

Morte Celular Programada e Patologias Associadas

Fátima do Rosário Lopes dos Reis Dias de Freitas

**MORTE CELULAR PROGRAMADA E PATOLOGIAS ASSOCIADAS**

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Porto 2012

## Morte Celular Programada e Patologias Associadas

Morte Celular Programada e Patologias Associadas

Fátima do Rosário Lopes dos Reis Dias de Freitas

**MORTE CELULAR PROGRAMADA E PATOLOGIAS ASSOCIADAS**

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Porto 2012

**MORTE CELULAR PROGRAMADA E PATOLOGIAS ASSOCIADAS**

**Orientadora:** Professora Doutora Anabela Castro

**Autor:** Fátima do Rosário Lopes dos Reis Dias de Freitas

---

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa  
como parte integrante dos requisitos para obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

## **RESUMO**

A apoptose apresenta-se como uma forma de morte celular programada que tem um papel determinante na homeostasia tecidual dos organismos multicelulares. A caracterização fenotípica da apoptose inclui: condensação da cromatina, fragmentação de DNA, externalização da fosfatidilserina, vacuolização, activação de caspases e aumento de produção de radicais oxigénio reactivos.

Desequilíbrios no binómio proliferação/morte celular encontram-se associados a múltiplas patologias prevalentes. São exemplos paradigmáticos as neoplasias que envolvem com frequência este tipo de desequilíbrios. Este trabalho foca igualmente aspectos semelhantes noutras patologias como as doenças auto-imunes, viroses, Alzheimer e doença de Parkinson. Esta perspectiva global permite perceber a abrangência do impacto e papel da apoptose na fisiopatologia de variados processos patológicos.

## **ABSTRACT**

Apoptosis is a form of programmed cell death (PCD) that plays a central role in tissue homeostasis and maintenance in multicellular organisms. Cytological phenotypes associated with apoptosis include chromatin condensation, DNA fragmentation, phosphatidylserine externalization, vacuolization, activation of caspases, and increased production of reactive oxygen species.

Imbalances in the duality of cell death and proliferation are associated to many prevalent pathologies. Neoplasies are paradigmatic examples of such pathologies, and are frequently associated with these imbalances. This work also focuses on similar aspects in other pathologies such as auto-immune diseases, viral diseases, Alzheimer's and Parkinson's disease. This global perspective allows us to perceive the extent of the impact and role of apoptosis in the pathophysiology of various disease processes.

## **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 no 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 Anabela Castro, 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 obrigada.

A todos os meus amigos por todo o apoio e alegria que sempre mostraram disponível.

Agradeço ao João Miguel, por todo o apoio e incentivo que sempre me demonstrou ao longo desta fase. O meu sincero obrigada.

Aos meus irmãos, João e Alexandre, pelo apoio incondicional sempre presente.

Por fim, queria dedicar este trabalho aos meus pais. Foram eles que tornaram tudo isto possível. Agradeço-lhes hoje, amanhã e sempre. Obrigada!

## ÍNDICE GERAL

<b>RESUMO .....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE GERAL .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>INTRIDUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>2</b>
1. MORTE CELULAR.....	2
2. MORTE CELULAR PROGRAMADA.....	3
3. APOPTOSE .....	3
3.1. Conceito e características.....	3
3.2. Morfologia.....	4
3.3. Controlo genético .....	6
3.4. Proteínas da família Bcl-2.....	8
3.5. Proteínas inibidoras da apoptose .....	9
3.6. Caspases: iniciadoras e executoras.....	9
3.7. Vias de ativação: via extrínseca e via intrínseca .....	11
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>14</b>
1. APOPTOSE E PATOLOGIAS ASSOCIADAS .....	14
1.1. Cancro .....	16
1.2. Doenças autoimunes .....	18
1.3. Infecções víricas .....	20
1.4. Doença de Alzheimer.....	21
1.5. Doença de Parkinson .....	24

1.6. Síndrome da imunodeficiência adquirida .....	26
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>32</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Sequência de eventos apoptóticos .....	5
<b>Figura 2</b> – Sequência de sinalização apoptótica nas espécies <i>C. elegans</i> , <i>D. melanogaster</i> e em células de mamífero .....	7
<b>Figura 3</b> – Apoptose induzida por via extrínseca e via intrínseca .....	13

## ABREVIATURAS

DNA - “Desoxiribonucleic acid” - Ácido desoxirribonucleico

AIF - “Apoptosis Inducing Factor”- Fator de indução tumoral

ALPS - “Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome” - Síndrome linfoproliferativo autoimune

Apaf-1 - “apoptosis protease activating-factor”

APP - “Amyloid precursor protein”- Proteína precursora de amilóide

RNA - “Ribonucleic acid” - Ácido ribonucleico

ATP - Adenosina trifosfato

Cyt *c* - “Cytochrome *c*”- Citocromo *c*

DA - Doença de Alzheimer

IAP - “Inhibitor of apoptosis protein”- Proteína inibidora da apoptose

MHC - “Major histocompatibility complex” - Complexo principal de histocompatibilidade

NO - Óxido nítrico

NK - “Natural killer”

PCD - “Programmed cell death”- Morte celular programada

RNS - “Reactive nitrogen species”- Espécies reactivas de nitrogénio

ROS - “Reactive oxygen species”- Espécies reativas de oxigénio

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC - Sistema nervoso central

TNF - “Tumor necrosis factor” - Factor de necrose tumoral

VIH - Vírus da imunodeficiência humana

HPV - “Human Pappilomavirus” - Vírus do papiloma humano

## **INTRODUÇÃO**

O desenvolvimento ocorrido na área da biotecnologia da saúde nas últimas décadas tem contribuído para uma melhoria acentuada na Saúde e conseqüentemente um aumento da esperança média de vida. Doenças emergentes têm surgido e a preocupação para as suas causas e o seu comportamento no organismo humano são sempre uma questão relevante.

Este trabalho de revisão bibliográfica surgiu com o intuito de avaliar a importância do fenómeno de morte celular programada, quer nos processos vitais, assim como a sua relação no desencadeamento de diversas patologias na espécie humana.

O principal objectivo foi a pesquisa de informação científica para uma melhor compreensão da relação entre a morte programada das células e o aparecimento de patologias e de todos os mecanismos relacionados com este fenómeno.

Inicialmente, pretendeu-se fazer uma revisão bibliográfica dos fundamentos teóricos que constituem a base do tema desta dissertação. Assim sendo, fez-se uma breve abordagem aos conceitos relacionados com a morte celular programada, com o propósito de facilitar a compreensão do capítulo seguinte, relativo à sua relação com diversas patologias, entre elas, o cancro, doenças autoimunes, infecções víricas e doenças neurodegenerativas.

No primeiro capítulo, definiu-se o conceito de morte celular, fazendo referência à morte celular programada, bem como às suas características, morfologia, controlo genético e vias de activação. Na segunda parte, foi abordado de que forma a morte celular programada contribui para o desenvolvimento e progressão de patologias.

## CAPÍTULO I

### 1.1. MORTE CELULAR

A morte celular por necrose apresenta-se como um processo passivo de carácter degenerativo devido à morte accidental de células ou de um tecido, por causas fisiológicas, traumatismos graves ou agentes infecciosos. O fenótipo de necrose é caracterizado pelo aumento do volume da célula (oncoses) e dos seus organelos com consequente perda da integridade da membrana plasmática e derramamento do conteúdo intracelular. Como reacção o organismo desencadeia uma resposta inflamatória (Alberts *et al.*, 2004; Grivicich *et al.*, 2007).

No entanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. A morte de uma célula pode ser um processo geneticamente controlado, caracterizado por uma sequência de fenómenos moleculares e bioquímicos desencadeados por estímulos endógenos ou exógenos, que resultam num processo designado de morte celular programada (PCD), podendo assumir formas distintas, das quais se destacam a apoptose e a autofagia, contrariamente ao tipo de morte não regulado ou controlado de uma célula a necrose. A nível molecular e celular estas três formas de morte celular apresentam características diferentes, mas verifica-se que estes processos podem ocorrer em simultâneo e/ou alternadamente, dificultando a sua diferenciação prática e experimental (Castro *et al.*, 2010; Skulachev, 2000).

As classificações e denominações dos diferentes tipos de morte celular são normalmente efectuadas perante a sua aparência morfológica (apoptose, necrose, autofagia ou associada com mitose), envolvimento de enzimas (envolvimento de nucleases ou caspases), aspectos funcionais (programada ou accidental, patológica ou fisiológica) ou ainda características imunológicas, com nomenclatura específica para cada caso (Kroemer *et al.*, 2009). Neste trabalho apenas será abordado o tipo de PCD cujo fenótipo seja de apoptose.

## 1.2. MORTE CELULAR PROGRAMADA

A PCD apresenta-se como um processo rápido, muito regulado e de grande eficiência que ocorre de forma não acidental, induzido por uma infinidade de estímulos que requerem a interação de diversos factores. É caracterizada por desencadear processos bioquimicamente específicos e por ocorrer com consequentes alterações morfológicas em células individualizadas. Em todo este processo não ocorre resposta inflamatória. Requer energia e síntese proteica para a sua execução e realiza-se em diversas etapas (Alberts *et al.*, 2004; Grivicich *et al.*, 2007).

Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo “apoptose” para indicar esse tipo de morte celular, caracterizada pelas alterações morfológicas. O seu termo provém do grego “apoptosiz” que significa “queda”, a queda das folhas das árvores no Outono. (Alberts *et al.*, 2004; Kerr *et al.*, 1972).

## 1.3. APOPTOSE

### 1.3.1. Conceito e características

A apoptose é uma forma de PCD que pode ocorrer em condições fisiológicas normais, não sendo implícita a existência de agente patológico. O número de células que sofrem PCD quer durante o desenvolvimento como em tecidos adultos é impressionante. Estima-se que um indivíduo adulto seja constituído por  $10^{13}$  células somáticas e que diariamente  $10^{10}$  dessas células entrem em PCD. Esta forma de morte celular participa na morfogénese, na renovação das populações celulares de vários órgãos e sistemas ao longo de toda a vida dos organismos multicelulares, na eliminação de células anormais por diversos tipos de alteração de ácido desoxirribonucleico (DNA) e na eliminação de células infectadas por vírus, pelo que a apoptose é um processo essencial na homeostasia de vários tecidos e órgãos. (Alberts *et al.*, 2004).

A apoptose é um processo intrínseco à célula e geneticamente programado que é desencadeado por estímulos intrínsecos ou extrínsecos, no entanto, em condições

fisiológicas não se pode considerar que existe um qualquer sinal universal capaz de desencadear o processo de apoptose e, apesar de diversos estímulos poderem desencadear apoptose, o efeito de um dado estímulo num determinado tipo de células pode não ser sistemático. Assim, a apoptose surge como uma resposta celular entre várias respostas celulares possíveis. Esta concepção contém uma componente individual, a denominada “decisão celular”, mas também evidencia componentes circunstanciais. Por outras palavras, a célula integra vários sinais intrínsecos e extrínsecos, e dessa integração pode resultar a activação do processo de execução apoptótica (Castro *et al.*, 2008).

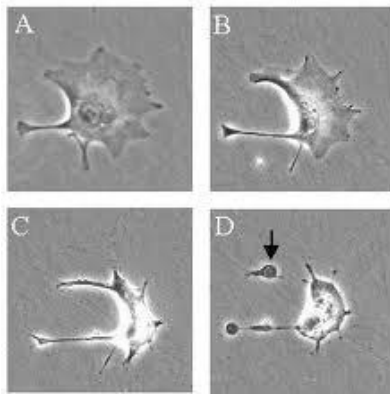
Como estímulos desencadeadores de PCD destacam-se: ligação de moléculas a receptores membranares, agentes oxidantes, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, glicocorticóides, neurotransmissores, ausência de factores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reactivas de oxigénio (ROS), toxinas bacterianas, cálcio, radicais livres e agentes mutagénicos (Kiechle and Zhang, 2002).

Para além dos factores promotores do processo apoptótico, existem também os factores supressores. Entre eles destacam-se: hormonas androgénicas e esteróides, ião de zinco, factores da matriz celular e determinados aminoácidos (Anazetti and Melo, 2007).

### **1.3.2. Morfologia**

Morfologicamente a apoptose apresenta características muito marcantes e coordenadas, distintas de outras formas de morte celular que incluem o arredondamento da célula, a retracção dos pseudópodes, redução do volume celular, condensação do núcleo e citoplasma, fragmentação do DNA, externalização da fosfatidilserina, activação das caspases, aumento da produção de ROS, degradação do citoesqueleto, alterações na membrana citoplasmática, terminando na fragmentação celular em corpos apoptóticos que vão ser de imediato fagocitados por células vizinhas, evitando assim a resposta inflamatória por parte do sistema inume (Alberts *et al.*, 2004; Domingos and Steller, 2007; Vaux and Korsmeyer, 1999).

Uma vez iniciada a fase de execução apoptótica, a destruição celular é rápida pois todas as alterações morfológicas que caracterizam o processo apoptótico decorrem em escassos minutos. É um processo sequencial que se inicia com a perda da coesão da célula diminuindo assim a sua aderência às células vizinhas, não ocorrendo nesta etapa alterações morfológicas a nível dos organelos. Nesta fase precoce de apoptose, por vezes algumas mitocôndrias apresentam ruptura da membrana externa. De seguida, a cromatina começa a condensar e a localizar-se junto da membrana nuclear que nesta fase ainda se mantém coesa. Este é o traço mais característico da apoptose (Alberts *et al.*, 2004).



**Legenda:**

**A:** Desagregação do núcleo com condensação nuclear

**B:** Diminuição do tamanho da célula

**C:** Condensação celular e início de formação de vesículas

**D:** Formação de corpos apoptóticos

**Figura 1** - Sequência de eventos apoptóticos. Adaptado de Reproductive and Cardiovascular Disease Research Group – Apoptosis Em linha. Disponível em <<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>> [Consultado em Julho 2011]

A partir desta etapa começam a formar-se prolongamentos membranares e ocorre a desintegração do núcleo (cariorexis) em fragmentos revestidos pela membrana nuclear. O DNA fragmenta-se. Os prolongamentos membranares então formados aumentam de número e tamanho acabando por romper-se. A membrana celular desagrega-se e formam-se os corpos apoptóticos contendo citoplasma, organelos e fragmentos nucleares. Consequentemente e face á resposta imunitária eficaz do organismo, estes fragmentos são fagocitados por macrófagos, células parenquimatosas ou células dendríticas e removidos sem desencadear um processo inflamatório. Este processo de

reconhecimento é imediato por parte dos fagócitos uma vez que durante a formação dos corpos apoptóticos, ocorre a externalização da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo na membrana plasmática, ficando exposta à superfície externa da célula, indicando desta forma às células vizinhas que deverão ser fagocitados (Alberts *et al.*, 2004).

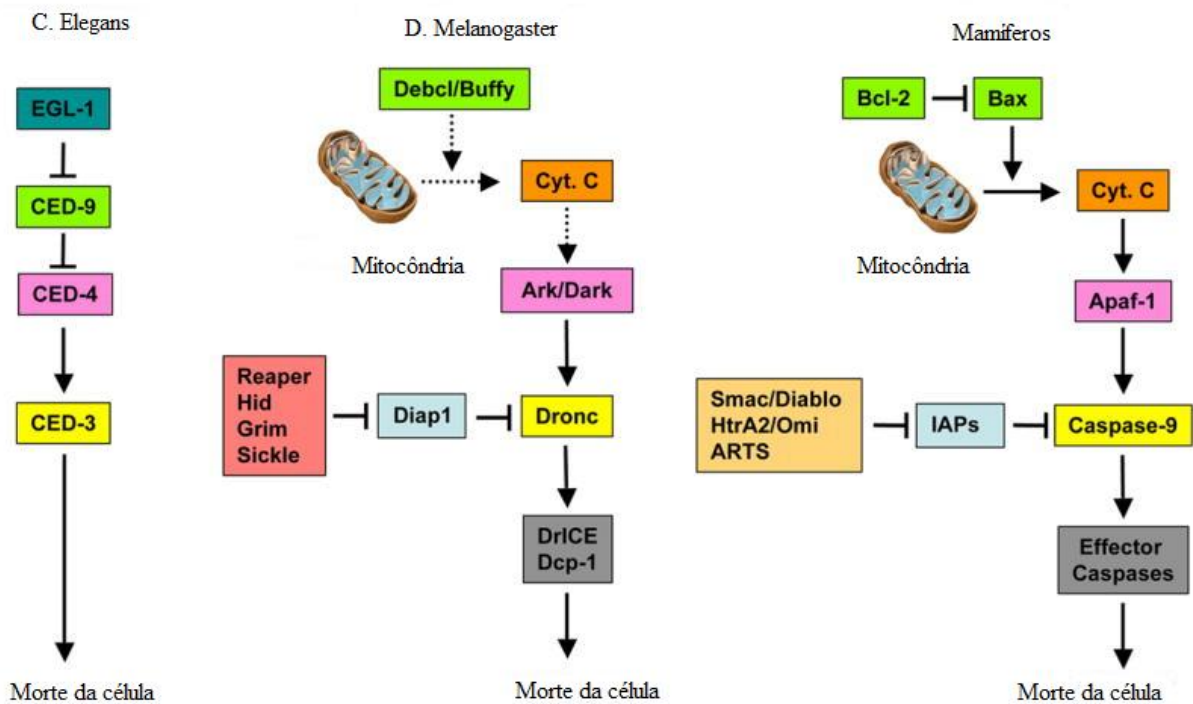
### 1.3.3. Controlo genético

Os estudos efectuados em sistemas relativamente simples na escala evolutiva abrem perspectivas e facilitam a abordagem de vários fenómenos biológicos em sistemas mais complexos, como o dos mamíferos. Merecem particular relevo os resultados obtidos no nemátoda *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) pois representam o arquétipo da “morte celular programada” (Danial and Korsmeuer, 2004; Domingos and Steller, 2007; Twomey and McCarthy, 2005).

A primeira demonstração experimental do controlo genético do processo de PCD surgiu em trabalhos realizados no modelo experimental do *C. elegans*, um nemátoda hermafrodita cujo desenvolvimento embrionário implica eliminação, por apoptose, de um número exacto de células. Durante o desenvolvimento do hermafrodita adulto originam-se 1090 células das quais 131 são eliminadas por apoptose. Este processo de perda celular selectiva é rigoroso e previsível e demonstra que a apoptose é um processo que envolve a expressão sucessiva e atempada de vários genes que codificam proteínas com funções muito distintas (Danial and Korsmeuer, 2004; Domingos and Steller, 2007; Twomey and McCarthy, 2005).

Seguem-se estudos com *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), a mosca-da-fruta, que apresenta uma complexidade intermédia entre os nemátodas e os mamíferos, partilhando várias semelhanças nas vias de transmissão de sinal com os mamíferos, mas com um funcionamento mais simples o que permitiu estudar eficazmente as funções específicas de cada proteína ou genes envolvidos (Danial and Korsmeuer, 2004; Domingos and Steller, 2007; Twomey and McCarthy, 2005).

Os genes, as proteínas e as enzimas descritos variam de nomenclatura entre diferentes espécies, mas existem muitas vezes homologias funcionais que permitem uma comparação entre espécies como se pode observar na Figura 2:



**Figura 2** – Sequência de sinalização apoptótica nas espécies *C. elegans*, *D. melanogaster* e em células de mamífero. Os homólogos funcionais apresentam-se identificados com cores iguais. Não se incluem as vias extrínsecas de ativação das caspase-2 e caspase-8. Adaptado de Domingos and Steller, 2007.

Os mecanismos de PCD estão presente em organismos unicelulares e multicelulares, tendo sido conservados ao longo da evolução, sugerindo que a origem da PCD antecede a multicelularidade, uma vez que já foram observados mecanismos de PCD em bactérias e leveduras que apresentam características semelhantes às descritas para o processo apoptótico das células de mamíferos (Cheng *et al.*, 2008; Twomey and McCarthy, 2005).

#### 1.3.4. Proteínas da família Bcl-2

Em mamíferos o principal grupo de genes envolvidos na maquinaria apoptótica pertence à família *Bcl-2* que engloba vários genes que são responsáveis pela codificação de diversas proteínas com acções funcionalmente opostas. Na família *Bcl-2* existem genes que desempenham um papel pró-apoptótico e outros genes que desempenham um papel anti-apoptótico. É da interacção entre estes genes e as proteínas por eles codificadas que resulta uma regulação central da apoptose pela família *Bcl-2*, que num estado de equilíbrio mantêm a célula num estado de permissividade, mas é sobre essa regulação central que convergem os diferentes estímulos extra e intracelulares (Alberts *et al.*, 2004; Danial and Korsmeuer, 2004; Twomey and McCarthy, 2005).

Esta família, constituída por mais de catorze membros tem como referências organizadoras o gene *Bcl-2* e o seu contraponto o gene *Bax*. O *Bcl-2* codifica uma proteína capaz de bloquear a apoptose induzida por diversos estímulos. Por outro lado, a proteína codificada pelo *Bax* revelou-se capaz de potenciar ou acelerar processos apoptóticos (Alberts *et al.*, 2004; Grivicich *et al.*, 2007).

Estas proteínas, *Bcl-2* e *Bax* são capazes de formar homodímeros (*Bcl-2/Bcl-2* ou *Bax/Bax*), ou heterodímeros (*Bcl-2/Bax*), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros define o balanço pró-apoptótico ou anti-apoptótico na célula. Todas as proteínas bloqueadoras parecem funcionalmente equivalentes nas formas de homodímeros ou de heterodímeros, enquanto a *Bax* só promove a apoptose na forma de homodímero (Kiechle and Zhang, 2002).

Alguns membros desta família de proteínas, como a própria *Bcl-2* e *Bcl-XL*, inibem o processo apoptótico, pelo menos parcialmente, ao bloquear a libertação do citocromo *c* (cyt *c*) pela mitocôndria. Por outro lado, outros membros da família *Bcl-2* (*Bad*, *Bax* e *Bak*) promovem a activação das procaspases e conseqüente morte celular. Algumas destas proteínas promotoras da apoptose, tal como a *Bad*, funcionam por ligação e inactivação da família dos membros inibidores da morte, enquanto outras proteínas, como a *Bax* e a *Bak*, estimulam a libertação do cyt *c* da mitocôndria. Se os genes que

codificam a Bax e a Bak são inactivados, as células são resistentes a múltiplos estímulos indutores da apoptose, indicando a importância crucial dessas proteínas na indução da apoptose. A Bax e a Bak são activadas por outros membros promotores da apoptose da família Bcl-2, como a Bid (Alberts *et al.*, 2004).

### **1.3.5. Proteínas inibidoras da apoptose (IAP)**

As proteínas inibidoras da apoptose (IAP) são outra importante família de proteínas intracelulares reguladoras da apoptose. Estas proteínas inibem a PCD de três vias distintas: inibição da actividade das caspases efectoras 3 e 7, inibição da actividade da caspase-9 iniciadora e modulação do factor de transcrição NF-KB. Actualmente estão descritos cinco membros pertencentes ao agregado IAP: NAIP, XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, e survivina. Esta última tem sido evidenciada ao longo dos estudos efectuados uma vez que está associada à regulação e progressão da mitose, inibição da apoptose e resistência ao tratamento por radioterapia e quimioterapia em alguns tipos de cancro. No decorrer do processo apoptótico, as IAP são impedidas de efectuar a sua ligação inibitória com as caspases, pelas proteínas mitocondriais libertadas para o citosol, no mesmo momento em que é libertado o cyt *c* que vai activar o Apaf-1, para interagir directamente com a caspase-9. Tudo isto potencia a eficiência do processo de activação de PCD (Debatin *et al.*, 2004; Kiechle and Zhang, 2002).

### **1.3.6. Caspases: iniciadoras e executoras**

A maquinaria intracelular apoptótica é semelhante em todas as células animais. Envolve uma família de proteases, denominadas caspases, responsáveis pela ocorrência da degradação celular característica da apoptose. Estão actualmente descritas 14 caspases em células de mamíferos que normalmente estão presentes nas células numa forma inactiva até que sejam activadas por um determinado estímulo. As caspases envolvidas na apoptose dividem-se em duas classes: a classe I composta pelas caspases iniciadoras (caspase -2 -8 -9 -10) e a classe II das caspases efectoras que necessitam da activação directa por parte das caspases da classe I (Alberts *et al.*, 2004; Shearwin-Whyatt and Kumar, 1999).

Pertencem à família das proteases da cisteína (possuem uma cisteína no local activo) que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. São produzidas como precursores inactivos designados de procaspases, os quais são, por sua vez, activados pela clivagem proteolítica em resposta a sinais que induzem à PCD. As proteases activas clivam outras proteínas-chave na célula, que a matam rápida e ordenadamente. A actividade das procaspases é especificamente regulada na célula para garantir um controlo apertado da PCD (Alberts *et al.*, 2004; Cohen, 1997).

A estrutura das caspases na forma de proenzimas é semelhante: são basicamente, constituídas por um segmento N-terminal, também designado por pró-domínio, e por duas cadeias (subunidades, longa e curta) que contêm as sequências que participam no domínio catalítico. São classificadas de acordo com o seu pró-domínio e o seu papel na apoptose. As caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos e estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efectoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes sendo responsáveis pela clivagem de substratos (Alberts *et al.*, 2004; Cohen, 1997).

A sinalização que activa as caspases e desencadeia a cascata de eventos que resulta na apoptose da célula pode ter duas origens, extra ou intracelular. Resumidamente, a sinalização extracelular resulta da activação de receptores específicos na membrana celular, receptores de morte celular, dos quais se pode exemplificar o CD95, resultando na interacção com procaspases que são activadas e convertidas em caspases funcionais. A via intracelular ou via mitocondrial é activada, em resposta a um determinado estímulo, induzindo na mitocôndria alterações estruturais e bioquímicas que resultam na libertação de factores pró-apoptóticos dos quais se podem referir o factor inductor de apoptose (AIF) e o cyt *c* (Twomey and McCarthy, 2005; Vaux and Korsmeuer, 1999).

### 1.3.7. Vias de ativação

Existem duas vias principais de activação do processo apoptótico: a via do receptor ou via extrínseca e a via intrínseca ou mitocondrial, como já referido anteriormente. No entanto, existem evidências que apontam no sentido que as duas vias estão interligadas, e assim, uma pode influenciar a outra (Elmore, 2007).

#### i. Via extrínseca

A via extrínseca é desencadeada pela activação de receptores de membrana da superfamília factor de necrose tumoral (TNF) como o CD95 e o próprio receptor 1 do TNF (TNF-R1). A activação do CD95 ou do TNF-R1, que são receptores com uma porção intracitoplasmática, desencadeia, em regra, a apoptose da célula de uma forma eficaz e rápida. A análise dos complexos proteicos associados aos receptores CD95 e TNF-R1 permitiu caracterizar uma via de sinalização apoptótica representada na figura 3. Resumidamente, a região intracitoplasmática dos receptores contém o “domínio de morte” que pode interactivar, através de uma ou várias proteínas adaptadoras (FADD e TRADD (+) FADD, respectivamente para o CD95 e TNF-R1), com a procaspase-8. A activação do receptor pelo respectivo ligando recruta as moléculas adaptadoras que traduzem o sinal de activação à procaspase-8; uma vez activada, a caspase-8 condiciona a activação de uma cascata de caspases, com o resultado característico de degradação apoptótica. Uma vez conhecida a transmissão do sinal subjacente à activação de caspases, desencadeado pela activação dos receptores CD95 e TNF-R1, este mecanismo adquiriu a dimensão de paradigma da execução apoptótica (Alberts *et al.*, 2004; Elmore, 2007).

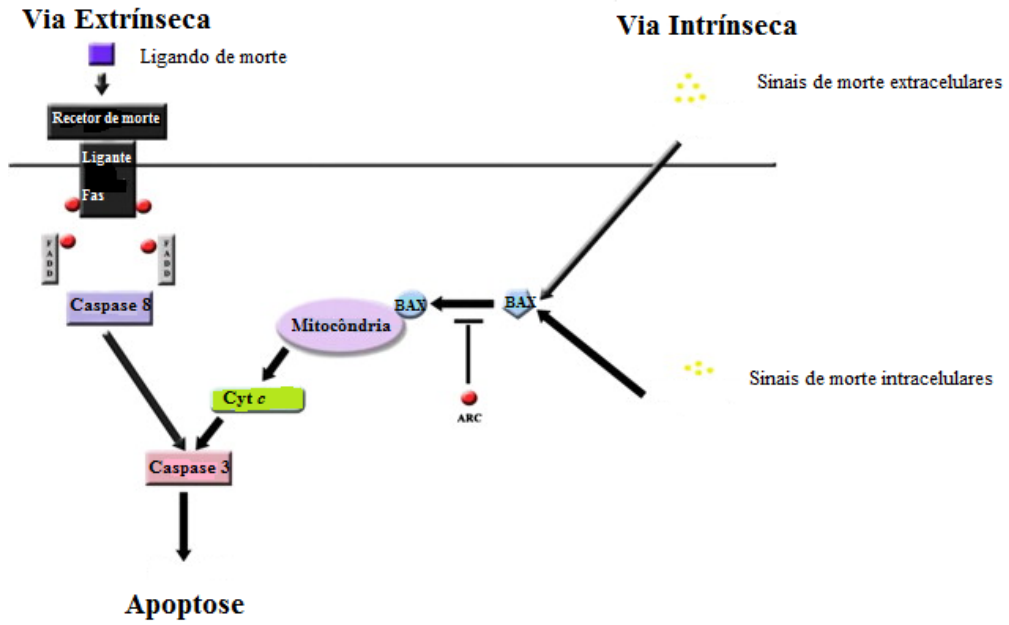
Por exemplo, os fagócitos podem induzir apoptose pela produção de uma proteína denominada ligante Fas, que se liga ao receptor de morte da proteína Fas na superfície da célula-alvo. O conjunto Fas/Fas ligando recruta os adaptadores de proteínas intracelulares que ligam e agregam moléculas de procaspase-8, que clivam e activam uma á outra. As moléculas caspase-8 activadas anteriormente, activam as próximas procaspases para induzirem a apoptose (Alberts *et al.*, 2004).

i. Via Intrínseca

A via intrínseca é activada por diversos estímulos intra ou extracelulares que convergem para a mitocôndria. Por este motivo, a mitocôndria é considerada o principal organelo mediador deste tipo de morte. Este organelo integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente libertação de moléculas pró-apoptóticas (Alberts *et al.*, 2004; Grivicich *et al.*, 2007).

Numa fase inicial observa-se perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi\Delta T_m$ ), geralmente associada à formação de poros que modificam as condições de permeabilidade selectiva das trocas entre a mitocôndria e o citosol. Estas alterações mitocondriais participam no processo apoptótico, constituindo o mecanismo de libertação de factores mitocondriais mediadores de apoptose como o AIF e o cyt *c* (Elmore, 2007).

Em condições de permissividade ao estímulo apoptótico ocorre libertação pela mitocôndria do cyt *c* para o citosol. A presença de factores citosólicos vai se determinante para em conjugação com o cyt *c* induzirem a propagação do estímulo apoptótico. Alguns destes componentes foram caracterizados num complexo que associa o cyt *c* um factor citosólico associado à apoptose, (Apaf-1) e a procaspase-9. A formação deste complexo na presença de adenosina trifosfato (ATP) resulta na activação da caspase-9 e, subsequentemente, de uma cascata de caspases. Há evidência da libertação de outros factores mitocondriais como é o caso de AIF com actividade proteolítica próxima das caspases (Figura 3) (Alberts *et al.*, 2004).



**Figura 3** – Apoptose induzida por via extrínseca e via intrínseca. Adaptado de Ekhterae *et al.*, 2011

## CAPITULO II

### 2.1. APOPTOSE E PATOLOGIAS

A apoptose, além de desempenhar um papel importante no controlo de diversos processos vitais, está também associada a inúmeras patologias (Grivicich *et al.*, 2007).

Um desequilíbrio no mecanismo da PCD, por defeito ou por excesso, pode levar ao desencadeamento de inúmeras patologias na espécie humana. Este tipo de PCD exige, por isso, um processo de regulação muito fino, onde o destino de viabilidade ou de morte é determinado pelo balanço entre as proteínas anti e pro-apoptóticas (Elmore, 2007).

As patologias nas quais a apoptose está envolvida podem ser divididas em dois grupos: as doenças associadas à inibição da apoptose e as doenças associadas à indução da apoptose (Chamond *et al.*, 1999).

Seria um grande avanço na ciência e na história da humanidade reverter a mortalidade associada a uma das grandes doenças, senão a maior do século XXI, o cancro. Várias doenças vão ser abordadas mas talvez o cancro motive um maior investimento no sentido de obtenção de novas terapêuticas. De facto, a supressão da apoptose durante a carcinogénese desempenha uma etapa fundamental no desenvolvimento e progressão do cancro (Elmore, 2007).

Sendo os tumores malignos geneticamente heterogéneos adquirem a capacidade de ultrapassarem os limites impostos às células ditas “normais”. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrolo da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose. Apesar da enorme variabilidade desta patologia, a resistência á apoptose é característica da maioria dos tumores malignos sólidos e hematológicos. Existem múltiplos mecanismos moleculares que as células tumorais utilizam para suprimir a apoptose (Grivicich *et al.*, 2007).

A deficiência da PCD das células também contribui para o desenvolvimento de doenças autoimunes e certas infecções víricas. As doenças autoimunes estão associadas a mutações em genes que tornam os linfócitos resistentes à apoptose e a deleção e supressão clonal dos linfócitos que não são eficazes na resposta imune é fundamental para o bom funcionamento do sistema imunitário. Alguns vírus, como o vírus do papiloma humano (HPV) e o vírus Epstein-Barr são capazes de inibir a apoptose das células infectadas e, assim, perpetuar as células hospedeiras (Chamond *et al.*, 1999).

Pelo contrário, o aumento da apoptose é um componente significativo do aparecimento de certas patologias neurodegenerativas, nomeadamente, a doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP). Estas estão associadas à ocorrência de apoptose selectiva das células neuronais. Por sua vez, esta morte neuronal está associada ao aumento da susceptibilidade à morte celular nestas células, uma vez que se trata de uma população de células de tecidos permanentes, ou seja, sem capacidade mitótica. A doença associada à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) também está relacionada com o aumento da PCD. Tem sido definida como um desequilíbrio entre o número de linfócitos CD<sup>4+</sup> e a capacidade da medula óssea gerar novas células maduras. As células CD<sup>4+</sup> de pacientes com VIH sofrem apoptose quando estimuladas *in vitro*. Além disso, a infecção por VIH de células de indivíduos saudáveis induz a apoptose de células CD<sup>4+</sup> (Elmore, 2007).

Assim sendo, a identificação das alterações da regulação de apoptose pode oferecer a possibilidade de delinear terapias baseadas na natureza molecular da alteração do processo apoptótico. À medida que as vias bioquímicas da apoptose vão sendo mais bem conhecidas surgem novas aplicabilidades e potenciais estratégias terapêuticas. Assim, o estudo da apoptose revela-se importante, não apenas para compreender os mecanismos reguladores fisiológicos normais, mas também para definir quais os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas doenças humanas (Chamond *et al.*, 1999; Elmore, 2007).

### 2.1.1. Cancro

Inúmeros autores descrevem o conceito “cancro”, existindo concordância entre eles. Assim são unânimes a considerar o cancro como uma proliferação anárquica e descontrolada das células de um órgão, multiplicando-se até formarem uma massa tumoral, podendo aumentar de volume nos órgãos regionais e pode também formar colónias tumorais à distância através de um processo designado metastização. Pode afectar pessoas de todas as idades, contudo a incidência de cancro aumenta com a idade (King and Cidlowski, 1998).

É uma patologia causada por anomalias genéticas, uma ou mais mutações no DNA que podem ser herdadas ou adquiridas, e epigenéticas, como por exemplo, acção hormonal e efeitos de promotores tumorais. As alterações genéticas são a condição necessária para a iniciação da doença enquanto as alterações epigenéticas, por si só, não originam cancro (King and Cidlowski, 1998).

As anomalias genéticas encontradas no cancro afectam tipicamente dois tipos de genes: os oncogenes e os genes supressores tumorais. Estes genes contribuem para a patogenia do cancro, pois evadem os mecanismos antitumorais e facilitam a autonomia na replicação. O controlo das actividades normais é feito por muitos diferentes tipos de genes, entre eles os proto-oncogenes (Alberts et al., 2004).

Os oncogenes são proto-oncogenes que sofreram mutações activadoras, ou seja, que passaram a ter hiperexpressão (Alberts et al., 2004).

A sua activação tem um papel importante tanto nos cancros hereditários como nos esporádicos. Uma característica importante é que eles têm efeito dominante na célula, isto é, um único alelo mutado é suficiente para alterar o fenótipo de uma célula normal. As mutações formadoras deste tipo de genes são adquiridas, uma vez que se ocorrerem na linhagem germinativa (mutações herdadas) são letais para o embrião. São vários os tipos de mutações que formam oncogenes, nomeadamente, mutações génicas, mutações

cromossômicas, amplificação gênica e superexpressão gênica (King and Cidlowski, 1998).

Nesta classe destaca-se o gene *Bcl-2*. Este gene codifica uma proteína capaz de inibir a apoptose impedindo a liberação de cyt *c* da mitocôndria, sendo assim designada de proteína anti-apoptótica (Elmore, 2007).

Quando ocorre uma translocação cromossômica específica, um gene de cadeia pesada de imunoglobulinas é translocado do cromossoma 14 para o 18, onde está posicionado o *Bcl-2*. Essa justaposição activa o gene, e assim, há inibição da morte celular, aumentando a sobrevivência da célula. Os linfomas das células B são um exemplo de tumor maligno desta causa resultante. Caracteriza-se como uma doença neoplásica do sistema linfoide que se origina da proliferação clonal de linfócitos B (Vaux *et al.*, 1988).

Os genes supressores tumorais são genes que expressam produtos que regulam negativamente o ciclo celular. Quando mutados deixam de exercer os seus papéis através de processos específicos para cada gene (Alberts *et al.*, 2004).

Nesta classe de genes destaca-se o gene *p53*. As mutações somáticas neste gene são consideradas as alterações genéticas mais frequentes nos tumores malignos humanos, ocorrendo em cerca de 50% das neoplasias, fazendo dele o gene mais comumente alterado.

O gene *p53* codifica uma fosfoproteína nuclear que é responsável pela interrupção do ciclo celular quando há qualquer alteração na sequência de DNA para que o dano seja reparado. Caso o dano seja incorrigível induz a apoptose (Elmore, 2007).

Esta indução pode ser feita através da transcrição de genes executores da apoptose, como o *Bax*. A proteína codificada pelo *Bax* que tem a capacidade de potenciar ou acelerar processos apoptóticos, liga-se à molécula *Bcl-2*, antagonizando-a. Assim, este processo promove a apoptose. Uma rota alternativa pela qual o gene *p53* pode induzir a apoptose é através do aumento dos níveis de ROS. A *p53* induz a expressão de genes que codificam proteínas catalisadoras das reacções de oxidação-redução, gerando ROS,

que induzem a libertação de cyt *c* da mitocôndria provocando apoptose. Por último, a p53 pode induzir a apoptose através da expressão da proteína Fas que activa as caspases (Elmore, 2007).

Assim sendo, a disfunção deste gene faz com que o ciclo celular prossiga mesmo que haja uma mutação no DNA, transmitindo-a às células descendentes, iniciando assim um processo neoplásico, como ocorre na Síndrome de Li-Fraumeni (condição em que ocorre predisposição a desenvolver cancro em vários sítios como mama, colon, entre outros). É uma doença hereditária rara, autossómica dominante que se caracteriza pela ocorrência de vários tumores na mesma pessoa (Varley *et al.*, 1997).

A apoptose na prática clínica é alvo para um potencial uso terapêutico da PCD ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia. A elucidação de alguns mecanismos moleculares da apoptose abriu perspectivas de modulação desses processos. As estratégias baseiam-se em induzir a morte nas células tumorais através do bloqueio de genes com oligonucleotídeos antisense e drogas convencionais, ou ainda substituição da função desses genes com o uso de moléculas recombinantes (Grivicich *et al.*, 2007).

Assim, a compreensão dos mecanismos e a indução de alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do cancro são importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção desta patologia (Grivicich *et al.*, 2007).

### **2.1.2. Doenças autoimunes**

As doenças autoimunes são um tipo de desordem imunológica caracterizada pela diminuição da tolerância aos componentes do próprio organismo, de modo que ocorre uma falha no mecanismo de distinção entre antigénios constituintes do organismo e aqueles externos, como vírus e bactérias. Afectam de 5% a 7% da população mundial, podendo causar grave debilidade nos seus portadores (Goldsby *et al.*, 2007).

Deficiências no mecanismo de apoptose podem contribuir para o início de uma doença autoimune, através da falha da selecção negativa de linfócitos autorreactivos, ou na fase efectora da doença, através de danos dos tecidos-alvo. Porém, a activação em excesso ou supressão total da apoptose pode também ser uma consequência do processo de autoimunidade. O número de células no sistema imune é controlado através do equilíbrio entre mitose e apoptose, sendo regulado por factores de crescimento, hormonas e citocinas durante cada estágio do desenvolvimento do sistema imune (Vaux and Flavell, 2000).

A morte apoptótica de linfócitos que não são eficazes na resposta imune é fundamental para o bom funcionamento do sistema imunitário. Por exemplo, linfócitos que falharam ao rearranjar os seus receptores antigénicos têm que ser eliminados por apoptose. O mesmo ocorre com timócitos que falharam no reconhecimento ao próprio complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (selecção positiva), ou que reconheceram fortemente antigénios próprios (selecção negativa). Além de que também é importante a morte por apoptose das células efectoras após o término da resposta imune (Nossal, 1994).

Células do sistema imune podem influenciar a sobrevivência umas das outras, bem como de outros tipos de células, através da libertação de citocinas que promovem a persistência ou a morte celular. Linfócitos T citotóxicos e células “natural killer” (NK) podem eliminar-se, bem como eliminar células infectadas, através do mecanismo de apoptose, através da libertação de ligantes do receptor do TNF e pela libertação de grânulos citotóxicos, respectivamente (Kagi *et al.*, 1994).

Evidências genéticas têm sugerido que falhas em genes que regulam a apoptose podem levar ao desenvolvimento de diversas patologias autoimunes. Além do cancro, a inibição da apoptose pode também resultar em doenças tais como, a síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS) que se define por um defeito na apoptose induzida pela produção da proteína ligante Fas, que por sua vez leva a uma desregulação da homeostase dos linfócitos. Caracteriza-se por adenopatias crónicas não malignas e/ou esplenomegalia associadas á expansão anormal de um grupo raro de linfócitos T no

sangue periférico e tecidos. Está associado principalmente a mutações heterozigóticas no gene codificador da proteína ligante Fas (TNFRSF6) (Worth *et al.*, 2006; Vaux and Flavell, 2000).

Algumas das doenças comuns de ALPS incluem anemia hemolítica, anemia hemolítica imuno-mediada, trombocitopenia e neutropenia autoimune. Os diferentes tipos são causados por mutações diferentes mas todas elas envolvidas na sinalização mediada pela proteína ligante Fas. A anemia hemolítica resulta a partir de uma mutação no receptor de morte da proteína Fas. A imuno-mediada a partir de uma mutação na proteína ligante Fas. Por último, a trombocitopenia e neutropenia autoimune resultam a partir de mutações na caspase- 10 que impedem a transdução do sinal pela via apoptótica, reduzindo assim a sua actividade e consequentemente inibindo a eliminação de linfócitos por apoptose (Elmore, 2007).

### **2.1.3. Infecções Víricas**

Após penetrarem na célula, os vírus tentam fazer com que esta produza apenas as proteínas necessárias à sua proliferação, o que vai induzir muitas células à morte. A multiplicidade de efeitos estruturais e bioquímicos que os vírus produzem na célula hospedeira são designados de efeitos citopátogénicos virais. As infecções por vírus eventualmente resultam na morte da célula hospedeira e consequentemente, o vírus é também eliminado. As causas da morte incluem lise celular, alterações à membrana superficial da célula e apoptose (Goldsby *et al.*, 2007).

Muitos vírus desenvolvem estratégias anti-apoptóticas, produzindo proteínas capazes de inactivar o gene *p53* ou estimular maior expressão do gene *Bcl-2*, como por exemplo, o HPV e o vírus Epstein-Barr (Renehan *et al.*, 2001).

O HPV é um vírus que infecta os queratinócitos da pele ou mucosas, e possui muitas variações diferentes. A maioria dos subtipos está associada a lesões benignas, tais como verrugas, mas em certos tipos são encontradas algumas neoplasias. A principal forma de transmissão do HPV é por via sexual. A maioria das situações não apresenta sintomas

clínicos, mas algumas desenvolverão alterações que podem evoluir para cancro (Ferreira and Sousa, 2002).

De uma forma geral, o HPV possui no seu genoma vários genes que são expressos numa fase inicial (“early genes”). Alguns destes, concretamente os genes *E6* e *E7*, foram classificados como oncogenes pela sua capacidade de induzir a transformação maligna das células infectadas. *E6* e *E7* codificam oncoproteínas que têm como alvo a p53. A p53 tem a capacidade de desencadear a apoptose em casos de dano extenso. Basicamente, os genes *E6* e *E7* induzem a proliferação celular e inibem a apoptose (Bolt *et al.*, 2006).

O vírus Epstein-Barr infecta linfócitos B, que possuem receptores específicos. Normalmente, a infecção é assintomática mas em certos indivíduos aparecem manifestações clínicas agudas. Este vírus produz proteínas que induzem a produção da Bcl-2 na célula hospedeira. Esta tem a capacidade de inibir a apoptose, ao bloquear a libertação do cyt *c* da mitocôndria (Kelly *et al.*, 2009).

#### **2.1.4. Doença de Alzheimer**

A morte prematura de células neuronais está associada ao aparecimento de patologias neurodegenerativas, como a DA. É uma doença na qual as células do sistema nervoso central (SNC) sofrem um processo de morte mais acelerado do que o normal, provocando uma perda de função relacionada com os locais onde essa perda é maior. Na fase inicial da doença esta perda de células atinge localizações cerebrais onde a memória recente é processada (Shimohama, 2000).

As células do hipocampo usam a acetilcolina como mediador. A redução da síntese deste neurotransmissor faz com que esses neurónios não sejam activados e não cumpram a sua função, dando origem à perda de memória. É na sua maioria uma doença não-hereditária, ou seja, esporádica, relacionada com o envelhecimento, no entanto, em alguns casos, a doença é herdada de forma autossómica dominante. Embora

possa manifestar-se em idades mais precoces, a sua incidência aumenta de uma forma exponencial a partir dos 65 anos de idade (Shimohama, 2000).

É a mais comum doença neurodegenerativa, sendo responsável pela maior parte dos casos de demência na população idosa, além de provocar distúrbios que podem levar a um prejuízo severo e, finalmente, à morte. Caracteriza-se pela deterioração progressiva da memória e cognição, em associação com a presença de placas senis, onde se verifica o acúmulo da proteína  $\beta$ -amilóide, emaranhados neurofibrilares, onde se verifica uma acumulação da microtubulina tau, que ao estar anormalmente fosforilada é menos capaz de polimerizar a tubulina e acaba por provocar uma ruptura do citoesqueleto celular e por consequência morte neuronal. A apoptose é uma característica comum nos cérebros dos pacientes que sofrem deste mal (Shimohama, 2000).

Actualmente os factores genéticos são considerados preponderantes na etiopatogenia da DA entre diversos factores relacionados. Além do componente genético, foram apontados como agentes etiológicos, a toxicidade por agentes infecciosos e a ocorrência de danos em microtúbulos e proteínas associadas (Shimohama, 2000).

Existem 4 genes que estão implicados na etiologia da DA, o gene da Proteína Precursora de Amilóide (APP), da Presenilina 1 e da Presenilina 2 e Apolipoproteína E. O gene da APP, da presenilina 1 e 2 é responsável por DA, geralmente com idade de início precoce. Estes genes sofrem mutações que causam alterações nas proteínas por ele codificadas, influenciando o aparecimento da patologia. Estes casos genéticos correspondem a uma pequena percentagem dos casos e os portadores destes genes vão muito provavelmente adquirir a doença. São genes autossómicos dominantes, o que quer dizer que em todas as gerações deverão existir casos de doença (Shimohama, 2000).

Nos casos mais frequentes de DA de início mais tardio, existe um factor de risco genético constituído pela presença do alelo  $\epsilon 4$  do gene da apolipoproteína (APO $\epsilon 4$ ). Isto quer dizer que os portadores deste gene não vão ter obrigatoriamente a doença, mas têm um risco maior do que os não-portadores. O estudo dos genes relacionados com a

fisiopatologia da doença é imprescindível, gerando expectativas da identificação precoce de indivíduos sob alto risco de desenvolver a doença (Shimohama, 2000).

A APP sofre uma clivagem após a sua síntese, dando origem ao fragmento denominado proteína  $\beta$ -amilóide, que se apresenta como um péptido de 36 a 43 aminoácidos. Este fragmento é mais amilogénio do que a proteína original, pois tem a propriedade de agregação proteica na parte extracelular dos neurónios. Portanto, uma vez que se encontra em quantidade maior do que o normal, a sua acumulação resulta na formação de fibras amilóides gerando as placas senis e essa deposição está associada ao quadro demencial (Ethell and Buhler, 2003).

A presenelina 1 e a presenelina 2, estruturalmente bastante semelhantes entre si, são proteínas de membrana que actuam no transporte celular. A presenelina 1 está relacionada com o processo inflamatório observado na placa amilóide e interfere no processo de apoptose através da interacção com caspases. Mutações na presenelina 2 aceleram o processo de neurodegeneração (Shimohama, 2000).

Os estudos, bioquímicos e estruturais, das placas neuríticas e dos emaranhados neurofibrilares sugerem que um dos principais factores da morte dos neurónios tem a ver com o processamento da APP. As alterações do gene da APP ou das presenelinas 1 e 2 provocam um desvio do processamento da APP no sentido da formação dos oligómeros insolúveis e tóxicos. A deposição de  $\beta$ -amilóide no cérebro desencadeia a apoptose por activação de uma cascata iniciadora, conduzindo à lesão cerebral que está na origem dos sinais e sintomas da doença (Ethell and Buhler, 2003).

A deposição de  $\beta$ -amilóide induz a apoptose pelo aumento do *stress* oxidativo, ou pode desencadear a produção da proteína ligante Fas, que se liga ao receptor de morte da proteína Fas na superfície das células neuronais ou células da glia. Consequentemente, é activada a cascata apoptótica e leva as células à morte. Pode também desencadear a activação do TNF-R1, receptor com uma porção intracitoplasmática que induz a apoptose da célula de uma forma rápida (Ethell and Buhler, 2003).

### 2.1.5. Doença de Parkinson

A DP é uma patologia neurodegenerativa progressiva. A média de idade para a ocorrência da DP é de 55 anos, sendo que o seu risco de desenvolvimento aumenta em cinco vezes por volta dos 70 anos de idade (Hald e Lotharius, 2005).

É caracterizada pela ocorrência de distúrbios de movimento, balanço e alterações do controle motor fino, todos com características incapacitantes. Os sinais clínicos mais evidentes são caracterizados por anormalidades motoras irreversíveis que incluem rigidez muscular, tremor em repouso, fraqueza muscular, instabilidade postural e escassez de movimentos voluntários. Esses sinais resultam da perda de neurónios dopaminérgicos de uma região em particular, localizada no mesencéfalo, denominada substância negra. A redução na densidade neuronal dessa população celular gera uma diminuição na projecção de fibras dopaminérgicas que afrentam o estriado dorsal causando por sua vez, uma consequente redução dos níveis de dopamina nessa estrutura dos núcleos da base (Hald and Lotharius, 2005).

A DP, assim como outras doenças neurodegenerativas não possui etiologia conhecida. Porém, observa-se correlação entre a ocorrência de doença e mutações num pequeno número de genes. Muito embora os pacientes com etiologia claramente genética não sejam os mais comuns, a descoberta de genes relacionados com a DP tem contribuído para o esclarecimento da fisiopatologia da doença, possibilitando desvendar a cadeia de eventos relacionados ao processo neurodegenerativo, bem como a forma como os factores ambientais interagem com os factores genéticos, predispondo à morte neuronal (Hald and Lotharius, 2005).

Dados originados nas últimas décadas por estudos clínicos, autópsias e experiências *in vivo* e *in vitro* com modelos animais, tem possibilitado alguma compreensão sobre a patogénese da doença. As hipóteses explicativas da fisiopatologia da DP incluem: defeitos conformacionais na estrutura de proteínas citoplasmáticas e disfunções mitocondriais com consequente aumento do *stress* oxidativo, resultando na morte

neuronal. Mas, existem outros factores a serem considerados como a excitotoxicidade, neuroinflamação e eventos apoptóticos (Singh and Dikshit, 2007).

Estudos com modelos experimentais da DP, bem como estudos *in vitro* de várias linhagens celulares demonstram o envolvimento da apoptose, relacionada com o *stress* oxidativo como na mitocôndria acarretando a neurodegeneração dos neurónios dopaminérgicos (Singh and Dikshit, 2007).

Classicamente o *stress* oxidativo é descrito como um desequilíbrio entre a formação e a eliminação de ROS e espécies reactivas de nitrogénio (RNS). As ROS e as RNS são as principais causas do *stress* oxidativo no SNC. O SNC é especialmente sensível a eventos geradores de *stress* oxidativo devido às suas características fisiológicas e anatómicas. (Barnham *et al.*, 2004; Emerit *et al.*, 2003).

A disfunção mitocondrial tem sido relacionada com a patogénese da DP. Aproximadamente 100% do oxigénio molecular é consumido pela respiração mitocondrial formando como subprodutos espécies oxidantes. Neste sentido, a inibição do complexo I aumenta a produção de superóxidos, que formam radicais ou reagem com o óxido nítrico (NO) formando peroxinitritos. Estes causam danos celulares por reagirem com ácidos nucleicos, proteínas e lípidos. Neurónios dopaminérgicos podem favorecer o ambiente para a produção de ROS. A deficiência energética relacionada à mitocôndria pode levar ao rompimento de vesículas, aumentando a sua concentração no citosol ocasionando danos em macromoléculas. As ROS e RNS estão envolvidas em processos apoptóticos e em mecanismos de excitotoxicidade (Kokoszka *et al.*, 2001).

Evidências têm demonstrado o envolvimento do NO na degeneração de neurónios dopaminérgicos. O NO é um neurotransmissor que em certas condições pode actuar como radical livre de vida curta altamente permeável nas membranas biológicas e por ser uma molécula volátil, tendo sido implicado em várias condições fisiológicas e patológicas, incluindo na morte celular (Duncan and Heales, 2005; Iravani *et al.*, 2002).

O NO é uma molécula sinalizadora que regula o consumo de oxigénio pela mitocôndria bem como a produção de ROS. Na DP existem evidências de que o alvo do NO e dos seus metabólitos seja a mitocôndria, onde essas moléculas levam à inibição da cadeia respiratória. Nesta patologia o NO em altas concentrações induz a morte celular por apoptose (Singh and Dikshit, 2007).

Entre os efeitos citotóxicos do NO estão: mutação no DNA, acumulação do gene *p53*, além da indução da libertação da *cyt c* pelas mitocôndrias com consequente activação de caspases. Deste modo, o NO tem um papel crucial no balanço entre a proliferação e a apoptose (Kim *et al.*, 2001; Singh e Dikshit, 2007).

### **2.1.6. Síndrome da imunodeficiência adquirida**

O VIH, pertence à família dos retroviridae sendo responsável pelo síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Existem pelo menos duas sub-categorias de vírus, o VIH-1 e o VIH-2. Estes diferem entre si nas características clínicas das infecções associadas, no período de latência, na capacidade de transmissão e na localização geográfica. As principais formas de contágio de VIH são o contacto com secreções genitais infectadas, por meio de relações sexuais ou por via parentérica por sangue ou derivados contaminados, por transmissão vertical e mais remotamente pelo aleitamento materno (Ferreira and Sousa, 2002).

O VIH tem tropismo para monócitos, macrófagos e linfócitos CD4<sup>+</sup>. A replicação viral nestas células vai destruí-las ou alterar o seu funcionamento, o que resulta numa redução da eficácia da resposta imunológica. A sua enorme capacidade de gerar mutantes, devido aos erros cometidos pela transcriptase reversa (TR) viral durante o ciclo replicativo, e a produção de partículas virais por parte dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados, conduzem à ineficácia do sistema imunológico no combate ao vírus (Ferreira and Sousa, 2002).

As partículas virais exibem estrutura esférica e estão circundadas por um invólucro de natureza lipídica, onde está fixa a gp41, que é uma glicoproteína transmembranar, que

sustenta na sua extremidade N-terminal a glicoproteína de superfície gp120. Estas duas glicoproteínas medeiam o processo de penetração nas células alvo. A gp120 liga-se especificamente ao CD4<sup>+</sup> e aos receptores das quimiocinas. Após esta etapa a gp41, por meio do péptido de fusão, interage com a membrana citoplasmática modificando-a para dar início ao processo de fusão (Ferreira and Sousa, 2002).

O genoma do vírus é codificado por uma molécula simples de ácido ribonucleico (RNA) que codifica 16 proteínas diferentes. Estas proteínas, que derivam dos genes *gag* (group specific antigen), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), são componentes estruturais e enzimáticos requeridos por todas as retrovíroses. Além destas proteínas, o VIH codifica também duas proteínas reguladoras, através do gene *tat* e do gene *rev*. O vírus contém ainda quatro genes que codificam as proteínas denominadas de acessórios, Nef (“negative effector”), Vif (“viral infectivity factor”), Vpr e Vpu (proteínas virais r e u, respetivamente) (Frankel, 1998).

Logo após a descoberta do síndrome associado à infecção pelo VIH, tornou-se claro que a cápside deste vírus possuía uma elevada afinidade para o receptor CD4<sup>+</sup>. Assim, este facto foi prontamente relacionado com a capacidade que o vírus tem de se replicar nas células T CD4<sup>+</sup>, provocando, posteriormente, a sua morte. Como os linfócitos T CD4<sup>+</sup> desempenham um dos principais mecanismos efetores da imunidade anti-viral, foi inicialmente proposto que a imunodeficiência associada à infecção pelo VIH, resulta directamente da morte das células (Frankel, 1998).

Nos mecanismos que está envolvido o aumento da taxa apoptótica dos linfócitos T infectados com o VIH, podemos incluir: morte directa das células infectadas após expressão dos genes virais; morte das células não infectadas, promovida pelas proteínas virais que são libertadas por células infectadas; alteração da expressão das moléculas reguladoras do processo apoptótico nos linfócitos T (Geugeon, 2003).

Como já foi referido anteriormente, o processo apoptótico é um mecanismo altamente regulado de PCD, sendo essencial para a manutenção de uma população estável de linfócitos, de forma a controlar o fluxo contínuo de novos linfócitos bem como a

homeostasia e proliferação desta linha celular. Por outro lado, é essencial para o organismo, após uma resposta imunitária contra um determinado antigénio pois elimina a maioria dos linfócitos activados durante o processo, de forma a evitar os processos de autoimunidade (Geougeon, 2003).

Para além da proteína env, o VIH codifica outras proteínas que, *in vitro*, possuem a capacidade de desencadear os mecanismos apoptóticos tanto das células infectadas como das não infectadas. De facto, verificou-se que a via apoptótica intrínseca pode ser desencadeada pela proteína Vpr, provocando um rápido alteração do potencial transmembranar da mitocôndria e, como consequência, a libertação do cyt *c* e a indução de PCD (Jacotot *et al.*, 2000).

Por outro lado, os vários estudos efectuados demonstram que a proteína Tat induz a maquinaria apoptótica através da inibição da expressão do protooncogene *Bcl-2*, num processo acoplado à activação da caspase-8. Além disso, a simples ligação da glicoproteína viral gp120 ao receptor CD4 dos linfócitos T, também promove a inibição da expressão do *Bcl-2*, contribuindo desta forma para o processo apoptótico resultante do colapso energético da célula associado à libertação do cyt *c*. Alguns estudos demonstram que a degradação proteolítica da *Bcl-2*, é outro dos factores que contribuem para a iniciação do processo apoptótico nos linfócitos infectados (Westendorp *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995).

A influência do VIH na via apoptótica extrínseca (através da estimulação dos receptores apoptóticos), foi documentada quer em células infectadas quer em células não infectadas. De facto, verificou-se que a formação do complexo gp120-CD4 promove a activação da via apoptótica inerente ao receptor Fas, verificando-se ainda que, nos linfócitos T infectados, a expressão da proteína Nef promove a co-expressão do ligando Fas na sua membrana. Deste modo, as células que co-expressam a molécula Fas são potencialmente capazes de provocar a morte celular de linfócitos T não infectados. De forma semelhante, a proteína Tat, que é expressa nas células infectadas, promove a indução da síntese proteica de CD95 em células não infectadas, aumentando assim a sua susceptibilidade para a via apoptótica inerente a este receptor (Herbein *et al.*, 1998).

Assim, é claramente visível que os dados científicos recolhidos mostram que o VIH possui mecanismos para manipular e controlar vias apoptóticas das células, permitindo escapar ao sistema imunitário do hospedeiro e provocar a sua progressiva destruição (Gougeon, 2003).

## CONCLUSÃO

Para além do que foi discutido ao longo desta dissertação outros aspectos podiam ter sido abordados, no entanto, optou-se pela informação que se pensa ser mais importante. Torna-se difícil restringir o projecto a um só tema, uma vez que existe uma grande variedade de informação e, de igual forma se torna muito complexo criar algo inteiramente novo, onde não exista confronto de informação.

Relativamente à PCD, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. É um fenómeno altamente organizado que se desencadeia de forma não acidental, induzido por uma infinidade de estímulos caracterizado por um desencadear de processos bioquímicos específicos e por ocorrerem alterações morfológicas em células individualizadas. Necessita de energia e síntese proteica para a sua execução e realiza-se em diversas etapas (Grivich *et al.*, 2007).

Muitas patologias, apresentam um desequilíbrio na indução do mecanismo da PCD. Alguns estudos demonstram que existe uma ligação entre determinadas doenças e o facto de existir inibição ou indução da morte programada das células (Chamond *et al.*, 1999). No futuro, é pertinente aprofundar estes dados, identificando polimorfismos associados a doenças, que também estão associadas à PCD. A identificação destes mecanismos permitirá o desenvolvimento de terapias dirigidas à prevenção e combate dessas doenças.

Se o processo apoptótico for controlado e as vias bioquímicas envolvidas estiverem esclarecidas dominando-se o processo apoptótico, as doenças neurodegenerativas poderiam vir a ser minimizadas, ou pelo contrário, induzindo o processo apoptótico, as células tumorais poderiam ser suprimidas.

Desta forma, conclui-se que a apoptose na prática clínica constitui um alvo de potencial de uso terapêutico. Faz sentido pensar-se neste fenómeno como meio no combate a uma

das grandes doenças do século, o cancro. A compreensão dos mecanismos apoptóticos permitirá o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento desta patologia. Tais estratégias são focadas na indução da morte das células tumorais e numa maior resposta aos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos (Grivicich *et al.*, 2007).

## BIBLIOGRAFIA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. (2004). *Biologia Molecular da Célula*. 4ed. Porto Alegre : Artes Médicas, pp.983-1026.

Anazetti, M.C., Melo, P.S. (2007). Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, 1 (1), pp.37-58.

Barnham, K.J., Masters, C.L., Bush, A.L. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 3(3), pp.205-214.

Castro, A., Lemos C., Falcão A., Glass N.L., Videira A. (2008). Increased resistance of complex I mutants to phytosphingosine-induced programmed cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), pp.19314-19321.

Castro, A., Lemos C., Falcão A., Fernandes A.S., Glass N.L., Videira A. (2010). Rotenone enhances the antifungal properties of staurosporine. *Eukaryot Cell*, 9(6), pp.906-914.

Chamond, R., Añón, J., Aguilar C., Pasadas, F. (1999). Apoptosis and disease. *Alergol Inmunol Clin*, 14(6), pp. 367-374.

Cheng, W.C., Leach K.M., Hardwick J.M. (2008). Mitochondrial death pathways in yeast and mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1783(7), pp.1272-1279.

Cohen, G.M. (1997). Apoptosis and Necrosis in Toxicology: A Continuum or Distinct Modes of Cell Death? *Pharmacology and Therapeutics*, 75, pp.153-177.

Danial, N.K., Korsmeurer S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), pp.205-219.

Debatin, K.M., Friesen, C., Kiess, Y. (2004). A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Nature Publishing Group, Cell Death and Differentiation*, (11), pp.73-85.

Domingos, P.M., Steller, H. (2007). Pathways regulating apoptosis during patterning and development. *Curr Opin Genet Dev*, 17(4), pp.294-299.

Duncan, A.J., Heales, S.J. (2005). Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med*, 26(1-2), pp.67-96.

Ekhterae, D., Hinmon, R., Matsuzaki, K., Noma, M., Zhu, W., Xiao, R.P., Gorman, R.C., Gorman III, J.H. (2011). Infarction Induced Myocardial Apoptosis and ARC Activation. *Cardiothoracic*, 166, pp.59-67.

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

Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 58(1), pp.39-46.

Ethell, D.W., Buhler, L.A. (2003). Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J Clin Immunol*, 23(5), pp.363-370.

Ferreira, W., Sousa, J. (2002). *Microbiologia. Lidel*, 3vol.

Frankel, A.D., Young, J.A. (1998). VIH-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, 67, pp.1-25.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., Kuby, J. (2007). *Immunology. 6ed. Garland Publishing*, pp.4101-4106.

Gougeon, M.L. (2003). Apoptosis as an VIH strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol*, 3(5), pp.392-404.

Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A.B. (2007). Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53 (3), pp.335-343.

Hald, A., Lotharius, J. (2005). Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol*, 193(2), pp.279-290.

Iravani, M.M., Kashefi, K., Mander, P., Rose, S., Jenner, P. (2002). Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience*, 110(1), pp.49-58.

Jacotot, E., Ravagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K.F., Vieira, H.L., Zamzami, N., Costantini, P., Druillennec, S., Hoebeke, J., Briand, J.P., Irinopoulou, T., Daugas, E., Susin, S.A., Cointe, D., Xie, Z.H., Reed, J.C., Roques B.P., Kroemer, G. (2000). The VIH-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med*, 191(1), pp.33-46.

Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., Golstein, P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 265(5171), pp.528-530.

Kannan, K., Jain, S.K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(27), pp.153-163.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide Ranging Implications In Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, pp.239-256.

Kiechle, F.L , Zhang, X. (2002). Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta*, 326, pp.27-45.

Kim, P.K., Zamora, R., Petrosko, P., Billiar, T.R. (2001). The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol*, 1(8), pp.1421-1441.

Kokoszka, J.E., Coskun P., Esposito, L.A., Wallace, D.C. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(5), pp.2278-2283.

King, K.L., Cidlowski, J.A. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60, pp.601-617.

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., ZVIHotovsky B., Melino G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1), pp.3-11.

Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V., Pardee, A.B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by VIH-1 Tat protein. *Science*, 268(5209), pp.429-431.

Nossal, G.J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell*, 76(2), pp.229-239.

Shimohama, S. (2000). Apoptosis in Alzheimer's disease--an update. *Apoptosis*, 5(1), pp.9-16.

Shearwin-Whyatt, L.M., Kumar, S. (1999). Caspases in developmental cell death. *IUBMB Life*, 48(2), pp.143-150.

Singh, S., Dikshit, M. (2007). Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain Res Rev*, 54(2), pp.233-250.

Skulachev, V.P. (2000). Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". *IUBMB Life*, 49(5), pp.365-373.

Twomey, C., McCarthy J.V. (2005). Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med*, 9(2), pp.345-359.

Varley, J.M., Evans D.G., Birch, J.M. (1997). Li-Fraumeni syndrome - a molecular and clinical review. *BR J Cancer*, 76(1), pp.1-14.

Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189), pp.440-442.

Vaux, D.L., Flavell, R.A. (2000). Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 12(6), pp.719-724.

Vaux, D.L., Korsmeyer S.J. (1999). Cell death in development. *Cell*, 96(2), pp.245-254.

Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M., Krammer, P.H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by VIH-1 Tat and gp120. *Nature*, 375(6531), pp.497-500.

Worth, A., Thrasher, A.J., Gaspar, H.B. (2006). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol*, 133(2), pp.124-140.