

Apoptose: quando a célula programa a própria morte



Batizado de apoptose, o suicídio celular programado tem papel importante em diversos processos vitais e em inúmeras doenças. Sua investigação pode ajudar a desenvolver novas terapias e medicamentos. (Maria de Fátima Horta John Ding-E Young)

Até recentemente os cientistas acreditavam que as células só morriam quando agredidas por fatores externos, por um processo chamado necrose. Agora, sabe-se que existe outra forma: o suicídio celular programado, necessário para eliminar células supérfluas ou defeituosas.

Esse fenômeno biológico, batizado de apoptose, tem papel importante em diversos processos vitais e em inúmeras doenças e sua investigação pode ajudar a desenvolver novas terapias e medicamentos.

Idéias como morte e autodestruição são sempre sinistras e trágicas. Sempre? Se mudarmos o ponto de vista, veremos que não, pois na natureza tais conceitos podem muitas vezes significar a vida. Por mais cruel que pareça, o extermínio dos indivíduos mais fracos de uma espécie por predadores ou por morte espontânea daqueles que têm defeitos letais — ou seja, a sobrevivência dos mais aptos — ajuda essa espécie a se perpetuar forte e sadia. Esse mecanismo de seleção ocorre também em níveis menos visíveis, como o das células.

Muitas células de um organismo morrem para que o conjunto sobreviva. Assim como é preciso gerar novas células para manter processos vitais, é imprescindível eliminar as supérfluas ou defeituosas. No indivíduo adulto, se a multiplicação das células não é compensada de modo preciso por perdas, os tecidos e órgãos crescem sem controle, o que pode levar ao câncer. O que estudos recentes revelaram, porém, é que muitas células carregam instruções internas para "cometer suicídio" no momento em que não são mais úteis ao organismo. Tais instruções são executadas, como um programa, quando certos comandos são acionados.

Essa morte programada só atraiu o interesse dos cientistas nos últimos anos, mas sua compreensão já avançou muito. A morte de células já era conhecida há muito tempo, mas acreditava-se que era sempre prejudicial ao organismo. Hoje, ao contrário, sabe-se que seres pluricelulares só atingem sua forma final porque eliminam de modo seletivo certo número de células. A rã e os insetos são exemplos bem familiares. A rã inicia a vida como girino, forma adaptada ao ambiente aquático. Depois, ganha outras estruturas para viver em terra e ao mesmo tempo ter nadadeiras, guelras e a cauda. Essas perdas decorrem da morte das células. Nos insetos, a mudança de larva para animal adulto (de lagarta para borboleta, por exemplo) exige a morte de milhões de células.



Outros exemplos são menos visíveis. Durante a fase embrionária de todos os vertebrados, certos neurônios devem enviar projeções longas e finas (axônios) até um músculo, que irá controlar. Se um neurônio não faz essa ligação ou a faz de modo inadequado, está fadado a morrer. A formação da mão humana segue processo semelhante. No início, é um apêndice arredondado, sem dedos definidos. Estes são formados pela multiplicação de algumas células, enquanto as que estão nos espaços entre eles recebem o comando para morrer. Se isso não ocorresse, os dedos de nossas mãos seriam ligados por uma membrana, como nos patos.

Necrose: a célula como vítima

Nos exemplos dados, a morte das células é um processo fisiológico normal, totalmente regulado. Mas as células também morrem de modo não-fisiológico, o que causa a maioria das doenças. A morte é patológica ou "acidental" quando a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como temperaturas extremas, radiação, traumas, produtos tóxicos e falta de oxigênio (como no infarto do miocárdio e na gangrena). As lesões podem ter ainda origem biológica, como nas infecções por bactérias ou vírus. Esse tipo de morte celular, o único conhecido pelos cientistas mais antigos, é chamado de necrose.

A necrose é claramente visível por microscopia eletrônica: a célula incha e as organelas do citoplasma, em particular as mitocôndrias, são danificadas, mas o núcleo não sofre alterações significativas. Tais lesões impedem o controle do equilíbrio interno: a água e alguns íons (em especial sódio e cálcio), normalmente bombeados para fora, fluem livremente para dentro da célula, que incha e se rompe.

A ruptura libera no tecido vizinho o conteúdo celular, rico em proteases (enzimas que "cortam" outras proteínas) e outras substâncias tóxicas. Além da toxicidade direta para as células vizinhas, o derrame gera substâncias que atraem células do sistema imune, causando intensa reação inflamatória: alguns tipos de glóbulos brancos (em especial neutrófilos e macrófagos) convergem para o tecido em necrose e ingerem as células mortas. A inflamação, típica da necrose, é importante para limitar infecções e remover restos de células, mas a atividade e as secreções dos glóbulos brancos podem também danificar tecidos normais vizinhos, às vezes de maneira devastadora.

Apoptose: o suicídio silencioso

A morte celular fisiológica é totalmente distinta da necrose. Em primeiro lugar, a célula não incha. Ao contrário, encolhe-se, destaca-se das células vizinhas e começa a apresentar bolhas em sua superfície (processo chamado de zeiose). A membrana e as organelas mantêm sua



estrutura intacta e não há alterações evidentes no citoplasma. O núcleo, porém, sofre mudanças dramáticas: normalmente dispersa, a cromatina (conjunto dos cromossomos, que contêm o material genético) forma um ou mais aglomerados nas bordas internas da membrana nuclear. Isso basta para levar as células à morte. As que demoram a morrer podem sofrer outras mudanças: o núcleo parte-se e a célula também divide-se em estruturas ("corpos apoptóticos") contendo porções do núcleo, tomando uma forma inconfundível ao microscópio eletrônico.

Em 1972, o australiano John Kerr e os colaboradores escoceses Andrew Wyllie e Alastair Currie descreveram os diferentes aspectos das células na morte programada e na patológica. Para distingui-los, batizaram o primeiro de "apoptose", em oposição à necrose. Em grego arcaico, a palavra apoptose significa "o ato de cair", como caem as pétalas das flores e as folhas das árvores no outono, e foi escolhida porque sugere perdas (a morte celular, no caso) benéficas, necessárias ao bom funcionamento e à sobrevivência do organismo.

Após outros estudos, os cientistas sugeriram que a morte celular programada ocorre não só durante o desenvolvimento, mas também em organismos maduros, ao longo da vida. Também sugeriram que na apoptose, ao contrário do que acontece na necrose, a célula participa da própria destruição, e que poderia haver ligação entre a ativação do suicídio celular e doenças degenerativas (como o mal de Alzheimer) e entre sua inibição "incorreta" e doenças replicativas (como o câncer).

Uma característica marcante é que a apoptose é "silenciosa". Não há, como na necrose, o "alvorço" da inflamação. Em geral, as células apoptóticas são as reconhecidas por macrófagos (um tipo de glóbulo branco presente em todos os tecidos) e ingeridas antes que se desintegram. Isso evita o derrame do conteúdo celular e, assim, não há inflamação e lesão do tecido, garantindo o seu funcionamento normal.

Fato interessante é que certas células apoptóticas não são removidas logo, continuando no local às vezes por toda a vida. É o caso dos queratinócitos, células da camada externa da pele. Ao migrar de camadas mais profundas para a superfície, eles morrem por apoptose, mas no processo substituem seu conteúdo pela proteína queratina e ganham uma "capa" impermeável. Assim, a camada protetora mais externa da pele é feita de células mortas, descamadas e trocadas por outras a cada 21 dias, em média. O cristalino (a lente) dos olhos também é formado por células mortas, que substituíram a maior parte de seu citoplasma por proteínas denominadas cristalinas.

As idéias inovadoras geradas pelo grupo de Kerr no início da década de 1970 passaram despercebidas por mais de uma década, até que suas previsões começaram a ser confirmadas. Hoje, inúmeros cientistas pesquisam a apoptose e, embora muitas questões continuem sem resposta, vários princípios básicos já foram descobertos.



As "armas" usadas pelas células

Certas proteases, recentemente chamadas de caspases (nome derivado de cisteína-protease que cliva — "corta" — após resíduos de ácido aspártico) têm papel central na apoptose, em todo o tipo de célula e em todo o organismo multicelular já estudado. A primeira enzima dessa família descrita em mamíferos foi a ICE (interleukin-1 β converting enzyme), hoje caspase 1. O que levou à identificação da ICE foi sua função de ativar a interleucina-1 β , proteína importante no sistema imune, mas depois ela atraiu maior atenção por seu papel na apoptose.

Outras enzimas, com características semelhantes, foram identificadas depois: a família já tem quatorze integrantes. De início, atribuiu-se à caspase 1 um papel primordial na apoptose, mas estudos recentes, com camundongos "nocautes" para essa enzima (que não a produzem), mostraram que várias formas de apoptose ocorrem na sua ausência. Em alguns casos, no entanto, a caspase 1 é preponderante. Uma caspase pode clivar outras e esse "corte" parece ser essencial à ativação dessas enzimas. Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outras, em seqüência, até gerar uma caspase executora. Esta destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose. Todos os casos levam à morte celular.

Vários experimentos em laboratório sugerem uma hierarquia na ativação das caspases, mas essa hierarquia e as caspases envolvidas podem diferir, dependendo do modo de indução da apoptose. A caspase 8 ou a caspase 10, dependendo do tipo de estímulo que a célula recebe, são fortes candidatas a caspases iniciadoras, e há indícios de que, em geral, a ativação da caspase 3 e da caspase 7 precede a ativação da caspase 6 (caspases executoras).

Decifrando o programa letal

Na grande maioria das células em apoptose observa-se a destruição do material genético, o ácido desoxirribonucléico ADN. Células eucariotas (com ADN contido em núcleo limitado por membrana) têm cromossomos formados por unidades repetitivas, os nucleossomas. Antes da morte da célula, o ADN é cortado por enzimas (endonucleases) em regiões específicas entre os nucleossomas. Como cada unidade dessas tem cerca de duzentos pares de bases (nucleotídeos), os fragmentos de ADN gerados têm esse número de pares de bases ou múltiplos dele.

Assim, se o ADN de uma célula apoptótica for analisado por eletroforese, técnica que separa os fragmentos por tamanho, será vista uma "escada" na qual os "degraus" indicam o tamanho de fragmento: duzentos pares de bases, quatrocentos, seiscentos etc. A presença dessa "escada" é



usada como uma marca da apoptose, embora ainda haja controvérsia sobre se todas as células em apoptose sofrem fragmentação do ADN.

Várias proteínas são apontadas como "alvos" das caspases, mas ainda não foi estabelecida uma relação direta entre o corte dessas proteínas e a morte celular. O primeiro vínculo entre a ação de uma caspase e o corte do ADN foi constatado há pouco. A caspase 3 corta uma proteína (ICAD, de inibitor of caspase-activated DNase) normalmente ligada a uma endonuclease (CAD) no citoplasma, ativando essa enzima, que entra no núcleo e começa a cortar o ADN. Outra relação direta já identificada é o corte, também pela caspase 3, da gelsolina, proteína ligada aos filamentos de actina (parte do citoesqueleto, que mantém a estrutura normal da célula). Esse corte danifica os filamentos e a célula perde sua forma, o que leva à apoptose.

Os gatilhos do suicídio celular

A apoptose pode ser acionada por vários tipos de gatilhos. A ausência dos sinais químicos que mantêm a célula em atividade e multiplicação (os chamados fatores de crescimento) pode ser um deles. No caso da cauda do girino, o gatilho para o "suicídio" é o aumento da concentração do hormônio tiroxina, liberado por certas células da rã. Células expostas em laboratório a altas concentrações de tiroxina morrem mesmo que o animal não tenha chegado à fase adulta. No entanto, se as concentrações de tiroxina são mantidas abaixo dos níveis normais a cauda persiste, mesmo na rã adulta.

Dois exemplos interessantes de indução de apoptose estão no sistema imune. Um deles é a morte prematura de linfócitos T capazes de atacar o próprio organismo que os gerou. Originados na medula óssea, os linfócitos T "amadurecem" na glândula timo (daí o "T"), entram no sangue e no sistema linfático e passam a ter papel crucial na defesa contra microrganismos. Isso se dá por meio de moléculas receptoras produzidas em sua superfície, durante sua maturação, que "reconhecem" substâncias estranhas e as combatem. Ainda no timo, porém, algumas dessas células produzem receptores que se ligam a substâncias do próprio organismo, o que levaria à auto-agressão, se elas fossem liberadas. Normalmente, porém, só saem do timo linfócitos que se ligam a componentes estranhos. Os demais, "inadequados", são selecionados e levados ao suicídio, graças à apoptose.

O outro exemplo está na ação dos linfócitos T chamados de "citotóxicos" contra uma infecção virótica. Os vírus só sobrevivem se estiverem dentro de uma célula. Eles usam a máquina celular para produzir suas próprias proteínas e gerar novos vírus, que invadem outras células sadias. Células infectadas, porém, expõem na superfície componentes do vírus, reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos. Com isso, o linfócito liga-se à célula-alvo e a bombardeia com pelo menos dois tipos de proteínas que, juntas, levam à morte celular (por necrose ou apoptose), evento descrito em 1991 em estudo do qual um dos autores (Young) participou.



Uma dessas proteínas é a perforina, que se insere na membrana celular e forma "poros" ("furos") que expõem o interior da célula, como demonstrado pelos autores, junto com outros grupos. O dano à membrana é suficiente para levar a célula a necrose. Outros grupos revelaram depois que a segunda proteína, a enzima granzima B, liga-se à superfície da célula-alvo e entra no citoplasma. Ali, essa enzima ativa a cascata das caspases, provavelmente ao clivar a caspase 10, induzindo a apoptose.

Mas as células "citotóxicas" também induzem apoptose por meio da proteína Fas, presente na membrana de várias células. Essa proteína mantém uma parte dentro da célula e outra fora, e pode ligar-se a outra proteína, a Fasligante (FasL), presente na membrana dos linfócitos T citotóxicos. Quando o linfócito liga-se à célula-alvo, a FasL, une-se à Fas e altera a forma da parte externa dessa última. Essa alteração faz com que a parte interna ative a caspase 8, iniciando a cascata de caspases. Em certos casos, fatores acidentais podem ser o "gatilho" do programa de morte.

Os genes são os responsáveis

Células insubstituíveis, como neurônios e fibras musculares esqueléticas, são mais resistentes à apoptose porque sua perda seria desastrosa para o organismo. Já células substituídas com facilidade, como as do sangue, são mais propensas a morrer desse modo. Mas o que determina que serão mais suscetíveis ou mais resistentes?

As primeiras evidências de que os mecanismos do suicídio celular são regulados por certos genes vieram dos estudos pioneiros de Robert Horvitz e colaboradores (no Massachusetts Institute of Technology, nos Estados Unidos) com o *Caenorhabditis elegans*. Esse pequeno verme de vida livre no solo é um modelo excelente para esse tipo de estudo por ter apenas 1.090 células somáticas (já diferenciadas), das quais 131 morrem durante seu desenvolvimento. Inofensivo ao homem, o *C. elegans* reproduz-se rapidamente em laboratório e é transparente: cada célula pode ser observada.

Outra vantagem é que todos os seus genes são conhecidos (estudo concluído em dezembro de 1998). Isso permitiu identificar, em vermes mutantes, os quatorze genes com algum papel na morte programada das células, batizadas de ced (de cell death abnormal). Para a destruição das 131 células, apenas dois (ced-3 e ced-4) são necessários: mutações em um deles bloqueiam a apoptose, e as células do *C. elegans* que morreriam continuam saudáveis. O ced-3 é semelhante ao gene humano que codifica a caspase 1, sugerindo que descendem de um ancestral comum.



Que mecanismo faz com que só as células supérfluas do *C. elegans* sejam eliminadas? A resposta parece estar em outro gene, o *ced-9*, que impede a ação dos dois genes suicidas, evitando a apoptose. Esse "gene de sobrevivência" parece ser expresso normalmente em muitas células que não devem morrer, talvez para protegê-las. Em vermes mutantes, sem um *ced-9* ativo, muitas células que estariam no adulto morrem por apoptose. Ao contrário, em mutantes que expressam em excesso esse gene certas células supérfluas são poupadas da morte.

Um gene dos mamíferos muito parecido com o *ced-9* é o que codifica a proteína Bcl-2 (de B-cell lymphoma), que também protege as células da morte programada. Vários trabalhos vêm sugerindo que a Bcl-2 e outras proteínas da mesma família regulam, em grande parte, a suscetibilidade celular à morte programada. Essa função começou a ser compreendida pelo estudo de portadores do linfoma de células B, tipo de leucemia que só afeta esses linfócitos. Descobriu-se que nessas células tumorais o gene responsável pela Bcl-2 tem atividade excessiva, levando à produção de grandes quantidades da proteína. Em geral, os oncogenes (genes que causam câncer se expressos em excesso) promovem a divisão celular, mas a superexpressão da Bcl-2 não tinha esse efeito, o que intrigou os cientistas.

O mistério foi desfeito com a descoberta de que a Bcl-2 impede a morte celular, o que também leva, como a divisão descontrolada, ao acúmulo de células anormais e, com isso, ao câncer. Outros estudos mostraram que o efeito protetor da Bcl-2 é geral, evitando a apoptose em diversos tipos de célula, tanto de modo direto (bloqueando complexos de caspases) quanto indireto (impedindo a liberação para o citoplasma de componentes da mitocôndria, capazes de ativar a caspase 3). O excesso de Bcl-2, embora não seja suficiente para causar câncer, favorece a ação de outros oncogenes.

Certas células normais produzem níveis relativamente altos de Bcl-2. Acredita-se que isso preserva células cuja morte seria devastadora para o organismo. O excesso de proteção, porém, tem um preço: quando se tornam cancerosas, elas costumam gerar tumores mais agressivos, já que resistem mais à morte programada. Isso parece ocorrer com os melanócitos. Tais células, produtoras do pigmento melanina, que escurece a pele e ajuda a evitar a absorção de doses letais de luz solar, precisam ser protegidas porque sua morte precoce ameaçaria outras células da pele. Mas por causa dessa resistência à apoptose, os melanócitos, se há algum dano nos genes, geram tumores (melanomas) mais agressivos e que se espalham rapidamente.

Outro gene envolvido na apoptose também foi detectado em estudos de tumores. O câncer surge quando células recém-formadas apresentam mutações simultâneas em genes que controlam o crescimento e a sobrevivência. Esses "defeitos", se pouco extensos, podem ser "corrigidos" por enzimas especializadas. Em geral, se a mutação é irreparável, ocorre o suicídio celular (segundo o princípio "melhor morta que errada"). O processo é comandado por um gene, presente em células normais, que codifica a proteína p53 (o nome refere-se à massa da molécula: 53 quilodáltons). Ao contrário do gene Bcl-2, o p53 desencadeia a apoptose. Células mutantes, sem esse gene, não sofrem apoptose. Elas vivem mais tempo, acumulam mais



mutações e multiplicam-se sem controle, gerando tumores. Por impedir isso, protegendo o organismo do câncer, o p53 foi chamado de gene supressor de tumores.

Outros estudos mostraram que o gene p53 está alterado com maior frequência nos portadores de câncer do que nas pessoas saudáveis. Em mais da metade de todos os tumores sólidos (incluindo os de pulmão, intestino grosso e mama) as duas cópias desse gene foram eliminadas ou alteradas — portanto, não codificam a proteína p53 ou levam a formas não-funcionais da mesma.

O estudo da apoptose e do câncer está começando a esclarecer por que muitos tumores resistem à radioterapia e à quimioterapia. Pensava-se que tais terapias destruíam o tumor por necrose, mas agora sabe-se que as células morrem em geral por apoptose. O que parece ocorrer é que tanto a radiação quanto as drogas danificam o ADN das células cancerosas, ativando o gene p53 e levando ao suicídio celular. Mas células cancerosas sem a p53 ou com altos níveis de Bcl-2 não morrem, tornando inúteis essas terapias. Há poucos anos também foi constatado que algumas dessas terapias ativam proteínas que estimulam a transcrição de "genes protetores".

Hoje, está sendo explorada a possibilidade de usar terapias genéticas para evitar a resistência das células cancerosas à apoptose. Uma dessas terapias consiste em introduzir o gene p53 em tumores nos quais ele não existe ou está alterado, para restaurar a produção dessa proteína na célula. Também estão sendo investigadas maneiras de prevenir que genes Bcl-2 hiperativos produzam essa outra proteína.

A apoptose e as doenças

A morte celular programada faz parte de diversos processos vitais, como o desenvolvimento embrionário, o controle de tumores e a regulação de populações de células do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pela autodestruição podem ser desastrosas. Por ser indispensável à vida, a morte da célula deve seguir um plano meticuloso. Qualquer distúrbio de sua regulação (tanto o excesso quanto a insuficiência) pode provocar uma variedade de doenças.

A apoptose excessiva pode causar doenças neurodegenerativas (como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson), lesões secundárias após isquemia (bloqueio de circulação do sangue), retinite pigmentosa (uma causa de cegueira) e osteoporose (perda de massa óssea). Certas infecções também podem levar à apoptose excessiva: no mal de Alzheimer, os neurônios parecem cometer suicídio precocemente, o que resulta em demência progressiva e irreversível, por perda da cognição e da memória.



Em ataques cardíacos por isquemia, o bloqueio sanguíneo leva à necrose as células que dependem do vaso afetado. Mas a destruição não termina aí: células próximas da área afetada também morrem, mais lentamente, e sua aparência sugere a ocorrência de apoptose. Parece que o conteúdo tóxico das primeiras células mortas, quando não destrói as células vizinhas por necrose, as leva ao suicídio.

Infecções por bactérias e protozoários também podem provocar a apoptose. Bactérias como *Shigella flexneri* e espécies de *Salmonella*, causadoras de disenterias, invadem as células e liberam as proteínas IpaB (*S. flexneri*) e SipB (*Salmonella*), que ativam a caspase 1 e levam à autodestruição. O protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, induz apoptose em algumas das células que infecta (não em todas), embora não se conheça o processo em detalhes. Resultados preliminares de estudo recente do grupo de um dos autores (Horta) indicam que macrófagos infectados em laboratório pelo protozoário *Leishmania amazonensis*, causador de um tipo de leishmaniose, mostram diminuição do conteúdo, fragmentação "em escada" do ADN e condensação de cromatina, eventos típicos da apoptose.

Já a ausência de apoptose, em que a célula "esquece" de morrer, pode levar a doenças auto-imunes (em que o sistema imune ataca o próprio organismo), infecções viróticas prolongadas ou tumores (como no câncer). As doenças auto-imunes podem ser geradas por falhas no programa de morte (ainda no timo) de células T que reagem com substâncias do próprio organismo, ou mesmo após uma reação de defesa a certos componentes externos muito semelhantes aos internos.

Infecções viróticas também podem se alongar pela ausência de apoptose. As células invadidas por vírus com frequência param ou reduzem a síntese das próprias proteínas para fabricar as dos invasores. Em geral, isso bastaria para levar à apoptose muitas células, mas alguns vírus inibem o processo. O vírus Epstein-Barr, agente da mononucleose e associado a cânceres linfáticos, produz proteínas parecidas com a Bcl-2 (inibidora de apoptose) e moléculas que induzem maior produção dessa proteína na célula. Outros inativam ou destroem a p53 (indutora da apoptose), como o vírus do papiloma, principal causa do câncer de colo do útero. O vírus da varíola bovina produz uma proteína que impede a cascata de caspases. O conhecimento dessas estratégias está permitindo a criação de novas drogas, que bloqueiam a ação do vírus.

Na Aids, a indução de apoptose em células saudáveis contribui para a deficiência do sistema imune que caracteriza a doença. O vírus da Aids (HIV) infecta basicamente os linfócitos T "auxiliares", usando como porta de entrada a proteína de superfície CD4. A "chave" que se encaixa no CD4 e abre essa porta é a proteína virótica gp120. Pessoas com Aids perdem grande parcela desses linfócitos, mas a maioria dos que morrem não parece estar infectada, e foi provado que muitos morrem por apoptose. Estudos recentes sugerem que a gp120 também presente no sangue dos portadores do HIV, ativaría o suicídio de células não-infectadas ao ligar-se ao CD4. Interações entre as proteínas Fas e FasL, cuja produção aumenta durante a infecção, fariam o mesmo. Os



linfócitos T citotóxicos (mesmo não tendo a CD4) também são levados ao suicídio, pois dependem de fatores de crescimento derivados dos auxiliares para evitar o processo.

Essa é uma pequena amostra de como uma falha mínima no programa de morte que toda a célula carrega pode levar a uma doença e, às vezes, à morte do indivíduo. Mas é suficiente para justificar todo o esforço realizado para que cada participante, cada etapa e cada arma do misterioso suicídio celular sejam revelados. Qualquer descoberta é importante para a criação de novas terapias e métodos de prevenção, que poderão evitar ou tratar com sucesso inúmeras doenças hoje incuráveis.

APOPTOSE INSUFICIENTE

1. CÂNCER

Linfomas foliculares

Carcinomas com mutação de p53

Tumores dependentes de hormônios

Câncer de mama Câncer de próstata

Câncer de ovário

2. DOENÇAS AUTO-IMUNES

Lúpus eritematoso sistêmico

Glomerulonefrite imune

3. INFECÇÕES VIRÓTICAS

Herpesvírus

Poxvírus

Adenovírus

APOPTOSE EXCESSIVA

1. AIDS 2. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Doença de Alzheimer

Doença de Parkinson

Esclerose lateral amiotrófica

Retinite pigmentosa

Degeneração cerebelar



3. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

Anemia aplástica

4. LESÕES ISQUÊMICAS

Infarto do miocárdio

Acidente vascular cerebral

5. DOENÇAS DO FÍGADO INDUZIDAS POR TOXINAS

Álcool

In: Ciência Hoje, vol.25, nº150, jun.1999. Maria de Fátima Horta, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais. John Ding-E Young, Universidade de Rockefeller, Nova York, Estados Unidos

Em 1972, o australiano John Kerr e os colaboradores escoceses Andrew Wyllie e Alastair Currie descreveram os diferentes aspectos das células na morte programada e na patológica. Para distingui-los, batizaram o primeiro de "apoptose", em oposição à necrose. Em grego arcaico, a palavra apoptose significa "o ato de cair", como caem as pétalas das flores e as folhas das árvores no outono, e foi escolhida porque sugere perdas (a morte celular, no caso) benéficas, necessárias ao bom funcionamento e à sobrevivência do organismo.

Após outros estudos, os cientistas sugeriram que a morte celular programada ocorre não só durante o desenvolvimento, mas também em organismos maduros, ao longo da vida. Também sugeriram que no apoptose, ao contrário do que acontece na necrose, a célula participa da própria destruição, e que poderia haver ligação entre a ativação do suicídio celular e doenças degenerativas (como o mal de Alzheimer) e entre sua inibição "incorreta" e doenças replicativas (como o câncer).

Uma característica marcante é que a apoptose é "silenciosa". Não há, como na necrose, o "alvoroço" da inflamação. Em geral, as células apoptóticas são as reconhecidas por macrófagos (um tipo de glóbulo branco presente em todos os tecidos) e ingeridas antes que se desintegrem. Isso evita o derrame do conteúdo celular e, assim, não há inflamação e lesão do tecido, garantindo o seu funcionamento normal.

Fato interessante é que certas células apoptóticas não são removidas logo, continuando no local às vezes por toda a vida. É o caso dos queratinócitos, células da camada externa da pele. Ao migrar de camadas mais profundas para a superfície, eles morrem por apoptose, mas no processo substituem seu conteúdo pela proteína queratina e ganham uma "capa" impermeável. Assim, a camada protetora mais externa da pele é feita de células mortas, descamadas e trocadas por outras a cada 21 dias, em média. O cristalino (a lente) dos olhos também é formado por células mortas, que substituíram a maior parte de seu citoplasma por proteínas denominadas cristalinas.



As ideias inovadoras geradas pelo grupo de Kerr no início da década de 1970 passaram despercebidas por mais de uma década, até que suas previsões começaram a ser confirmadas. Hoje, inúmeros cientistas pesquisam a apoptose e, embora muitas questões continuem sem resposta, vários princípios básicos já foram descobertos.

As "armas" usadas pelas células

Certas proteases, recentemente chamadas de caspases (nome derivado de cisteína-protease que cliva — "corta" — após resíduos de ácido aspártico) têm papel central na apoptose, em todo o tipo de célula e em todo o organismo multicelular já estudado. A primeira enzima dessa família descrita em mamíferos foi a ICE (interleukin-1b converting enzyme), hoje caspase 1. O que levou à identificação da ICE foi sua função de ativar a interleucina-1b, proteína importante no sistema imune, mas depois ela atraiu maior atenção por seu papel na apoptose.

Outras enzimas, com características semelhantes, foram identificadas depois: a família já tem quatorze integrantes. De início, atribuiu-se à caspase 1 um papel primordial na apoptose, mas estudos recentes, com camundongos "nocautes" para essa enzima (que não a produzem), mostraram que várias formas de apoptose ocorrem na sua ausência. Em alguns casos, no entanto, a caspase 1 é preponderante. Uma caspase pode clivar outras e esse "corte" parece ser essencial à ativação dessas enzimas. Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outras, em seqüência, até gerar uma caspase executora. Esta destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose. Todos os casos levam à morte celular.

Vários experimentos em laboratório sugerem uma hierarquia na ativação das caspases, mas essa hierarquia e as caspases envolvidas podem diferir, dependendo do modo de indução da apoptose. A caspase 8 ou a caspase 10, dependendo do tipo de estímulo que a célula recebe, são fortes candidatas a caspases iniciadoras, e há indícios de que, em geral, a ativação da caspase 3 e da caspase 7 precede a ativação da caspase 6 (caspases executoras).

Decifrando o programa letal

Na grande maioria das células em apoptose observa-se a destruição do material genético, o ácido desoxirribonucléico ADN. Células eucariotas (com ADN contido em núcleo limitado por membrana) têm cromossomos formados por unidades repetitivas, os nucleossomos. Antes da morte da célula, o ADN é cortado por enzimas (endonucleases) em regiões específicas entre os nucleossomos. Como cada unidade dessas tem cerca de duzentos pares de bases (nucleotídeos), os fragmentos de ADN gerados têm esse número de pares de bases ou múltiplos dele.



Assim, se o ADN de uma célula apoptótica for analisado por eletroforese, técnica que separa os fragmentos por tamanho, será vista uma "escada" na qual os "degraus" indicam o tamanho de fragmento: duzentos pares de bases, quatrocentos, seiscentos etc. A presença dessa "escada" é usada como uma marca da apoptose, embora ainda haja controvérsia sobre se todas as células em apoptose sofrem fragmentação do ADN.

Várias proteínas são apontadas como "alvos" das caspases, mas ainda não foi estabelecida uma relação direta entre o corte dessas proteínas e a morte celular. O primeiro vínculo entre a ação de uma caspase e o corte do ADN foi constatado há pouco. A caspase 3 corta uma proteína (ICAD, de inibitor of caspase-activated DNase) normalmente ligada a uma endonuclease (CAD) no citoplasma, ativando essa enzima, que entra no núcleo e começa a cortar o ADN. Outra relação direta já identificada é o corte, também pela caspase 3, da gelsolina, proteína ligada aos filamentos de actina (parte do citoesqueleto, que mantém a estrutura normal da célula). Esse corte danifica os filamentos e a célula perde sua forma, o que leva à apoptose.

Os gatilhos do suicídio celular

A apoptose pode ser acionada por vários tipos de gatilhos. A ausência dos sinais químicos que mantêm a célula em atividade e multiplicação (os chamados fatores de crescimento) pode ser um deles. No caso da cauda do girino, o gatilho para o "suicídio" é o aumento da concentração do hormônio tiroxina, liberado por certas células da rã. Células expostas em laboratório a altas concentrações de tiroxina morrem mesmo que o animal não tenha chegado à fase adulta. No entanto, se as concentrações de tiroxina são mantidas abaixo dos níveis normais a cauda persiste, mesmo na rã adulta.

Dois exemplos interessantes de indução de apoptose estão no sistema imune. Um deles é a morte prematura de linfócitos T capazes de atacar o próprio organismo que os gerou. Originados na medula óssea, os linfócitos T "amadurecem" na glândula timo (daí o "T"), entram no sangue e no sistema linfático e passam a ter papel crucial na defesa contra microrganismos. Isso se dá por meio de moléculas receptoras produzidas em sua superfície, durante sua maturação, que "reconhecem" substâncias estranhas e as combatem. Ainda no timo, porém, algumas dessas células produzem receptores que se ligam a substâncias do próprio organismo, o que levaria à auto-agressão, se elas fossem liberadas. Normalmente, porém, só saem do timo linfócitos que se ligam a componentes estranhos. Os demais, "inadequados", são selecionados e levados ao suicídio, graças à apoptose.

O outro exemplo está na ação dos linfócitos T chamados de "citotóxicos" contra uma infecção virótica. Os vírus só sobrevivem se estiverem dentro de uma célula. Eles usam a máquina celular para produzir suas próprias proteínas e gerar novos vírus, que invadem outras células sadias. Células infectadas, porém, expõem na superfície componentes do vírus, reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos. Com isso, o linfócito liga-se à célula-alvo e a bombardeia com pelo menos dois tipos de proteínas que, juntas, levam à morte celular (por necrose ou apoptose), evento descrito em 1991 em estudo do qual um dos autores (Young) participou.



Uma dessas proteínas é a perforina, que se insere na membrana celular e forma "poros" ("furos") que expõem o interior da célula, como demonstrado pelos autores, junto com outros grupos. O dano à membrana é suficiente para levar a célula a necrose. Outros grupos revelaram depois que a segunda proteína, a enzima granzima B, liga-se à superfície da célula-alvo e entra no citoplasma. Ali, essa enzima ativa a cascata das caspases, provavelmente ao clivar a caspase 10, induzindo a apoptose.

Mas as células "citotóxicas" também induzem apoptose por meio da proteína Fas, presente na membrana de várias células. Essa proteína mantém uma parte dentro da célula e outra fora, e pode ligar-se a outra proteína, a Fasligante (FasL), presente na membrana dos linfócitos T citotóxicos. Quando o linfócito liga-se à célula-alvo, a FasL, une-se à Fas e altera a forma da parte externa dessa última. Essa alteração faz com que a parte interna ative a caspase 8, iniciando a cascata de caspases. Em certos casos, fatores acidentais podem ser o "gatilho" do programa de morte.

Os genes são os responsáveis

Células insubstituíveis, como neurônios e fibras musculares esqueléticas, são mais resistentes à apoptose porque sua perda seria desastrosa para o organismo. Já células substituídas com facilidade, como as do sangue, são mais propensas a morrer desse modo. Mas o que determina que serão mais suscetíveis ou mais resistentes?

As primeiras evidências de que os mecanismos do suicídio celular são regulados por certos genes vieram dos estudos pioneiros de Robert Horvitz e colaboradores (no Massachusetts Institute of Technology, nos Estados Unidos) com o *Caenorhabditis elegans*. Esse pequeno verme de vida livre no solo é um modelo excelente para esse tipo de estudo por ter apenas 1.090 células somáticas (já diferenciadas), das quais 131 morrem durante seu desenvolvimento. Inofensivo ao homem, o *C. elegans* reproduz-se rapidamente em laboratório e é transparente: cada célula pode ser observada.

Outra vantagem é que todos os seus genes são conhecidos (estudo concluído em dezembro de 1998). Isso permitiu identificar, em vermes mutantes, os quatorze genes com algum papel na morte programada das células, batizadas de ced (de cell death abnormal). Para a destruição das 131 células, apenas dois (*ced-3* e *ced-4*) são necessários: mutações em um deles bloqueiam a apoptose, e as células do *C. elegans* que morreriam continuam saudáveis. O *ced-3* é semelhante ao gene humano que codifica a caspase 1, sugerindo que descendem de um ancestral comum.



Que mecanismo faz com que só as células supérfluas do *C. elegans* sejam eliminadas? A resposta parece estar em outro gene, o *ced-9*, que impede a ação dos dois genes suicidas, evitando a apoptose. Esse "gene de sobrevivência" parece ser expresso normalmente em muitas células que não devem morrer, talvez para protegê-las. Em vermes mutantes, sem um *ced-9* ativo, muitas células que estariam no adulto morrem por apoptose. Ao contrário, em mutantes que expressam em excesso esse gene certas células supérfluas são poupadas da morte.

Um gene dos mamíferos muito parecido com o *ced-9* é o que codifica a proteína Bcl-2 (de B-cell lymphoma), que também protege as células da morte programada. Vários trabalhos vêm sugerindo que a Bcl-2 e outras proteínas da mesma família regulam, em grande parte, a suscetibilidade celular à morte programada. Essa função começou a ser compreendida pelo estudo de portadores do linfoma de células B, tipo de leucemia que só afeta esses linfócitos. Descobriu-se que nessas células tumorais o gene responsável pela Bcl-2 tem atividade excessiva, levando à produção de grandes quantidades da proteína. Em geral, os oncogenes (genes que causam câncer se expressos em excesso) promovem a divisão celular, mas a superexpressão da Bcl-2 não tinha esse efeito, o que intrigou os cientistas.

O mistério foi desfeito com a descoberta de que a Bcl-2 impede a morte celular, o que também leva, como a divisão descontrolada, ao acúmulo de células anormais e, com isso, ao câncer. Outros estudos mostraram que o efeito protetor da Bcl-2 é geral, evitando a apoptose em diversos tipos de célula, tanto de modo direto (bloqueando complexos de caspases) quanto indireto (impedindo a liberação para o citoplasma de componentes da mitocôndria, capazes de ativar a caspase 3). O excesso de Bcl-2, embora não seja suficiente para causar câncer, favorece a ação de outros oncogenes.

Certas células normais produzem níveis relativamente altos de Bcl-2. Acredita-se que isso preserva células cuja morte seria devastadora para o organismo. O excesso de proteção, porém, tem um preço: quando se tornam cancerosas, elas costumam gerar tumores mais agressivos, já que resistem mais à morte programada. Isso parece ocorrer com os melanócitos. Tais células, produtoras do pigmento melanina, que escurece a pele e ajuda a evitar a absorção de doses letais de luz solar, precisam ser protegidas porque sua morte precoce ameaçaria outras células da pele. Mas por causa dessa resistência à apoptose, os melanócitos, se há algum dano nos genes, geram tumores (melanomas) mais agressivos e que se espalham rapidamente.

Outro gene envolvido na apoptose também foi detectado em estudos de tumores. O câncer surge quando células recém-formadas apresentam mutações simultâneas em genes que controlam o crescimento e a sobrevivência. Esses "defeitos", se pouco extensos, podem ser "corrigidos" por enzimas especializadas. Em geral, se a mutação é irreparável, ocorre o suicídio celular (segundo o princípio "melhor morta que errada"). O processo é comandado por um gene, presente em células normais, que codifica a proteína p53 (o nome refere-se à massa da molécula: 53 quilodáltons). Ao contrário do gene Bcl-2, o p53 desencadeia a apoptose. Células mutantes, sem esse gene, não sofrem apoptose. Elas vivem mais tempo, acumulam mais mutações e multiplicam-se sem controle, gerando tumores. Por impedir isso, protegendo o organismo do câncer, o p53 foi chamado de gene supressor de tumores.



Outros estudos mostraram que o gene p53 está alterado com maior frequência nos portadores de câncer do que nas pessoas saudáveis. Em mais da metade de todos os tumores sólidos (incluindo os de pulmão, intestino grosso e mama) as duas cópias desse gene foram eliminadas ou alteradas — portanto, não codificam a proteína p53 ou levam a formas não-funcionais da mesma.

O estudo da apoptose e do câncer está começando a esclarecer por que muitos tumores resistem à radioterapia e à quimioterapia. Pensava-se que tais terapias destruíam o tumor por necrose, mas agora sabe-se que as células morrem em geral por apoptose. O que parece ocorrer é que tanto a radiação quanto as drogas danificam o ADN das células cancerosas, ativando o gene p53 e levando ao suicídio celular. Mas células cancerosas sem a p53 ou com altos níveis de Bcl-2 não morrem, tornando inúteis essas terapias. Há poucos anos também foi constatado que algumas dessas terapias ativam proteínas que estimulam a transcrição de "genes protetores".

Hoje, está sendo explorada a possibilidade de usar terapias genéticas para evitar a resistência das células cancerosas à apoptose. Uma dessas terapias consiste em introduzir o gene p53 em tumores nos quais ele não existe ou está alterado, para restaurar a produção dessa proteína na célula. Também estão sendo investigadas maneiras de prevenir que genes Bcl-2 hiperativos produzam essa outra proteína.

A apoptose e as doenças

A morte celular programada faz parte de diversos processos vitais, como o desenvolvimento embrionário, o controle de tumores e a regulação de populações de células do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pela autodestruição podem ser desastrosas. Por ser indispensável à vida, a morte da célula deve seguir um plano meticuloso. Qualquer distúrbio de sua regulação (tanto o excesso quanto a insuficiência) pode provocar uma variedade de doenças.

A apoptose excessiva pode causar doenças neurodegenerativas (como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson), lesões secundárias após isquemia (bloqueio de circulação do sangue), retinite pigmentosa (uma causa de cegueira) e osteoporose (perda de massa óssea). Certas infecções também podem levar à apoptose excessiva: no mal de Alzheimer, os neurônios parecem cometer suicídio precocemente, o que resulta em demência progressiva e irreversível, por perda da cognição e da memória.

Em ataques cardíacos por isquemia, o bloqueio sangüíneo leva à necrose as células que dependem do vaso afetado. Mas a destruição não termina aí: células próximas da área afetada



também morrem, mais lentamente, e sua aparência sugere a ocorrência de apoptose. Parece que o conteúdo tóxico das primeiras células mortas, quando não destrói as células vizinhas por necrose, as leva ao suicídio.

Infecções por bactérias e protozoários também podem provocar a apoptose. Bactérias como *Shigella flexneri* e espécies de *Salmonella*, causadoras de disenterias, invadem as células e liberam as proteínas IpaB (*S. flexneri*) e SipB (*Salmonella*), que ativam a caspase 1 e levam à autodestruição. O protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, induz apoptose em algumas das células que infecta (não em todas), embora não se conheça o processo em detalhes. Resultados preliminares de estudo recente do grupo de um dos autores (Horta) indicam que macrófagos infectados em laboratório pelo protozoário *Leishmania amazonensis*, causador de um tipo de leishmaniose, mostram diminuição do conteúdo, fragmentação "em escada" do ADN e condensação de cromatina, eventos típicos da apoptose.

Já a ausência de apoptose, em que a célula "esquece" de morrer, pode levar a doenças auto-imunes (em que o sistema imune ataca o próprio organismo), infecções viróticas prolongadas ou tumores (como no câncer). As doenças auto-imunes podem ser geradas por falhas no programa de morte (ainda no timo) de células T que reagem com substâncias do próprio organismo, ou mesmo após uma reação de defesa a certos componentes externos muito semelhantes aos internos.

Infecções viróticas também podem se alongar pela ausência de apoptose. As células invadidas por vírus com frequência param ou reduzem a síntese das próprias proteínas para fabricar as dos invasores. Em geral, isso bastaria para levar à apoptose muitas células, mas alguns vírus inibem o processo. O vírus Epstein-Barr, agente da mononucleose e associado a cânceres linfáticos, produz proteínas parecidas com a Bcl-2 (inibidora de apoptose) e moléculas que induzem maior produção dessa proteína na célula. Outros inativam ou destroem a p53 (indutora da apoptose), como o vírus do papiloma, principal causa do câncer de colo do útero. O vírus da varíola bovina produz uma proteína que impede a cascata de caspases. O conhecimento dessas estratégias está permitindo a criação de novas drogas, que bloqueiam a ação do vírus.

Na Aids, a indução de apoptose em células sadias contribui para a deficiência do sistema imune que caracteriza a doença. O vírus da Aids (HIV) infecta basicamente os linfócitos T "auxiliares", usando como porta de entrada a proteína de superfície CD4. A "chave" que se encaixa no CD4 e abre essa porta é a proteína virótica gp120. Pessoas com Aids perdem grande parcela desses linfócitos, mas a maioria dos que morrem não parece estar infectada, e foi provado que muitos morrem por apoptose. Estudos recentes sugerem que a gp120 também presente no sangue dos portadores do HIV, ativaria o suicídio de células não-infectadas ao ligar-se ao CD4. Interações entre as proteínas Fas e FasL, cuja produção aumenta durante a infecção, fariam o mesmo. Os linfócitos T citotóxicos (mesmo não tendo a CD4) também são levados ao suicídio, pois dependem de fatores de crescimento derivados dos auxiliares para evitar o processo.

Essa é uma pequena amostra de como uma falha mínima no programa de morte que toda a célula carrega pode levar a uma doença e, às vezes, à morte do indivíduo. Mas é suficiente para justificar todo o esforço realizado para que cada participante, cada etapa e cada arma do misterioso suicídio celular sejam revelados. Qualquer descoberta é importante para a criação de novas terapias e métodos de prevenção, que poderão evitar ou tratar com sucesso inúmeras doenças hoje incuráveis.

APOPTOSE INSUFICIENTE

1. CÂNCER

Linfomas foliculares

Carcinomas com mutação de p53

Tumores dependentes de hormônios

Câncer de mama Câncer de próstata

Câncer de ovário

2. DOENÇAS AUTO-IMUNES

Lúpus eritematoso sistêmico

Glomerulonefrite imune

3. INFECÇÕES VIRÓTICAS

Herpesvírus

Poxvírus

Adenovírus

APOPTOSE EXCESSIVA

1. AIDS 2. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS



Doença de Alzheimer

Doença de Parkinson

Esclerose lateral amiotrófica

Retinite pigmentosa

Degeneração cerebelar

3. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

Anemia aplástica

4. LESÕES ISQUÊMICAS

Infarto do miocárdio

Acidente vascular cerebral

5. DOENÇAS DO FÍGADO INDUZIDAS POR TOXINAS

Álcool

In: Ciência Hoje, vol.25, nº150, jun.1999. Maria de Fátima Horta, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais. John Ding-E Young, Universidade de Rockefeller, Nova York, Estados Unidos