



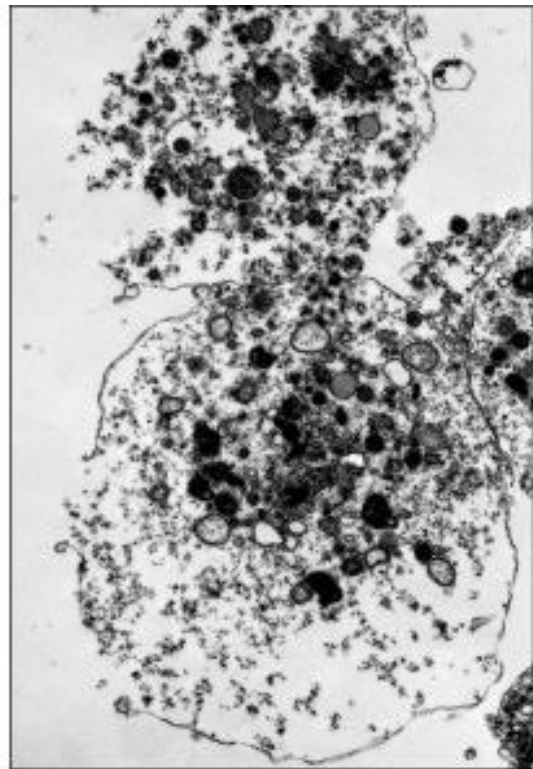
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
SETOR DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Morte Celular Programada (Apoptose)

Profa. Dra. Nívea Macedo

APOPTOSE

- A morte celular desempenha um papel crucial no desenvolvimento de animais e plantas (senescência de folhas e flores, resposta a injúrias e infecções);
- A morte celular programada também ocorre em organismos unicelulares (leveduras e bactérias);
- Bilhões de células morrem na medula óssea e intestino;
- Apoptose é a forma de morte celular programada mais comum e melhor entendida;
- Modificações morfológicas em células apoptóticas: Elas se encolhem e condensam, o citoesqueleto colapsa, o envelope nuclear se desfaz e a cromatina nuclear se condensa e se quebra em fragmentos, a superfície celular forma bolhas, e, se a célula for grande, ela quebra em fragmentos envolvidos por membranas chamados de *corpos apoptóticos*.
- Além disso, a superfície da célula ou dos corpos apoptóticos torna-se quimicamente modificada para que seja engolfada por células vizinhas ou macrófagos.
- Células necrosadas se expandem e explodem, liberando seus conteúdos sobre os vizinhos e provocando uma resposta inflamatória;



(A)



(B)

10 μm



(C)

engulfed dead cell
phagocytic cell

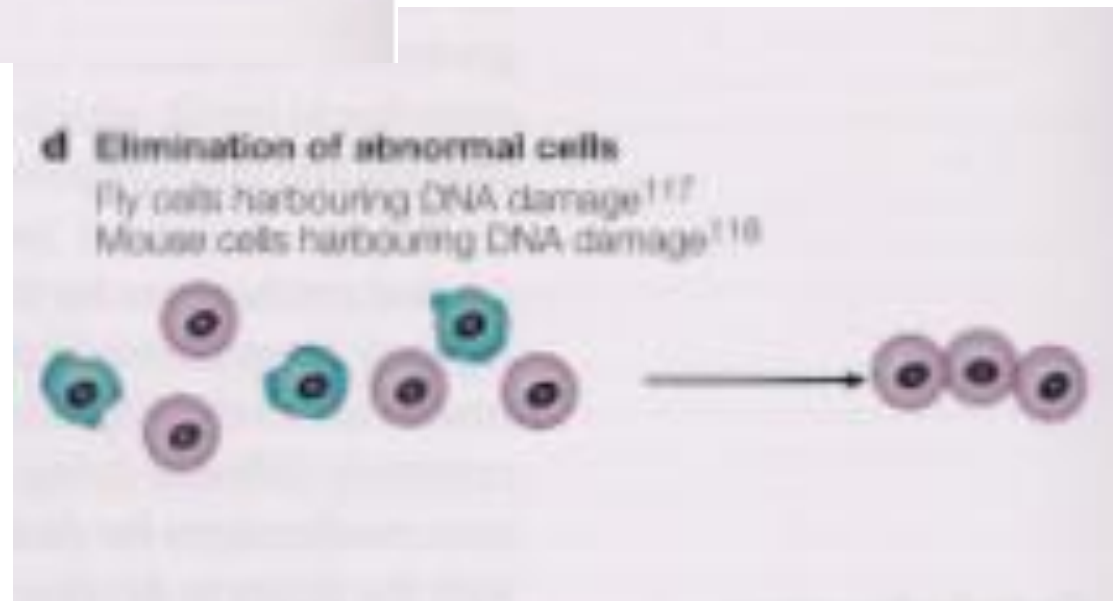
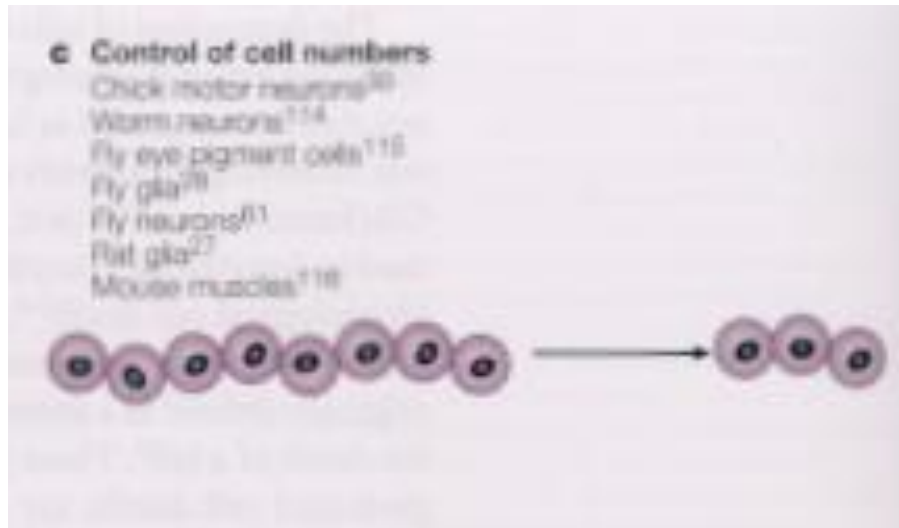
Figure 17–37. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Reutilização do material celular



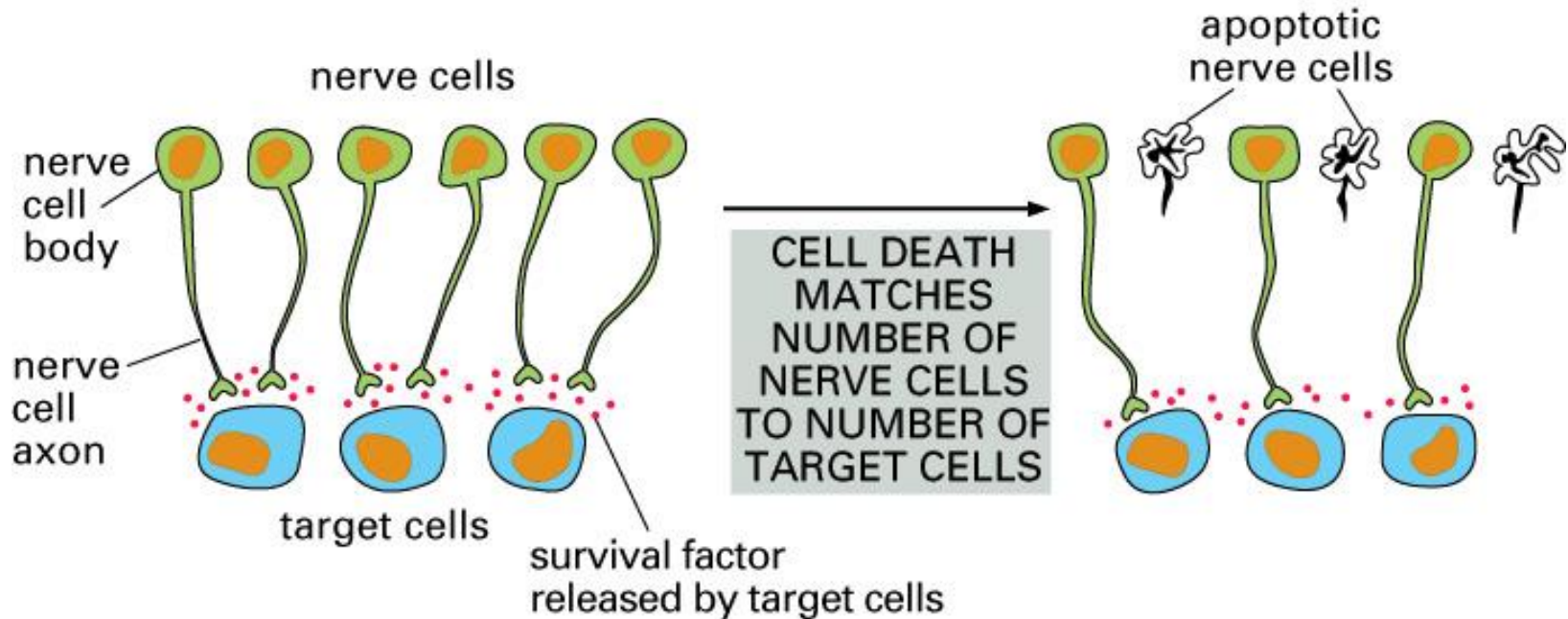
A morte celular programada elimina células desnecessárias

- A morte celular programada atua na formação e manutenção tecidual durante toda a vida do indivíduo;



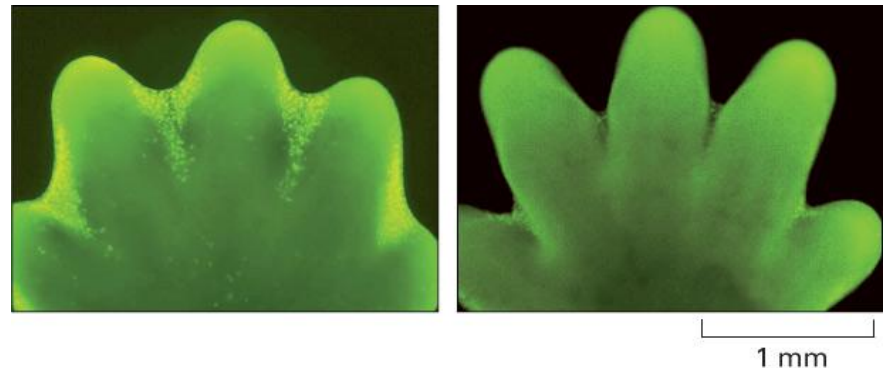
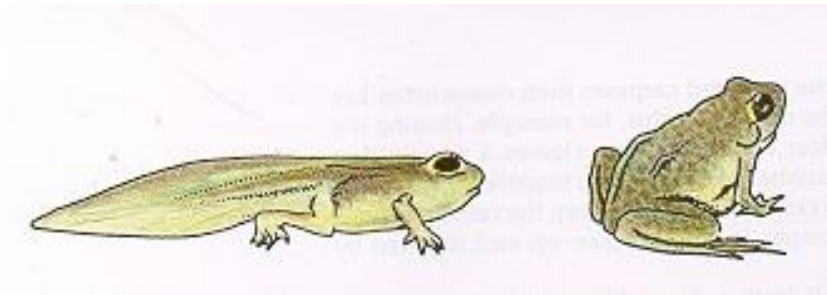
A morte celular programada elimina células desnecessárias

- Alta taxa de morte celular programada no sistema nervoso de vertebrados em desenvolvimento (ajuste do número de células nervosas para o número células-alvo que se conectam com o nervo);
- As células competem por quantidades limitadas de fatores de sobrevivência que são secretados pelas células-alvo as quais eles se conectam;



A morte celular programada elimina células desnecessárias

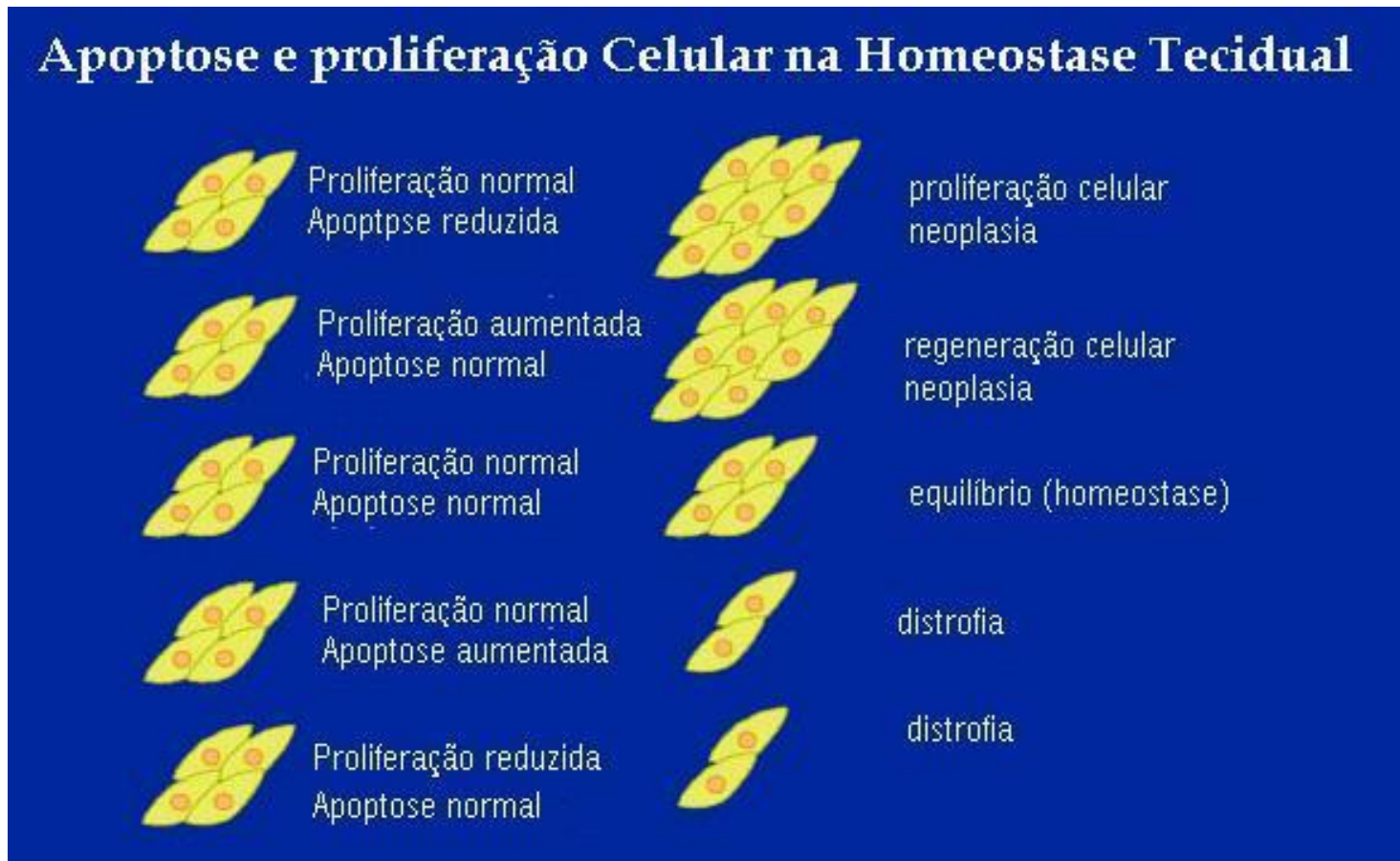
- No desenvolvimento animal, a apoptose elimina células desnecessárias (ex. Proteínas morfogenéticas do osso - BMPs - estimulam células em desenvolvimento de dedos em pés e mãos a se matarem; Um aumento no hormônio da tireóide na corrente sanguínea sinaliza para morte de células da cauda de um girino durante a metamorfose;



- Funciona como um processo de controle de qualidade no desenvolvimento, eliminando células que são anormais, não-funcionais ou potencialmente perigosas ao animal (sistema imune dos vertebrados – eliminação de linfócitos T e B não-funcionais ou potencialmente perigosos);

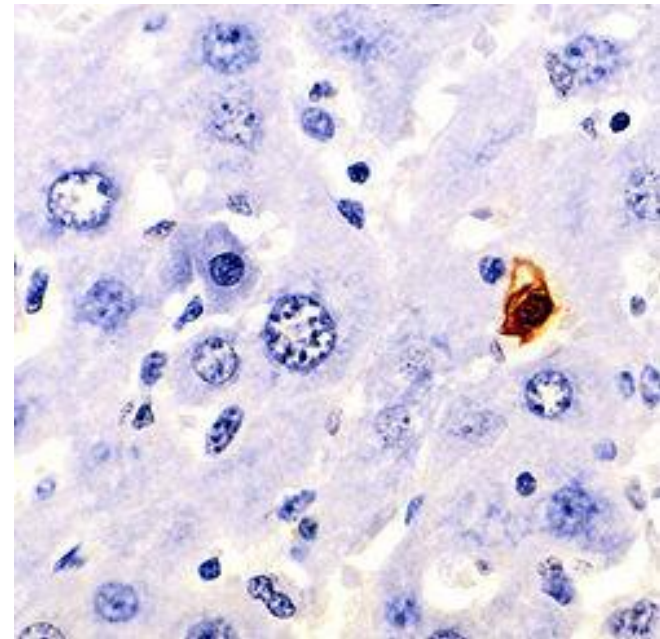
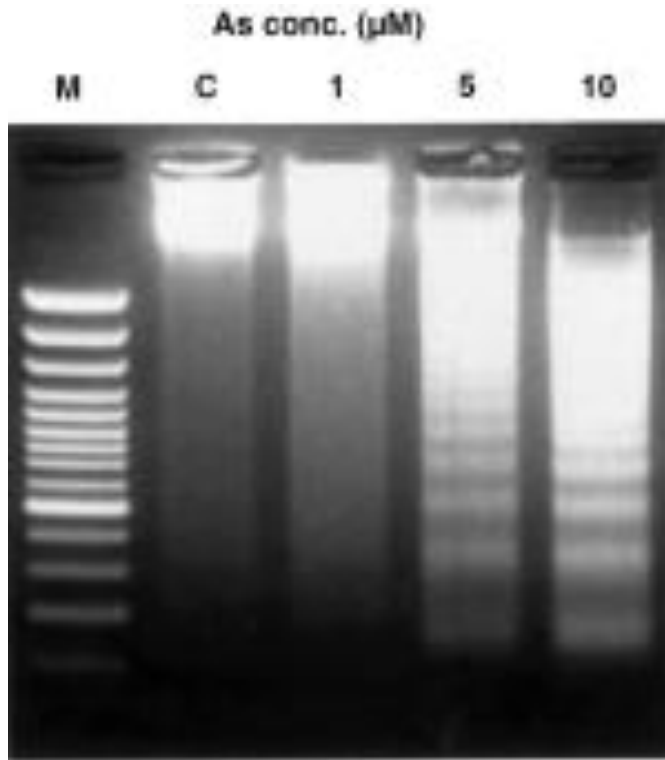
A morte celular programada elimina células desnecessárias

- Em tecidos adultos, que não estão crescendo nem condensando, a morte celular e a divisão celular devem ser finamente reguladas para assegurar que estejam em exato equilíbrio;



Células apoptóticas são bioquimicamente reconhecíveis

- Durante a apoptose, uma endonuclease cliva o DNA cromossomal em fragmentos de diferentes tamanhos, que podem ser observados por gel de eletroforese ou por TUNEL (marcação de extremidades de dUTP mediada por um TdT);



Células apoptóticas são bioquimicamente reconhecíveis

- O fosfolípídeo fosfatidilserina (-) se desloca para a face externa da membrana plasmática, onde pode servir como marcador;
- Fosfatidilserina também sinaliza para as células vizinhas e macrófagos fagocitarem a célula e bloqueia a inflamação frequentemente associada à fagocitose, pois inibem a produção de citocinas que induzem inflamação;
- Células também devem perder suas moléculas na membrana que funcionam como sinais de sobrevivência;
- Células que entram em apoptose normalmente perdem o potencial elétrico que normalmente existe através interna de suas mitocôndrias;
- Proteínas como o citocromo c são liberadas do espaço intermembranar para o citosol;

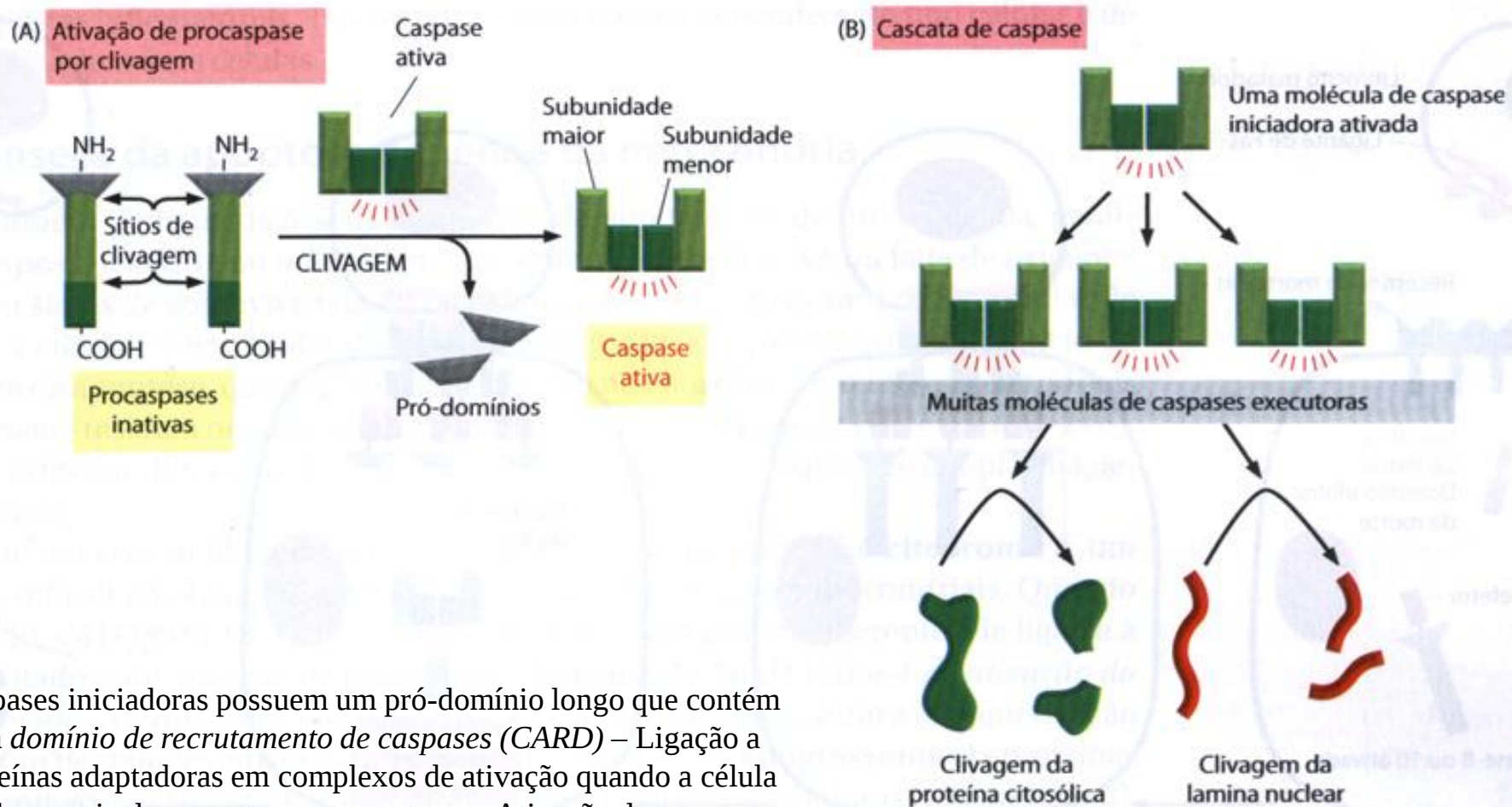
A apoptose depende de uma cascata proteolítica intracelular mediada por caspases

- A maquinaria celular responsável pela apoptose é similar em todas as células animais;
- Proteases-cisteínicas (caspases) clivam suas proteínas-alvo em ácidos aspárticos específicos;
- Caspases são sintetizadas como precursores inativos (procaspases) que são ativados por clivagem proteolítica em um ou dois Asp específicos e é catalisada por outras caspases;
- Procaspase: uma subunidade grande e uma pequena (heterodímero) e dois dímeros se juntam para formar um **tetrâmero ativo**;
- Caspases estão envolvidas não só com a apoptose, mas também com a resposta imune e inflamatória. A primeira caspase descoberta foi a *enzima conversora de interleucina-1 (ICE)* que induz inflamação;
- **Procaspases iniciadoras** agem no início da cascata proteolítica e, quando ativadas, clivam e ativam; **procaspases executoras**, assim como proteínas-alvo na célula;

Tabela 18-1 Algumas caspases humanas

Caspases envolvidas na inflamação	Caspases 1 (ICE), 4, 5
Caspases envolvidas na apoptose	
Caspases iniciadoras	Caspases 2, 8, 9, 10
Caspases executoras	Caspases 3, 6, 7

Ativação da procaspase durante a apoptose



Caspases iniciadoras possuem um pró-domínio longo que contém um *domínio de recrutamento de caspases (CARD)* – Ligação a proteínas adaptadoras em complexos de ativação quando a célula recebe um sinal para entrar em apoptose – Ativação das caspases iniciadoras por proximidade

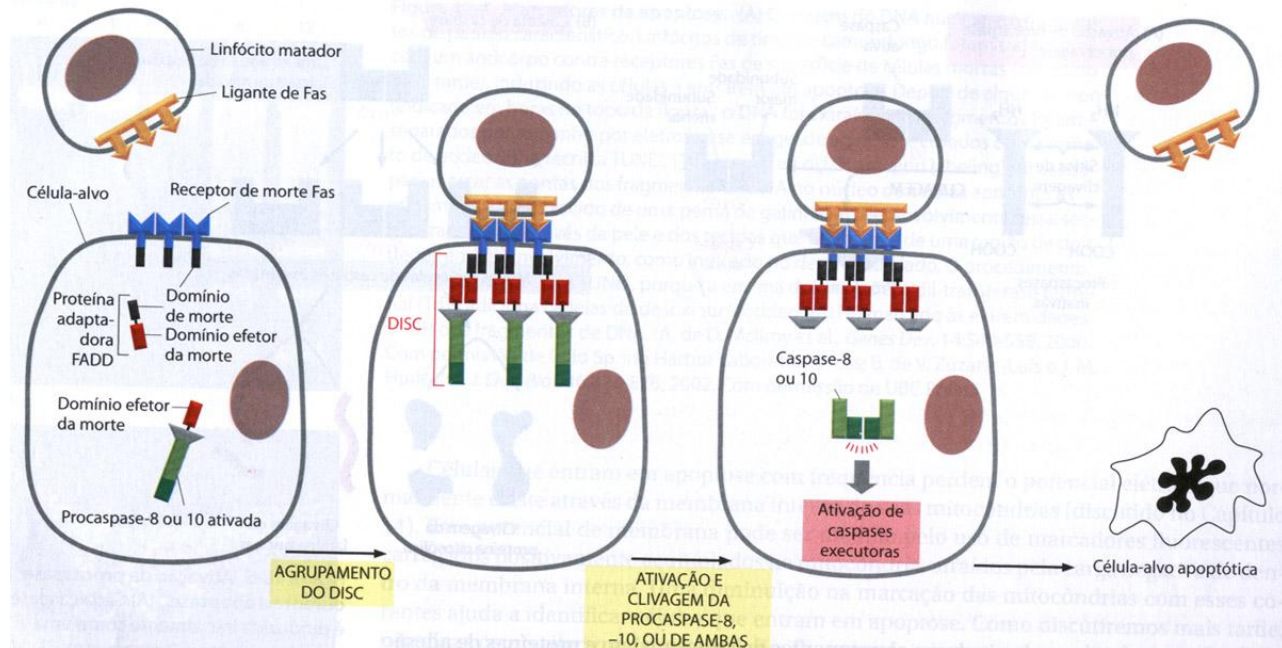
A apoptose depende de uma cascata proteolítica intracelular mediada por caspases

- Laminas nucleares, outros componentes do citoesqueleto, proteínas de adesão celular e inibidores de endonucleases são alguns dos **alvos de procaspases executoras**;
- A cascata de caspase é destrutiva, autoamplificadora e irreversível (após alcançar um ponto crítico na via de destruição, ela não pode voltar atrás);
- As caspases requeridas para a apoptose variam de acordo com o tipo celular e o estímulo;
- As duas vias de sinalização melhor entendidas que podem ativar a cascata de caspases levando à apoptose são chamadas de **via extrínseca e via intrínseca**;

Receptores de superfície celular ativam a via extrínseca da apoptose

- Proteínas de sinalização extracelular ligam-se a receptores de morte na superfície celular, o qual possuem um *domínio de morte* intracelular que dispara a via extrínseca da apoptose;
- Os receptores de morte são homotrímeros que pertencem à *Família de receptores do fator de necrose tumoral* (ex. receptor para TNF e receptor de morte *Fas*);
- Complexo de sinalização indutor de morte (DISC);
- Muitas células produzem proteínas inibidoras capazes de controlar a via extrínseca: Inibidores de ativação da via extrínseca (receptores armadilhas - não possuem o domínio de morte; FLIPs - proteínas bloqueadoras que parecem caspases iniciadoras mas não possuem o domínio proteolítico;

Via extrínseca da apoptose ativada por meio de receptores de morte *Fas* ativados por linfócitos (citotóxico) killer

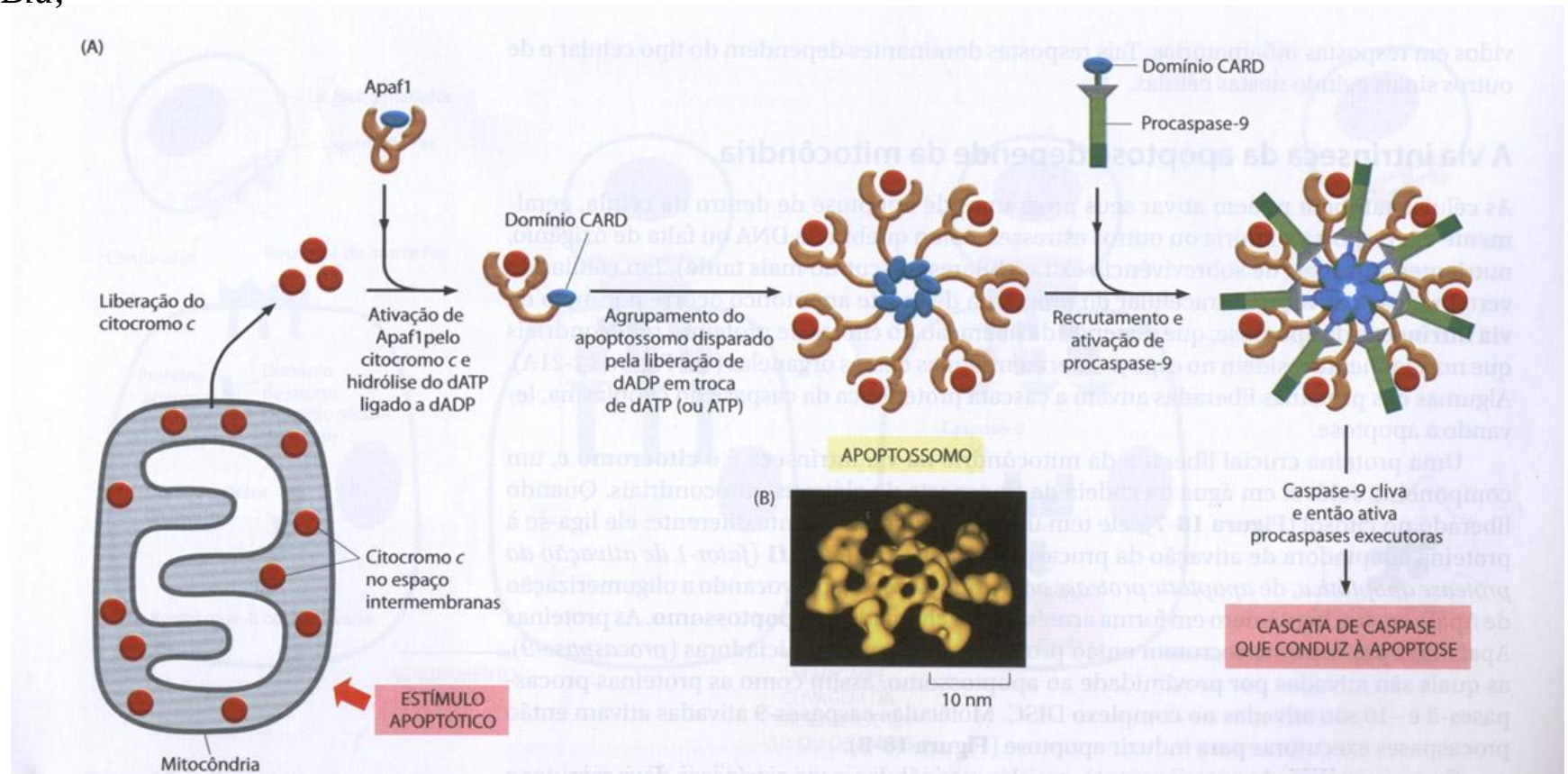


Receptores de superfície celular ativam a via extrínseca da apoptose

- Em algumas circunstâncias, receptores de morte ativam outras vias de sinalização que não levam à apoptose (ex. receptores TNF podem ativar a via NFκB a qual pode promover a sobrevivência celular e ativar genes envolvidos em respostas inflamatórias);

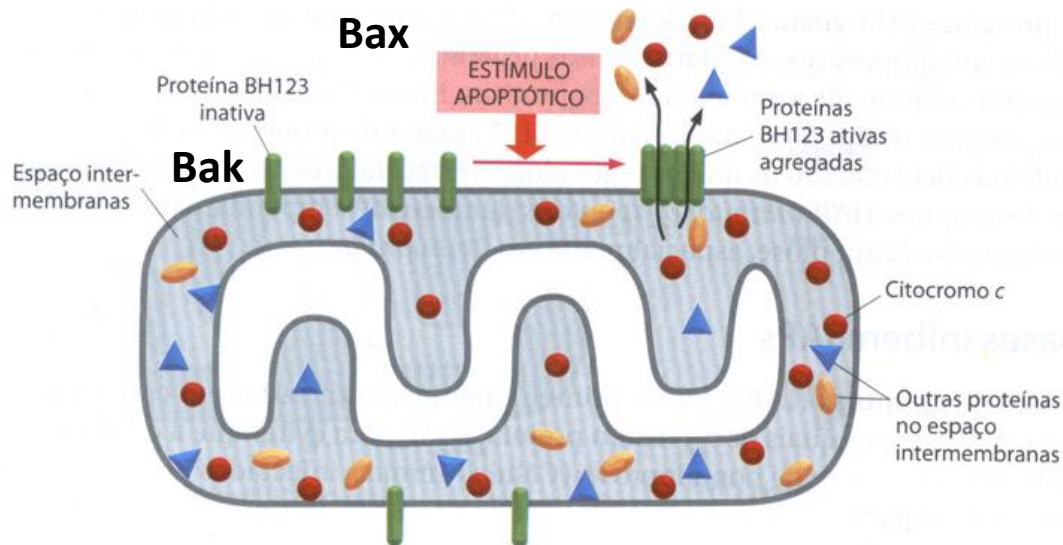
A via intrínseca da apoptose depende da mitocôndria

- O programa de apoptose pode ser ativado de dentro da célula, geralmente em resposta a injúrias ou outros estresses, como quebra de DNA ou falta de oxigênio, nutrientes, ou de sinais de sobrevivências extracelulares;
- Liberação no citosol de proteínas mitocondriais (ex. citocromo c) que ativam a cascata proteolítica das caspases;
- Procaspases iniciadoras (procaspase-9) são ativadas por proximidade ao apoptossomo;
- Em algumas células a via extrínseca ativa a via intrínseca para amplificar o sinal apoptótico, via um membro da família de proteínas Bcl2 (regulador intracelular da apoptose) – a proteína BH3- apenas *Bid*;



Proteínas Bcl2 regulam a via intrínseca da apoptose

- A família de proteínas Bcl2 de mamíferos controla a via intrínseca principalmente pelo controle da liberação do **citocromo c** e de **outras proteínas mitocondriais no citosol**;
- Algumas proteínas Bcl2 são proapoptóticas e outras são antiapoptóticas e estas se combinam formando heterodímeros, nos quais ocorre a inibição da atividade de ambas as proteínas;
- O balanço entre as atividades dessas duas classes funcionais de proteínas Bcl2 determinam se as células vivem ou morrem pela via intrínseca da apoptose;
- Proteínas Bcl2 antiapoptóticas – Bcl2 e Bcl-X_L (compartilha 4 domínios de homologia com Bcl2 – BH1-4)
- Proteínas Bcl2 proapoptóticas – **Subfamília das proteínas BH123**, as principais são *Bax* e *Bak* (não possuem domínio BH4) e **subfamília das proteínas BH3-*apenas*** (*Bad*, *Bid*, *Bim*, *Puma* e *Noxa*) – compartilham somente o domínio BH3;



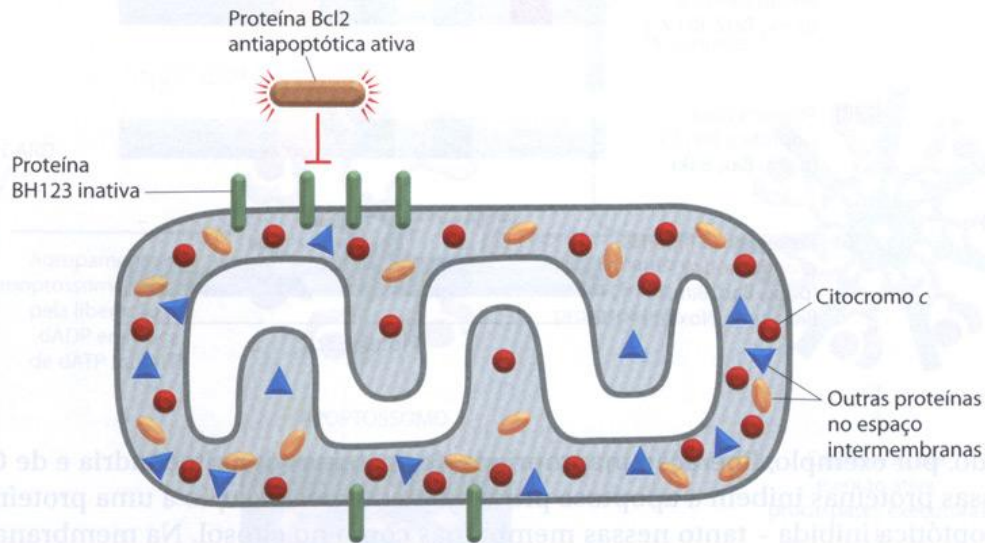
Proteínas Bcl2 regulam a via intrínseca da apoptose

- **Bak e Bax** são as principais BH123 para que a via intrínseca em células de mamíferos.
- **Bak e Bax** também atuam na superfície no RE e na membrana nuclear. Quando ativadas em resposta ao estresse de RE, elas liberam Ca^{2+} no citosol, o que ajuda a ativar a via intrínseca dependente de mitocôndria da apoptose por um mecanismo ainda pouco entendido;
- As proteínas Bcl2 antiapoptóticas também estão presentes na superfície citosólica da membrana mitocondrial externa, do RE e do envelope nuclear, inibindo a apoptose por meio de ligação às proapoptóticas;
- Proteínas **BH3-apenas** são a maior subclasse de proteínas da família Bcl2, elas promovem apoptose por meio da inibição de proteínas antiapoptóticas;
- Por um mecanismo pouco entendido, proteínas **BH3-apenas** promovem o agregamento de Bak e Bax na superfície mitocondrial, o qual induz a apoptose;

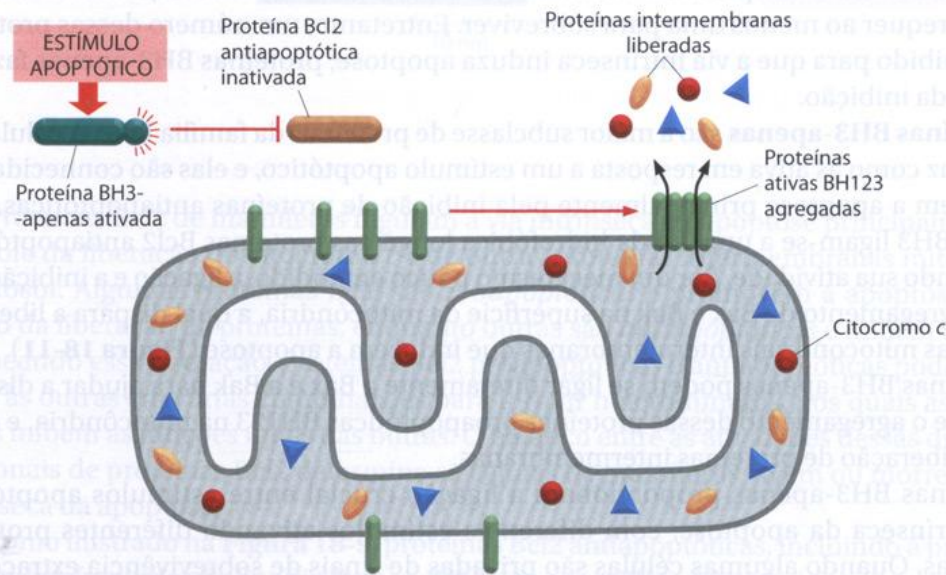
Proteínas Bcl2 regulam a via intrínseca da apoptose

- Quando uma célula é privada de sinais de sobrevivência, uma via de sinalização leva a codificação da proteína BH-apenas *Bim*, a qual dispara a via intrínseca;
- Em resposta ao dano no DNA, a proteína supressora de tumor p53 promove a codificação das proteínas BH3-apenas *Puma e Noxa*, que disparam a via intrínseca;

(A) VIA INTRÍNSECA INATIVA



(B) ATIVAÇÃO DA VIA INTRÍNSECA

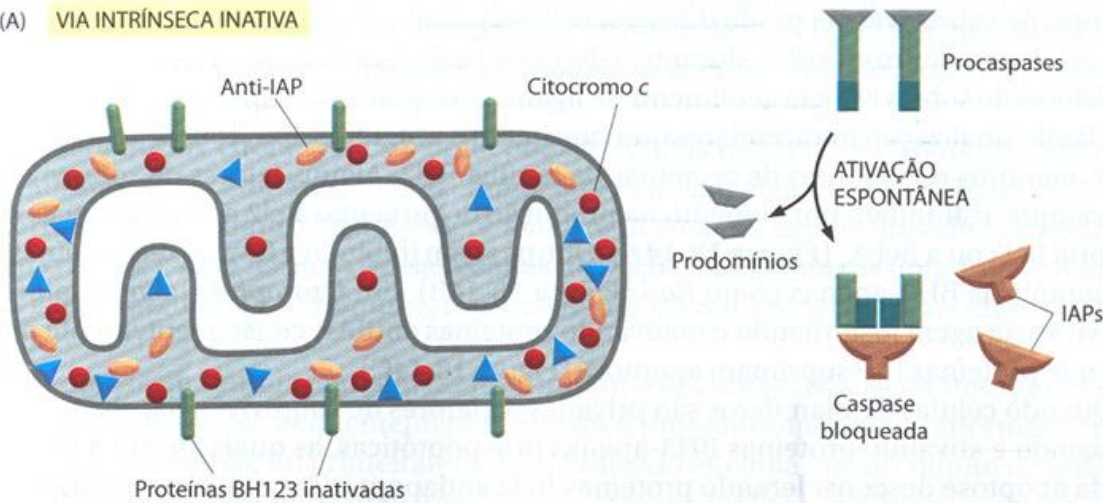


- Quando receptores de morte ativam a via extrínseca, a caspase-8 cliva Bid, produzindo a forma truncada tBid, que se transloca para a mitocôndria onde inibe proteínas Bcl2 antiapoptóticas e causa a agregação de BH123 proapoptóticas;
- Bid, Bim e Puma são os ativadores mais potentes da apoptose da subfamília das proteínas BH3-apenas, pois podem inibir todas as proteínas Bcl2 antiapoptóticas;
- Proteínas Bcl2 não são os únicos reguladores intracelulares de apoptose. Inibidores de apoptose (IAPs) atuam na supressão da apoptose via inibição da atividade das caspases;

Caspases inibem IAPs

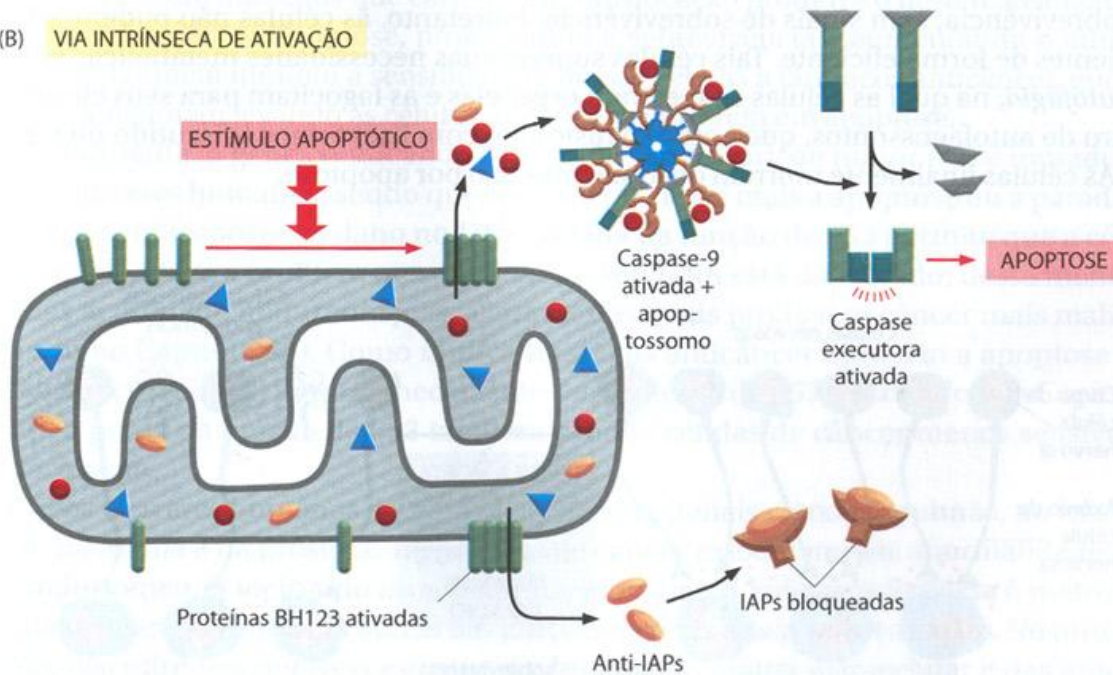
- IAPs foram inicialmente identificadas em vírus de insetos (baculovírus), que as codificam para evitar que a célula hospedeira infectada pelo vírus se mate por apoptose;
- Sabe-se que IAPs possuem um ou mais domínios BIR (repetição IAP de baculovírus), que permitem a elas se ligarem e inibirem caspases ativadas;
- Algumas IAPs marcam caspases por poliubiquitação para destruição pelos proteossomos;
- Em *Drosophila* a inibição proporcionada por **IAPs** pode ser neutralizada por proteínas **antiIAPs**;
- Existem 5 antiIAPs em *Drosophila*, dentre elas *Reaper*, *Grim* e *Hid*;
- O balanço entre IAPs e antiIAPs é firmemente regulado, sendo crucial para o controle da apoptose em moscas;
- O papel de proteínas antiIAPs na apoptose em mamíferos é mais controverso;
- AntiIAPs são liberadas do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol quando a via intrínseca é ativada, bloqueando IAPs no citosol e promovendo a apoptose. No entanto quando genes que codificam as antiIAPs Smac (DIABLO) e Omi são inativados, a apoptose não é afetada.

(A) VIA INTRÍNSECA INATIVA



Na ausência de estímulos apoptóticos, as IAPs evitam apoptoses acidentais causadas por ativação espontânea de procaspases

(B) VIA INTRÍNSECA DE ATIVAÇÃO



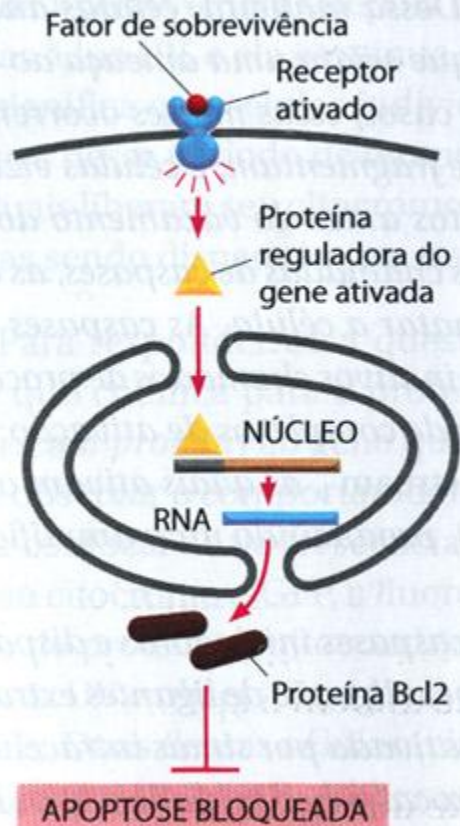
Fatores de sobrevivência extracelulares inibem a apoptose em várias vias

- Fatores de sobrevivência geralmente se ligam a receptores de superfície celular, que ativam vias de sinalização intracelulares que suprimem a apoptose;
- Alguns fatores de sobrevivência estimulam um aumento na produção de proteínas Bcl2 antiapoptóticas, como Bcl2 e Bcl-X_L;
- Outros inibem a função de proteínas proapoptóticas BH3-apeenas, como *Bad*;
- Em *Drosophila*, alguns fatores de sobrevivência agem fosforilando e inativando proteínas antiIAP, permitindo que IAPs inibam a apoptose;

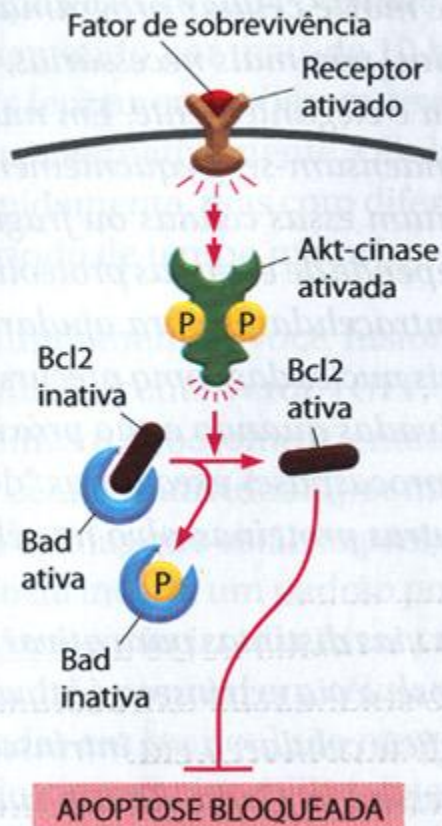
Apoptose excessiva ou insuficiente pode contribuir para doenças

- Em muitas doenças humanas o número excessivo de células que entram em apoptose pode causar dano tecidual (ex.: ataque cardíaco, derrame);
- Acúmulo excessivo de células levam ao desenvolvimento de doenças (ex.: doenças autoimune e câncer)

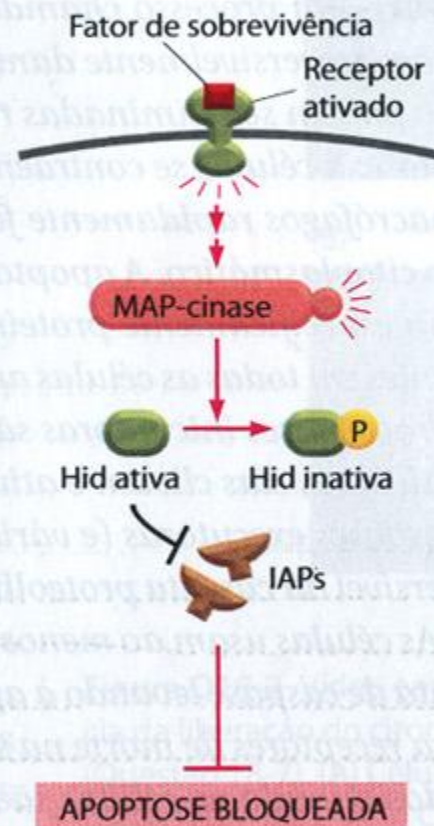
(A) Produção aumentada de proteína Bcl2 antiapoptótica



(B) Inativação da proteína Bcl2 BH3-apeas proapoptótica



(C) Inativação de anti-IAPs



Conceito chave

A apoptose é o destino automático de uma célula em um organismo multicelular...

...a menos que a célula receba sinalização por fatores tróficos (ou de sobrevivência)

Em outras palavras: Todas as células necessitam de ESTÍMULOS TRÓFICOS para sobreviverem, na ausência desses fatores cometem suicídio.

Interações diretas entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas desencadeiam a apoptose na ausência de fatores de sobrevivência.

A ligação desses fatores na superfície celular altera tais interações resultando em sobrevivência celular.