um organismo.

Todas as propriedades de um organismo estão codificadas no seu genoma, incluindo os processos de morrer, e eles são executados sob a forma de uma cadeia de reações bioquímicas, causando a morte do organismo no final da reação (Koksharova, 2013).

A fenoptose é definido como a morte geneticamente programada de um organismo. Este programa está codificado no seu genoma, resulta numa cadeia de eventos bioquímicos que leva ao seu suicídio (Skulachev, 2012).

A fenoptose é a morte de um indivíduo, causado pelas suas próprias ações ou por ações de parentes próximos e que não são causadas principalmente por acidentes, doenças ou fatores externos, o que é determinado, regulado ou influenciado por genes favorecidos pela seleção natural. A fenoptose não pode ser justificada em termos de seleção individual e precisa sempre de uma justificação em termos de seleção supra-individual. Pelo contrário, uma morte com nenhuma explicação em termos de seleção supra-individual deve ter determinantes não seletivos específicos (Libertini, 2012).

Conclusão

O conceito de PCD em bactérias força-nos a refletir sobre um grande número de importantes eventos da vida de uma célula microbiana, como a sua sobrevivência em biofilmes, a natureza da sua resistência aos antibióticos e a outros fatores de *stress*. Estudos futuros integrando métodos de mutagénesis, genómica e transcriptómica irão promover uma melhor percepção do “enigma” da morte programada bacteriana e a utilização deste conhecimento para controlo das populações bacterianas.

Estudos sobre PCD bacteriana têm um enorme valor, dado que podem ser explorados para desenvolver estratégias terapêuticas alternativas e eficazes contra as bactérias resistentes aos antibióticos atuais. O número de antibióticos que mantêm a sua atividade contra vários agentes patogénicos graves é limitado, uma vez que a resistência bacteriana aos antibióticos continua a aumentar, representando atualmente uma emergência global. Este problema tem sido exacerbado pela escassez de novas moléculas e requer novas abordagens para o problema. Resultados promissores foram obtidos pela exploração de sistemas TA, através da ativação artificial de PCD. A morte celular surge pela interrupção da formação do sistema TA ou pelo aumento da degradação de antitoxina.

Deverá no entanto ser referido que a indução de PCD pode ser prejudicial para o hospedeiro, quando é acoplada com a libertação de produtos extracelulares que em alguns casos, poderão favorecer os patogénicos.

Diversos estudos indicam que o sistema *quorum sensing* é uma abordagem alternativa, atrativa para a terapia antibacteriana. Dado que os sistemas QS estão envolvidos na regulação dos fatores de virulência em bactérias, a sua inibição ou modulação poderá aumentar a suscetibilidade dos agentes patogénicos ao sistema imunitário do hospedeiro. Investigações adicionais serão necessárias para avaliar a potencialidade real destas novas terapias, tais como estudos *in vivo*.

Compreender os mecanismos de PCD em procariotas poderá também solucionar muitos problemas práticos, como os associados com a pureza e segurança dos ecossistemas aquáticos. Problemas como o *bloom* de fitoplâncton devido a toxinas secretadas ou o desaparecimento repentino e inesperado de populações inteiras de bactérias fototróficas em expansão.

Compreender o seu comportamento social e promover a formação de comunidades complexas cooperativas poderá servir para melhorar até o atual sistema de tratamento de resíduos das ETAR's (Estações de Tratamento de Águas Residuais).

Bibliografia

Alberts, B. (2002). *Programmed Cell Death (Apoptosis)*. *Biology of the Cell*. [Em linha]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26873/>>. [Consultado em: 4 de março de 2016].

Allocati, N. *et al.* (2015). Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death & Disease*, 6(1), pp. 1-10.

Bassler, B. (2002). Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell*, 109(4), pp. 421-424.

Bayles, K. W. (2014). Bacterial Programmed Cell Death: Making Sense of a Paradox. *Nature reviews Microbiology*, 12(1), pp. 63-69.

Ben-Jacob, E. (2014). The physics of bacterial decision making. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(154). [Em linha]. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00154>>. [Consultado em: 12 de abril de 2016].

Blower, T. *et al.* (2012). Viral Evasion of a Bacterial Suicide System by RNA-Based Molecular Mimicry Enables Infectious Altruism. *PLoS Genetics*, 8(10). [Em linha]. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article/asset?id=10.1371/journal.pgen.1003023.PDF> [Consultado em: 4 de março de 2016].

Cabon, L. *et al.* (2013). Programmed cell death comes in many flavours. *Médecine sciences*, 29(12), pp. 1117-1124.

Chaitanya, K. *et al.* (2015). Apoptosis-like cell death in unicellular photosynthetic organisms. *Algal Research*, pp. 126-133.

Chan, W. *et al.* (2016). Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3(9), DOI 10.3389/fmolb.2016.00009.

Doncaster, C. P. *et al.* (2013). Competitive environments sustain costly altruism with negligible assortment of interactions. *Scientific Reports*, 3(2836), DOI:

10.1038/srep02836

Dorado, J. M. *et al.* (2016). Myxobacteria: Moving, Killing, Feeding, and Surviving Together. *Frontiers in Microbiology*, 7(781), pp. 1-18.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 35(4), pp. 495-516.

Galluzzi, L. *et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death & differentiation*, 19, pp. 107-120.

Grivicich, I. *et al.* (2007). Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), pp. 335-343.

Hacker, G. (2013). Is there, and should there be, apoptosis in bacteria? *Elsevier*, pp. 640-644.

Hamilton, W. D. (1964). The Genetical Evolution of Social Behaviour I. *Journal of theoretical biology*, 7(1), pp. 1-16.

Holm, A. e Vikström, E. (2014). Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Frontiers in Plant Science*, 5(309), pp. 1-7.

Kerr, J. F. *et al.* (1971). Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *The Journal of Pathology*, 105(1), pp. 13-20.

Koksharova, A. (2013). Bacteria and phenoptosis. *Biochemistry*, 78(9), pp. 963-970.

Kroemer, G. *et al.* (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death & differentiation*, 16(1), pp. 3-11.

LaSarre, B. e Federle, M. J. (2013). Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), pp. 73-111.

Lewis, K. (2000). Programmed Death in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp. 503-514.

Li, Y. H. e Tian, X. (2012). Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in

- Biofilms. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(3), pp. 2519-2538.
- Libertni, G. (2012). Classification of Phenoptotic Phenomena. *Biochemistry*, 77(7), pp. 707-715.
- Lyons, N. A. e Kolter, R. (2015). On The Evolution of Bacterial Multicellularity. *Current Opinion in Microbiology*, 24, pp. 21-28.
- Mcllwain, D. *et al.* (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), pp. 1-28.
- Popat, R. *et al.* (2015). Collective sensing and collective responses in quorum-sensing bacteria. *Journal of the Royal Society*, 12(103). [Em linha]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0882>>. [Consultado em: 11 de maio de 2016].
- Refardt, D. *et al.* (2013). Altruism can evolve when relatedness is low: evidence from bacteria committing suicide upon phage infection. *Proceedings Biological Sciences*, 280(1759), DOI: 10.1098/rspb.2012.3035.
- Sarvothaman, S. *et al.* (2015). Apoptosis: role in myeloid cell development. *Blood research*, 50(2), pp. 72-79.
- Schuster, C. e Bertram, R. (2016). Toxin-Antitoxin Systems of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, 8(5), pp. 140.
- Scott, N. e Seglow, J. (2007). *Altruism” de Niall Scott and Jonathan Seglow*. New York: Open University Press.
- Sedwick, C. (2011). PezT: a bacterial suicide gene. *PLoS biology*, 9(3), pp. e1001036.
- Shapiro, J. (1998). Thinking about bacterial populations as multicelular organisms. *Microbiology*, 52, pp. 81-104.
- Sifri, C. D. (2008). Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clinical Infectious Diseases*, 47(8), pp. 1070-1076.
- Skulachev, V. P. (2012). “Phenoptosis” and How to Fight It?. *Biochemistry (Moscow)*, 77(7), pp. 689-706.

Tower, J. (2015). Programmed cell death in aging. *Aging research reviews*, 23(Pt A), pp. 90-100.

Van Dyken, J. D. e Wade, M. J. (2012). Origins of altruism diversity II: Runaway co-evolution of altruistic strategies via “reciprocal Niche Construction”. *Evolution; international journal of organic evolution*, 66(8), pp. 2498-2513.

West, A. *et al.* (2007). Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 20(2), pp. 415-432.