

DIFERENCIAÇÃO CELULAR E APOPTOSE

RICARDO SCHER

META

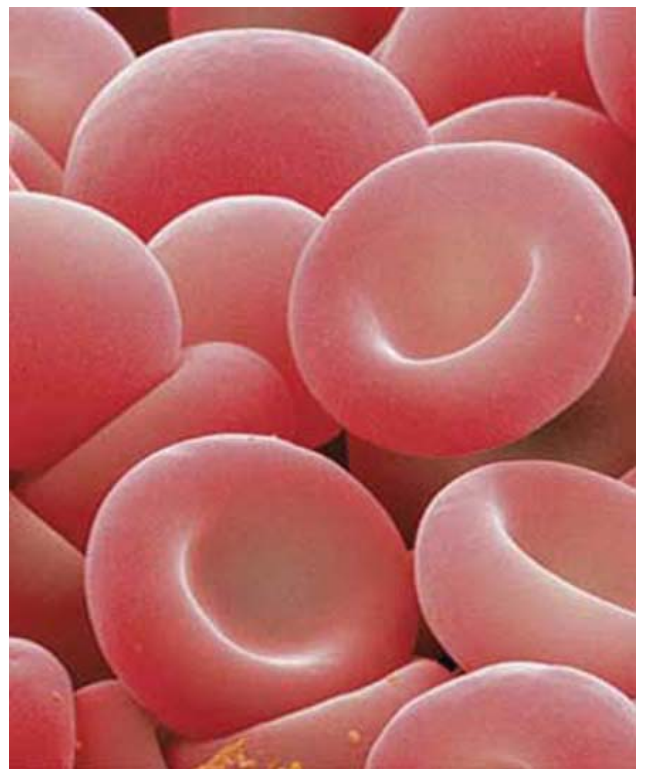
Apresentar os principais eventos responsáveis pela geração da diversidade morfológica e funcional das células em um organismo eucarionte multicelular assim como os processos de morte celular.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
conhecer os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação celular;
definir potencialidade e diferenciação;
reconhecer o papel do controle da expressão gênica no processo de diferenciação celular;
compreender o processo de morte celular programada ou apoptose;
reconhecer os eventos moleculares que controlam a morte celular programada.

PRÉ-REQUISITOS

Antes de iniciar esta última aula, o aluno deverá estudar os aspectos relacionados aos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário dos vertebrados, ao processo de comunicação celular por sinais químicos, assim como rever os conceitos de gene e expressão gênica. Para isso, ele deve consultar a bibliografia apresentada assim como outras fontes de informações.



O glóbulo vermelho origina-se em uma célula localizada na medula vermelha dos ossos. Trata-se de uma célula grande (de 15 a 20 milésimos de milímetro) que vai se diferenciando e se especializando até formar uma hemácia (de 7 a 8 milésimos de milímetro), uma célula sem núcleo repleta de hemoglobina e de forma bicôncava, características fundamentais para a realização de suas funções.

(Fonte: <http://farm3.static.flickr.com>)

INTRODUÇÃO

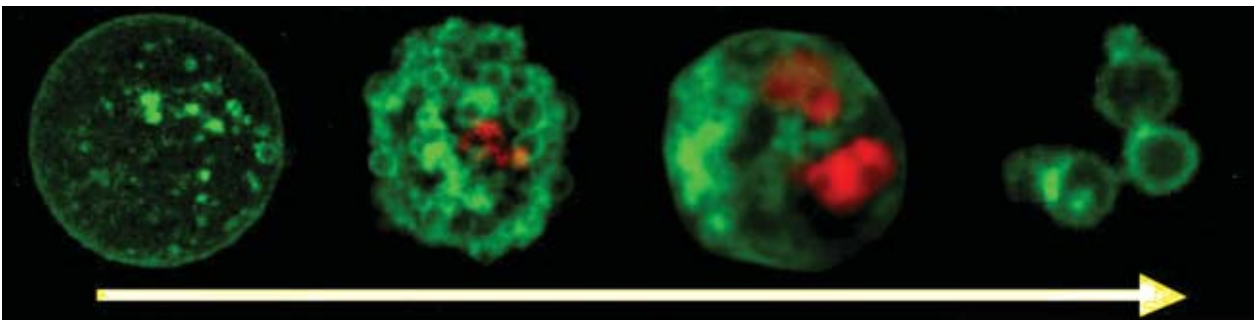
Caro estudante.

Chegamos à nossa última aula. Espero que a jornada que traçamos juntos até agora tenha rendido bons frutos para você. Espero ainda que suas expectativas sobre a biologia das células tenham sido satisfatoriamente contempladas. Mas, antes de encerrarmos e de você fechar este livro, te convido para uma última e fabulosa aventura neste mundo invisível das células. Nesta viagem veremos que durante a evolução dos organismos multicelulares surgiram novos mecanismos para diversificar os tipos celulares e para organizá-los em tecidos funcionais. Do mesmo modo, foram desenvolvidos mecanismos especiais para eliminar células envelhecidas ou não mais necessárias para o organismo. Estou me referindo aos processos de diferenciação celular e de morte celular programada ou apoptose.

A diferenciação celular é o processo pelo qual as células de um organismo começam a se tornar diferentes em sua forma, composição e função. A partir de então, surgem no indivíduo populações de células distintas, formando estruturas, órgãos e sistemas que interagem entre si e desempenham as diversas funções necessárias à sua sobrevivência.

Por outro lado, em muitas circunstâncias como, por exemplo, durante o desenvolvimento dos órgãos, para a formação de ductos e orifícios e para a remoção de tecidos desnecessários (como as membranas interdigitais) grupos inteiros de células devem ser eliminados pelo processo de morte celular.

É, portanto, com estes dois fenômenos que se posicionam nos dois extremos da linha da vida de uma célula que iremos concluir esta disciplina.



Fases da apoptose numa célula cardíaca.
(Fonte: <http://mastologia.files.wordpress.com>)

DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Os organismos multicelulares apresentam seu corpo constituído por diversos tipos celulares que apresentam formas e funções específicas. Esta diversidade depende, parcialmente, dos padrões específicos das divisões mitóticas de uma célula ovo ou zigoto. Estas divisões são acompanhadas pela diferenciação morfológica e funcional de modo que, à medida que o organismo se desenvolve, novos tipos ou linhagens celulares são originados, (figura 10-01). Para entender melhor esta questão você pode comparar, por exemplo, o corpo de um animal a uma sociedade organizada onde os indivíduos exercem funções especializadas, como professores, médicos ou advogados. Ao nascer, nenhum deles tinha sequer noção que carreira iria seguir. Porém, em dado momento estes indivíduos definiram que caminho seguir e se qualificaram, tornando-se diferenciados uns dos outros. Do mesmo

modo que nesta sociedade, as células se associam de forma cooperativa e também competitiva. Isso de algum modo aumenta muito a eficiência do conjunto, porém, torna os indivíduos na sociedade, assim como as células no organismo, cada vez mais dependentes uns dos outros.

Sabemos que nos animais a diferenciação celular começa nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário, porém, um dos maiores enigmas da biologia do desenvolvimento é a forma como aparecem as diferenças entre as células durante o curso da embriogênese.

Para que você compreenda bem este aspecto da biologia celular, é importante apresentar algumas informações sobre as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário.

A EMBRIOGÊNESE INICIAL E O DESTINO CELULAR

Nos animais de reprodução sexuada, após ocorrer a fecundação, o zigoto formado sofre repetidas divisões mitóticas que são rápidas e apresentam intérfases muito curtas, onde ocorre basicamente a duplicação do DNA nuclear. Durante as divisões iniciais, o citoplasma é segmentado, ou seja, sofre clivagens sucessivas fazendo com que as células filhas se tornem

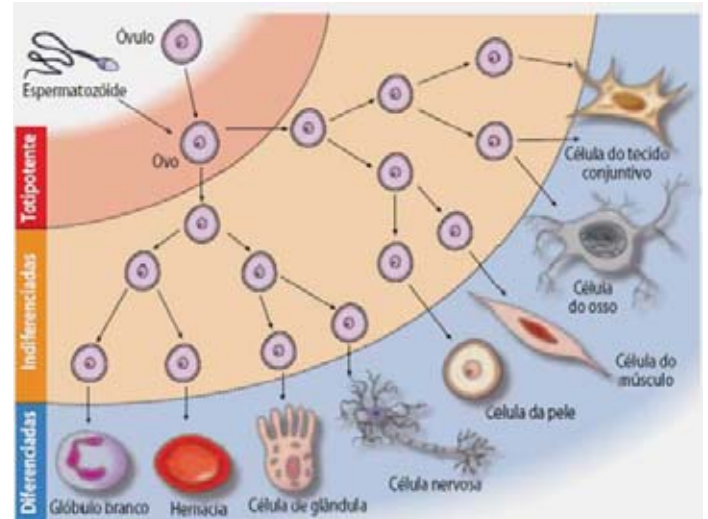


Figura 10-01 - Esquema mostrando a fecundação seguida de proliferação de células indiferenciadas as quais irão se especializar nos diversos tipos celulares como: glóbulos brancos, hemácias, células de glândula etc.

(Fonte: <http://disciplinex.wordpress.com>)



Figuras 10-02A a E - Os primeiros estágios do desenvolvimento de um mamífero desde a fecundação, passando pela divisão do embrião em pequenos blastômeros que formam a mórula até o estágio de blástula. (Fonte: Alberts et al. (2004) Biologia Molecular da Célula 4ª. Ed. Cap. 21)

cada vez menores e o volume da massa de células total não aumente. Deste modo, ao final de algumas divisões o embrião adquire a forma de uma esfera sólida com aspecto de uma amora, e por isso recebe o nome de mórula (Figura 10-02A-D). Nesta etapa, o número de células que constitui o embrião varia de acordo com a espécie. Uma mórula humana, por exemplo, é formada por uma massa de 16 células ou blastômeros, ao passo que a de um ouriço do mar tem 32. Após o estágio de mórula, as células continuam a se dividir, passando a produzir um

líquido que se acumula no interior do embrião formando aí uma cavidade chamada blastocele. Isto converte o embrião em uma esfera oca, que passa a se chamar blástula (Figura 10-02E). A partir da blástula, o embrião passa por complexas transformações que culminam no aparecimento de três linhagens de células distintas: o endoderma, o mesoderma e o ectoderma, o que caracteriza o estágio de gástrula (figura 10-03).

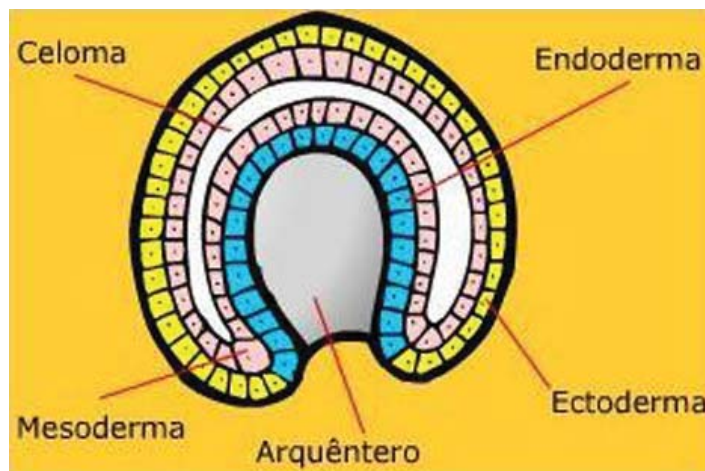


Figura 10-03 - Representação esquemática da gástrula de mamífero evidenciando a diferenciação dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma. (Fonte: <http://www.sobiologia.com.br>)

Durante as 3 ou 4 primeiras divisões celulares do zigoto, ou seja, até a fase de mórula, todas as células que compõem o embrião são potencialmente capazes de se desenvolver em qualquer tipo celular. Isto quer dizer que os blastômeros ainda não estão diferenciados, ou seja, o destino funcional destas células ainda não foi determinado nesta fase do desenvolvimento. A fixação do destino funcional das células tem início na gastrulação, quando acontecem modificações nas células embrionárias que determinam seu futuro. Este fato pode ser comprovado quando se transplanta partes de

um embrião para outro embrião da mesma espécie (figura 10-04). Se esta transferência é feita antes da gastrulação, as células se desenvolvem de acordo com o lugar para onde foram transplantadas. Por exemplo, se tomarmos um blastômero de *Drosophila* e o implantarmos na porção anterior de um embrião de *Drosophila* em fase mais adiantada de desenvolvimento, este blastômero irá se dividir e se transformará em uma célula do sistema nervoso assim como as que já se encontravam neste ambiente. Porém, se esta operação for feita depois da gastrulação, as células irão se desenvolver

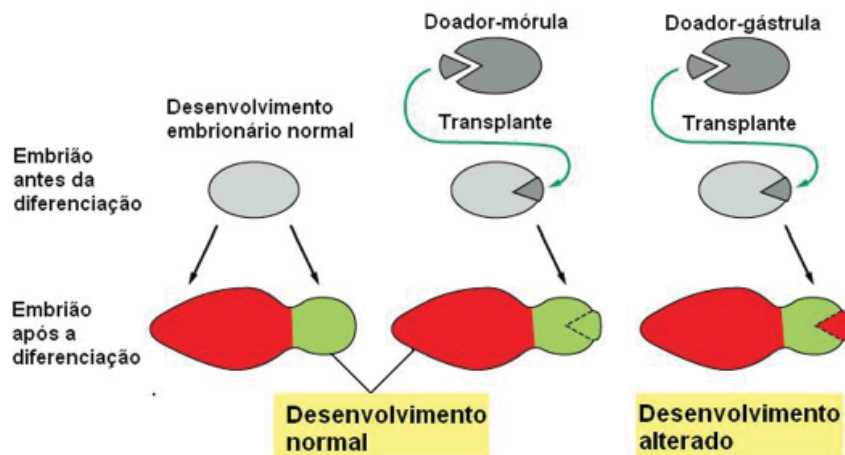


Figura 10-04 - Esquema de um experimento demonstrando o resultado do transplante de células antes (mórula) e após o período de determinação celular (gástrula) sobre o desenvolvimento do embrião.

(Fonte: Alberts et al. (2004) *Biologia Molecular da Célula* 4ª. Ed. Cap. 21)

com características próprias do local de onde foram retiradas. Assim, se ao invés de um blastômero transplantarmos uma célula da linhagem mesodérmica de uma gástrula, para a mesma porção anterior do embrião mais desenvolvido, esta célula irá se dividir e dará origem a um dos tipos celulares derivados do mesoderma e não ao sistema nervoso, que deriva do ectoderma. Isso significa que, ainda nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, antes que a diferenciação aconteça, ocorre a chamada determinação celular, que decide o destino da célula.

Mas o que faz com que estas células tornem-se determinadas nesta etapa do desenvolvimento? Antes de respondermos a esta pergunta, é melhor explorarmos os aspectos moleculares da diferenciação.

BASES MOLECULARES DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Considere que todas as informações necessárias para a formação de uma célula encontram-se “impressas” em seus genes e que as células adquirem sua identidade à medida que o desenvolvimento embrionário avança. Deste modo, você deve estar se perguntando como poderiam os genes controlar o processo que leva uma única célula a dar origem a um organismo constituído por células tão diferentes? A princípio, você poderia pensar em duas possibilidades: (1) a perda progressiva de genes desnecessários ao metabolismo da célula diferenciada, à medida que a diferenciação fosse ocorrendo ou (2) a ativação dos genes necessários acompanhada da inativação daqueles desnecessários durante o processo de diferenciação celular. Se a primeira

possibilidade fosse correta, a diferenciação celular seria consequência da perda de informação genética. Deste modo, o conteúdo de DNA de uma célula nervosa, por exemplo, seria diferente do de uma célula muscular. Isto explicaria claramente porque uma célula nervosa não pode se diferenciar em uma célula muscular e vice-versa. Porém, esta hipótese de perda gênica não é verdadeira, uma vez que todas as células de um mesmo organismo, independente de seu nível de diferenciação, contêm os mesmos genes. Isto foi demonstrado ainda na década de 50, por meio de experimentos envolvendo o transplante nuclear em anfíbios. Nestes experimentos, ovócitos de rã foram irradiados com luz ultravioleta a fim de destruir seu núcleo, mantendo seu citoplasma intacto. Paralelamente, o núcleo intacto de uma célula do epitélio intestinal de um girino adulto foi removido e, com o auxílio de uma micropipeta, foi inserido no ovócito previamente anucleado. Este processo teve um efeito semelhante a fecundação, fazendo com que o ovócito transplantado começasse a se dividir como um embrião o qual, ao final de algumas semanas se desenvolveu em um girino normal (Figura 10-05).

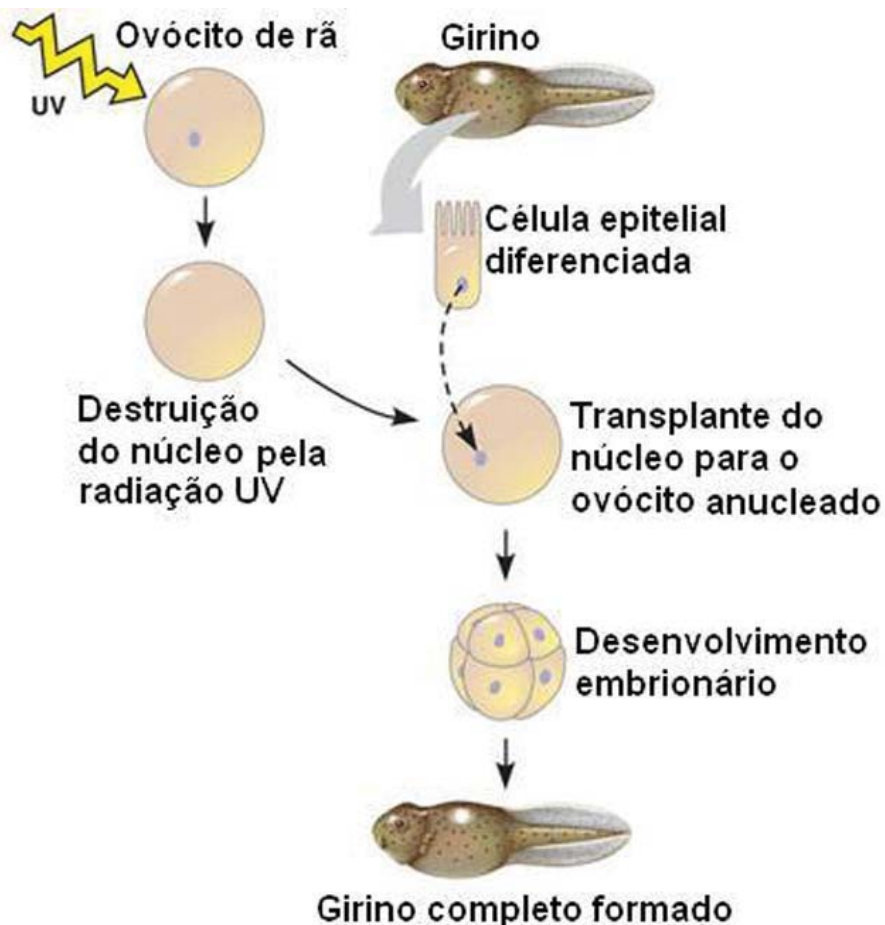


Figura 10-05 Transplante nuclear: diagrama de um experimento mostrando que o núcleo de uma célula diferenciada (epitélio) contém todos os genes necessários para controlar a formação de um organismo adulto.

(Fonte: Adaptado de Alberts et al. (2004) *Biologia Molecular da Célula* 4ª. Ed. Cap. 21)

Você concorda que isto não teria sido possível se o núcleo da célula epitelial houvesse perdido parte de seus genes durante sua diferenciação? Portanto, para explicar como os genes controlam o processo de diferenciação celular, nos restou a segunda possibilidade apresentada no início deste tópico. Com isso, podemos dizer que o caminho que conduz uma célula desde o estado embrionário mais inicial até sua total especialização consiste em uma série de expressões e repressões gênicas controladas. Se por um lado isto explica a manutenção dos genes ao longo da diferenciação, por outro fica clara a participação de algum elemento contido no citoplasma do ovócito no processo de programação da atividade gênica e consequente determinação celular durante o desenvolvimento do novo indivíduo.

Atualmente sabe-se que a determinação celular pode acontecer de várias maneiras, sendo uma delas a segregação citoplasmática de moléculas determinantes no momento da clivagem do ovo. Esta segregação ocorre de forma assimétrica, separando diferentes componentes citoplasmáticos que tornarão o citoplasma das células formadas qualitativamente diferentes. Para esclarecer melhor estes aspectos, observe a Figura 10-06A que representa uma célula ovo e alguns de seus componentes (representados na figura por formas geométricas) assimetricamente distribuídos no citoplasma. Esta característica faz com que, à medida que as clivagens iniciais ocorrem, os novos blastômeros recebam diferentes conjuntos destes componentes citoplasmáticos (Figura 10-06B e C). E quem são e de que maneira estes componentes podem dirigir a determinação e a diferenciação celular? Estes determinantes citoplasmáticos são moléculas capazes de influenciar diretamente a atividade dos genes, definindo deste modo, quais as proteínas que serão produzidas na célula. Como cada blastômero recebe um conjunto diferente destes determinantes citoplasmáticos, em cada uma destas células um conjunto diferente de proteínas será produzido. Deste modo, todas as suas descendentes produzirão o mesmo conjunto de proteínas. Uma vez que são as proteínas que controlam todo o metabolismo celular, podemos concluir que, a linhagem celular que derivou

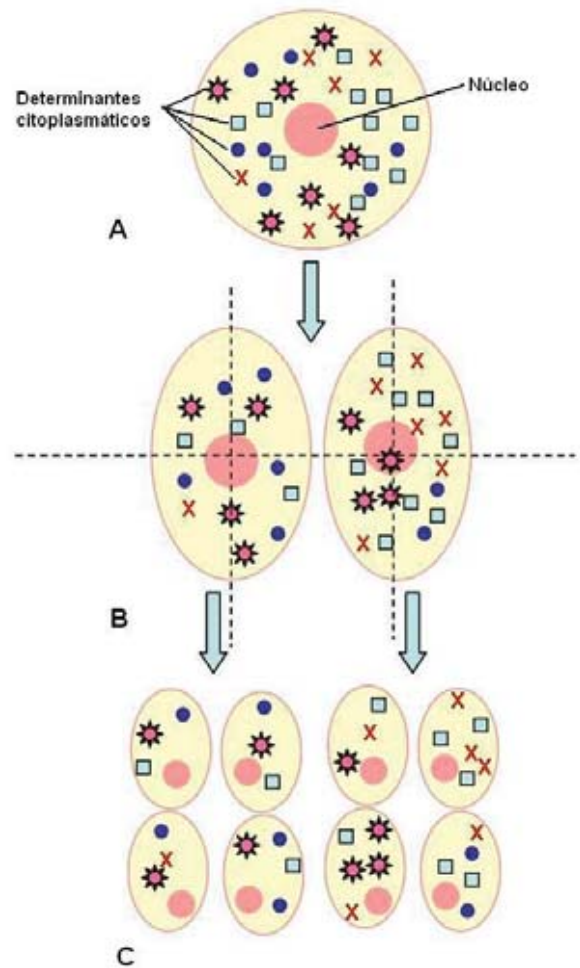


Figura 10-06A a C - A segregação assimétrica de fatores citoplasmáticos durante as primeiras divisões embrionárias resulta em blastômeros carregando diferentes conjuntos destes fatores o que ativa diferentes grupos de genes em cada linhagem celular resultante.

(Fonte: produzido pelo autor)

Morfógenos

Toda substância difusível, que produz respostas diferentes em células idênticas de acordo com o nível de concentração com que chega a elas.

daquele (ou daqueles) blastômero e que recebeu fatores que controlam os genes de proteínas relacionadas, por exemplo, ao metabolismo de uma célula muscular, irá se diferenciar em células musculares. O mesmo se aplicaria a todos os demais tipos celulares que compõem um dado organismo. Agora ficou mais fácil compreender que, no experimento de transplante nuclear, foi a ação destes fatores, os determinantes citoplasmáticos do ovócito, que possibilitou a reprogramação da atividade dos genes do núcleo diferenciado enxertado neste ovócito.

Além da ação de fatores internos, nas etapas mais iniciais do desenvolvimento embrionário as células também podem sofrer diferencialmente a

influência de substâncias presentes no meio, os **morfógenos**. Nos embriões de mamíferos, por exemplo, durante seu traslado pela tuba uterina, suas células podem ser alcançadas por diferentes concentrações de substâncias presentes no meio, a depender de sua localização na mórula. Deste modo, os blastômeros mais periféricos receberiam maiores concentrações destas substâncias que aqueles mais internos, o que poderia contribuir para o desenvolvimento diferencial destes dois grupos celulares (figura 10-07). Esta diferenciação se deve ao fato de que altas concentrações do morfógeno ativariam grupos de genes diferentes daqueles ativados por baixas concentrações.

Outra forma de determinação celular diz respeito à indução embrionária, que envolve a interação entre células ou tecidos, condicionando células próximas a se especializarem em uma determinada direção. Como vimos anteriormente, a medida que o desenvolvimento progride, o embrião perde a forma de mórula, na qual todas as células são aparentemente idênticas e se transforma em blástula e finalmente em gástrula (figura 10-08). Nestes estágios mais adiantados, já é evidente que as células embrionárias

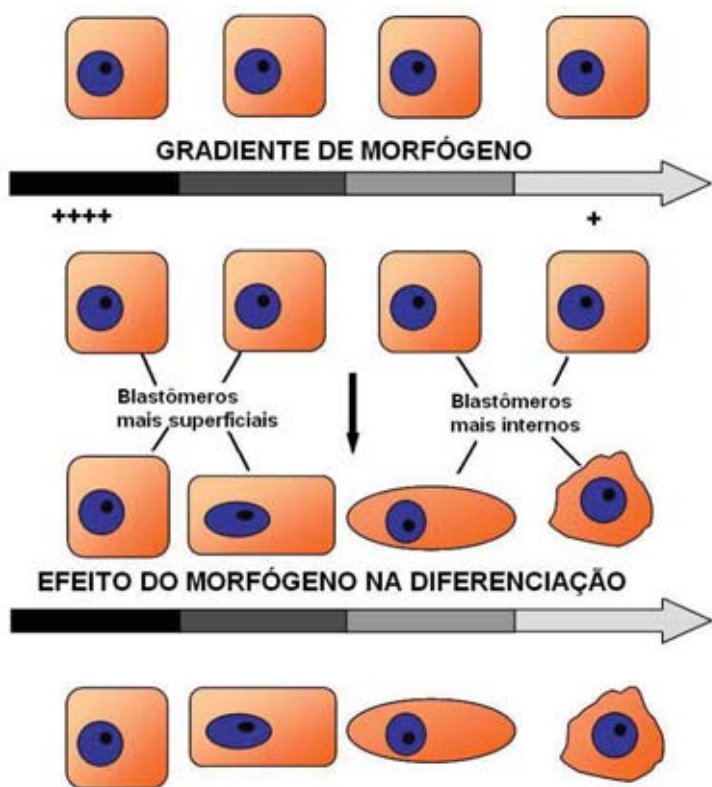


Figura 10-07 - Limiar de resposta a um gradiente de morfógeno. As células respondem de formas diferentes a cada concentração deste morfógeno, o que dá origem a diferentes tipos celulares. (Fonte: produzido pelo autor)

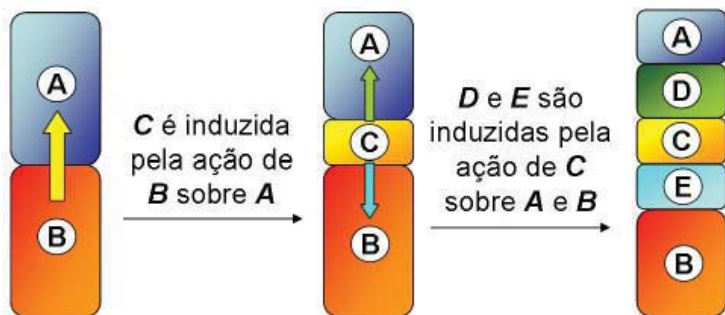


Figura 10-08 - Esquema mostrando que uma série de interações célula-célula induz a diferenciação de muitos tipos celulares. (Fonte: produzido pelo autor)

se distribuem em três diferentes camadas superpostas. Esta organização dá lugar a relações de vizinhança entre os grupos celulares o que torna possível a influência de algumas células sobre outras. Este mecanismo de diferenciação resulta da ação de células que agem enviando, por meio de moléculas por elas produzidas, sinais que estimulam células vizinhas a se diferenciarem em determinada direção. Neste caso o estímulo pode levar a diferenciação de novas células semelhantes àquelas que produziram o estímulo, ou pode conduzir à formação de um novo tecido adjacente ao tecido original. Um caso bem conhecido refere-se à ação que a **notocorda** exerce sobre o ectoderma que a recobre, no fim da fase de gástrula, induzindo-o a formar a placa neural, que dará origem ao futuro sistema nervoso (figura 10-09).

Com base no que foi visto até o momento podemos dizer que, antes de se diferenciarem, as células adquirem um “compromisso” de se modificarem em uma dada direção. Este compromisso prévio, denominado determinação, é irreversível e como vimos, pode ser fixado por determinantes citoplasmáticos ou por substâncias externas indutoras. Portanto, a diferenciação só se efetiva em um período após a célula ter sofrido sua determinação.

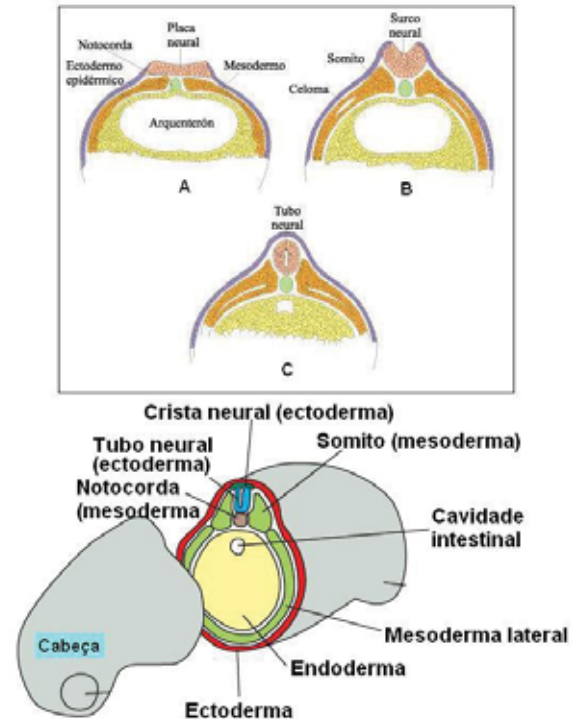


Figura 10-09 - O quadro mostra a influência da notocorda (originada do mesoderma) sobre o ectoderma levando à formação do tubo neural (A - C). Abaixo um corte transversal de um embrião mostrando os elementos vistos no quadro. (Fonte: Alberts et al. (2004) Biologia Molecular da Célula 4ª. Ed. Cap. 21)

DIFERENCIAÇÃO VERSUS POTENCIALIDADE

Com tudo que vimos até agora nesta aula, podemos dizer que diferenciação corresponde ao grau de especialização da célula. Cabe agora introduzirmos uma outra característica relacionada ao grau de especialização celular: a potencialidade, que é a capacidade que a célula tem de originar outros tipos celulares. Deste modo, você pode concluir que, em qualquer célula, quanto maior sua potencialidade, menor seu grau de diferenciação e vice-versa. Seguindo este raciocínio, a célula-ovo, assim como os primeiros blastômeros da maioria das espécies de animais, possuem 100% de potencialidade e apresentam grau zero de diferenciação. Por isso, podem originar qualquer tipo celular e são consideradas células totipotentes. Estas são as chamadas células tronco embrionárias, as quais, nos últimos tempos, vêm causando toda a polêmica que você, com toda certeza, deve ter acompanhado!

Notocorda

Tecido mesenquimal que forma o eixo primitivo do embrião em torno do qual se constituirá o esqueleto axial, ou seja, a coluna vertebral.

A formação de gêmeos idênticos se dá quando a massa de poucas células que forma o embrião se divide naturalmente em dois grupos de células que passam a se desenvolver independentemente. Para que o desenvolvimento ocorra sem problemas, esta separação deve acontecer numa etapa que precede a gastrulação, quando as células ainda estão indiferenciadas. A partir do desenvolvimento das técnicas de fertilização artificial e manipulação de embriões tornou-se possível criar artificialmente animais gêmeos idênticos. Isto é feito com muita frequência para reproduzir um grande número de bovinos com boas qualidades econômicas num curto período de tempo. Isto se dá a partir de embriões crescendo em laboratório. Quando estes atingem a fase de quatro ou oito células, elas são isoladas e estimuladas a continuar a se dividir. Quando elas atingem novamente a fase de mórula, cada uma é implantada no útero de um animal receptor. Com isso, ao final do tempo de uma gestação, nascerão quatro ou oito animais, idênticos entre si. A partir de células embrionárias indiferenciadas, é possível também gerar órgãos ou tecidos inteiros. Para isso, a massa de células que compõem a mórula deve ser dissociada, os blastômeros isolados e estimulados a se diferenciarem em um tipo de célula de interesse. Deste modo, podem ser produzidos em laboratório órgãos para serem transplantados sem grandes problemas de rejeição, o que poderia rapidamente atender a demanda da sociedade. Porém, além desta técnica não estar totalmente dominada, tem-se o aspecto ético envolvido, uma vez que, para a produção deste órgão, um embrião humano deve ser destruído.

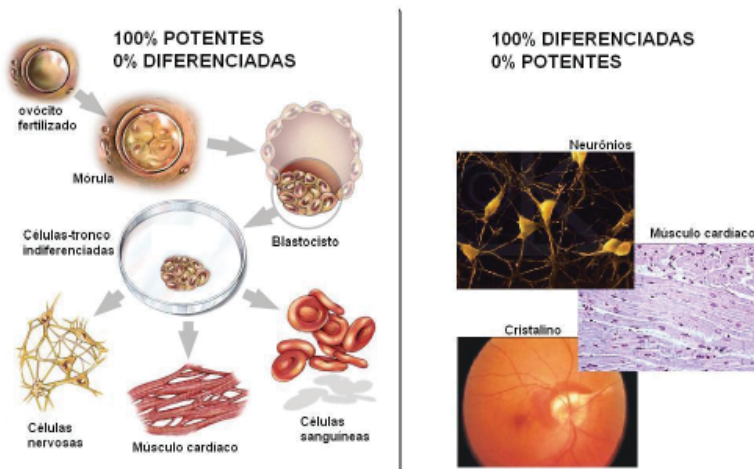


Figura 10-10 - Comparação entre o nível de potencialidade e de diferenciação entre células tronco e alguns grupos de células adultas. (Fonte: <http://theblackcordelias.files.wordpress.com>)

No outro extremo encontram-se, por exemplo, as células nervosas, as do cristalino e as do músculo cardíaco, que são 100% diferenciadas e têm potencialidade igual a zero. O grau de especialização destas células é tão grande que elas perderam até a capacidade de divisão mitótica, (figura 10-10). Estes exemplos correspondem a casos extremos visto que a maioria das células exibe graus intermediários de diferenciação e potencialidade. Esta variação no grau de diferenciação é eviden-

ciada em vários tecidos como na pele, no epitélio intestinal e na medula óssea, sendo crucial para a manutenção destes e de boa parte dos tecidos. O que fornece esta propriedade a estes tecidos é a presença de um conjunto de células tronco, que por serem distintas das células tronco embrionárias também são denominadas células fonte ou stem cells. Este grupo de células, específicas para cada tipo de tecido, se divide continuamente durante a vida do animal, produzindo novas células fonte, para manter seu estoque, assim como outras células diferenciadas, que irão repor aquelas que foram perdidas ou eliminadas do tecido a que pertencem.

Uma vez que estas células fonte só são capazes de se diferenciar em um tipo celular, e em alguns casos em poucos tipos celulares relacionados, elas não são totipotentes como os blastômeros, sendo assim consideradas pluripotentes. Por exemplo, as células fonte da epiderme produzem células que se diferenciam exclusivamente para formar novas células da pele, a fim de substituir aquelas que são continuamente eliminadas de sua superfície. Já as células fonte do epitélio intestinal podem originar tanto as células de absorção quanto as células caliciformes deste epitélio. Por outro lado, as células fonte da medula óssea vermelha apresentam potencialidade para originar toda a linhagem hematopoiética que engloba os leucócitos, os neutrófilos, os eosinófilos, os basófilos, os linfócitos e monócitos, assim como as hemácias e as plaquetas (figura 10-11). Devido a esta maior plasticidade as células fonte da medula óssea são consideradas alvos potenciais para uso em terapia celular.

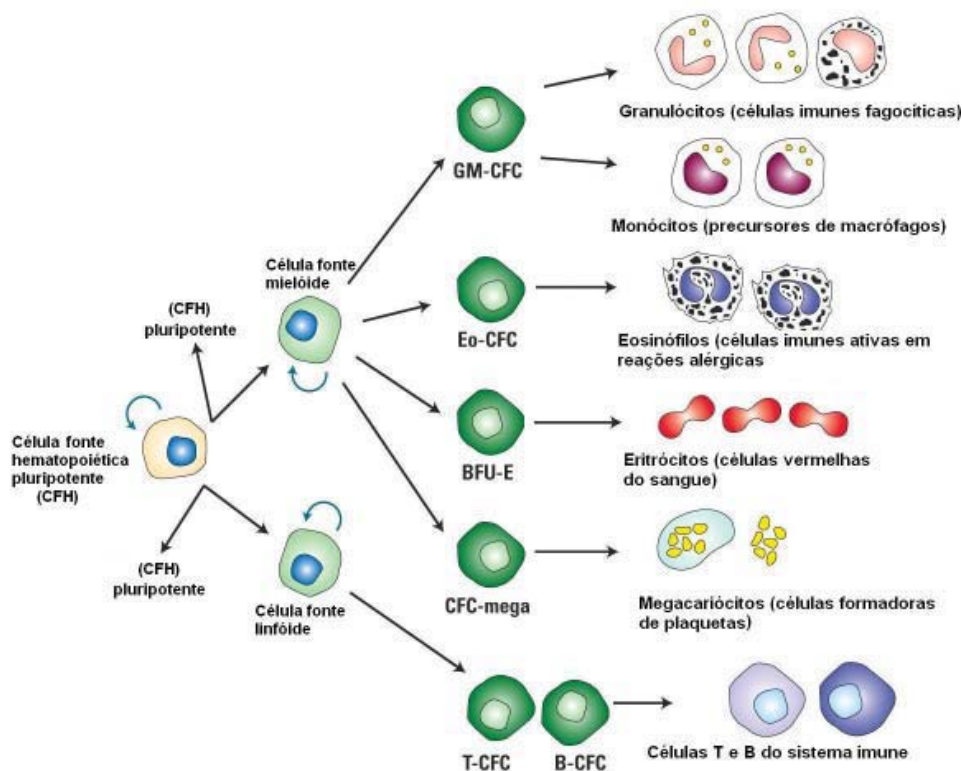


Figura 10-11 - Formação dos diversos tipos de células sanguíneas a partir de células pluripotentes hematopoiéticas da medula óssea. (Fonte: Lodish et al. (2005) Biologia Celular e Molecular 5ª. Ed. Cap. 22)

Estudos recentes mostraram que os elevados níveis de potencialidade apresentados pelas células fonte da medula óssea as tornam capazes de se diferenciar em vários outros tipos celulares, além das células sanguíneas. Muitas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de ampliar o uso destas células além do tratamento de doenças do sangue através do transplante de medula. Os avanços alcançados já permitem utilizar células de medula óssea para a produção de células cartilaginosas, ósseas e de outros tecidos, abrindo possibilidades, por exemplo, de neoformação e reconstituição de tecidos destruídos por doenças hereditárias ou adquiridas. Por se tratar de células de tecido adulto, seu uso para fins terapêuticos não esbarra nos entraves éticos e religiosos que rondam a terapia com células tronco embrionárias.

A DIFERENCIAÇÃO OCORRE TAMBÉM APÓS O NASCIMENTO

Com todas estas informações, você pode estar imaginando que, logo após o nascimento, todas as células encontram-se completamente diferenciadas e que restam aos órgãos apenas crescer para acompanhar o desenvolvimento do corpo. Porém, esta impressão é errônea, uma vez que no recém nascido, os vários compartimentos do organismo encontram-se em diferentes fases de desenvolvimento e apresentam ritmos de diferenciação variados. Você deve saber que o sistema nervoso encontra-se longe de estar completamente desenvolvido no recém nascido. Neste sistema, a formação da bainha de mielina que “isola” os prolongamentos dos neurônios, apesar de ter início no quarto mês de vida intrauterina, só se completa após o segundo ano de nascimento. Mais dramática ainda é a formação das conexões entre os neurônios que são incompletas ao nascimento e vão se completando por meio dos estímulos recebidos nos primeiros anos de desenvolvimento. Outros exemplos claros de diferenciação incompleta referem-se aos rins e fígado. Assim, é pelo fato de não estarem completamente diferenciados que os rins do recém nascido não respondem ao hormônio antidiurético e o fígado não consegue metabolizar com eficiência o excesso de bilirrubina produzida. Esta última é a causa do surgimento da icterícia nos bebês.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que a diferenciação tem início com a determinação do destino celular ainda na fase embrionária de blástula, onde a ação de fatores citoplasmáticos, assim como extracelulares, irá definir quais conjuntos gênicos serão ativos e quais serão inativos ao longo da vida das células. Porém, em alguns tecidos ou órgãos, as células poderão se tornar efetivamente diferenciadas somente em uma fase mais adiantada do desenvolvimento.

ATIVIDADES

1. O que você entende por potencialidade? Por que podemos considerar uma célula-tronco como totipotente?
2. Sabendo que uma célula adulta como a da epiderme encontra-se totalmente diferenciada, como explicar a clonagem de um organismo por meio da fusão do núcleo desta célula com um ovócito anucleado?
3. Com base no que foi apresentado no texto, podemos considerar que a determinação celular precede sua diferenciação. Fale sobre as principais maneiras que uma célula pode se tornar determinada ainda nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário.



COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Considere que uma única célula dará origem a todas as demais células de um organismo e que estas são completamente diferentes entre si. Imagine que o processo de diferenciação progride na forma de uma árvore e quanto mais na ponta dos ramos desta árvore a célula estiver mais diferente ela será da célula original e menor será sua potencialidade. Neste contexto, uma célula-tronco estaria, como o próprio nome indica, bem no tronco desta árvore.
2. Esta questão refere-se ao processo de clonagem, feito originalmente na década de 50 com anfíbios e mais recentemente com mamíferos. Nesta questão você deve apresentar argumentos que demonstrem os princípios moleculares da diferenciação celular. Para isso, explore os elementos presentes no núcleo da célula diferenciada e no citoplasma do ovócito receptor deste núcleo para explicar como esta “rediferenciação” pôde ser possível.
3. Durante o início do desenvolvimento embrionário as células se dividem rapidamente e todo o conteúdo citoplasmático é distribuído entre elas. A medida que elas se proliferam, formam um amontoado amorfo no qual algumas ficam escondidas no interior desta massa de células e outras ficam expostas na periferia. Todas estas circunstâncias produzem efeitos importantes que irão influenciar diretamente na determinação celular.

A MORTE CELULAR E SUA REGULAÇÃO

Ideias 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. A morte celular programada, também conhecida como apoptose, por mais estranho que possa parecer para você, também constitui um destino celular, e por sinal, um destino essencial para o organismo. Se não fosse pela apoptose, talvez a cauda dos girinos ainda persistisse na rã adulta. Com certeza os dedos de nossas mãos seriam ligados por membranas interdigitais, como nos patos e nossos cérebros estariam cheios de conexões elétricas desnecessárias. De fato, a maioria das células geradas durante o desenvolvimento do cérebro e de alguns outros órgãos e tecidos, morre ainda durante a fase embrionária. Mas o papel da morte celular vai além desta fase. 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 inclusive ao desenvolvimento do câncer. Portanto encerraremos esta disciplina mostrando que a morte de algumas células em um dado organismo constitui um processo essencial para que o conjunto sobreviva.

A CÉLULA COMO VÍTIMA DA MORTE CELULAR

Antes de aprofundarmos nossos conhecimentos sobre a morte celular programada, é preciso lembrar que nem sempre a morte das células é um processo fisiológico normal, totalmente regulado. As células também morrem de modo não-fisiológico, o que causa a maioria das doenças. A morte é considerada 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 é chamado de necrose e tem como características: aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular (figura 10-12). 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. A inflamação, típica da ne-

crose, 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, as vezes de maneira devastadora.

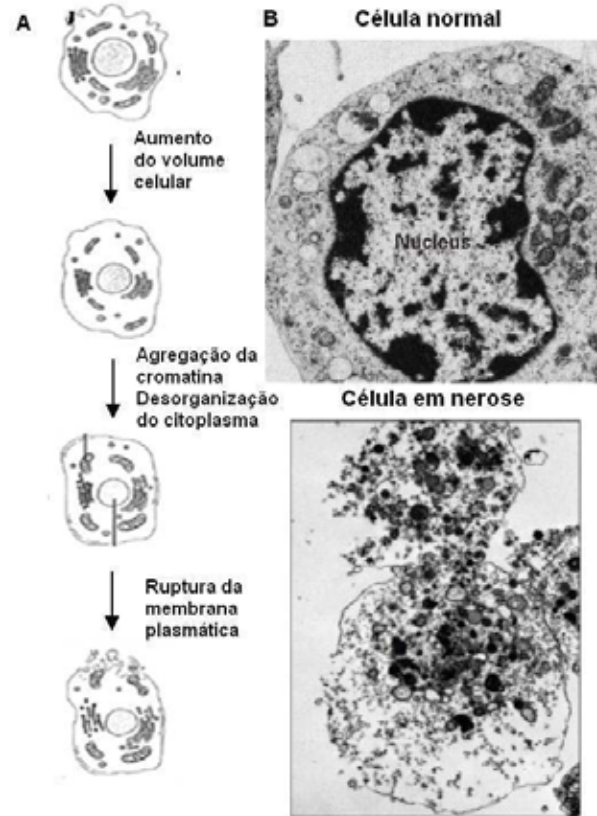


Figura 10-12 - Características ultraestruturais da morte celular por necrose. Em (A): desenho esquemático ilustrando a progressão das alterações morfológicas observadas em células necróticas. Em (B): fotomicrografias comparando uma célula normal (parte superior) e uma célula em processo de necrose (parte inferior).

(Fonte: Anazetti e Melo. Metrocamp Pesquisa 2007; v1, n1, p:37-58)

APOPTOSE: O SUICÍDIO SILENCIOSO

A morte celular fisiológica é totalmente distinta da necrose. Em primeiro lugar a célula não incha. Ao contrário, encolhe-se devido à condensação do citoplasma e das organelas sem, contudo, haver alterações em suas estruturas. Devido à ruptura dos filamentos do citoesqueleto, a célula apoptótica torna-se esférica e destaca-se das células vizinhas e muitas vezes começa a apresentar bolhas em sua superfície (processo chamado de zeiose). As mudanças mais dramáticas são vistas no núcleo onde a cromatina, normalmente dispersa, forma um ou mais aglomerados nas bordas internas da membrana nuclear. O DNA nuclear também pode ser fragmentado por uma **endonuclease** que gera cortes entre os nucleossomos, produzindo fragmentos de tamanhos diferentes, mas sempre múltiplos de 200 pares de bases. Com

Endonuclease

Tipo de enzima que reconhece certas regiões da molécula de DNA e produz um corte na mesma, liberando fragmentos de diferentes tamanhos.

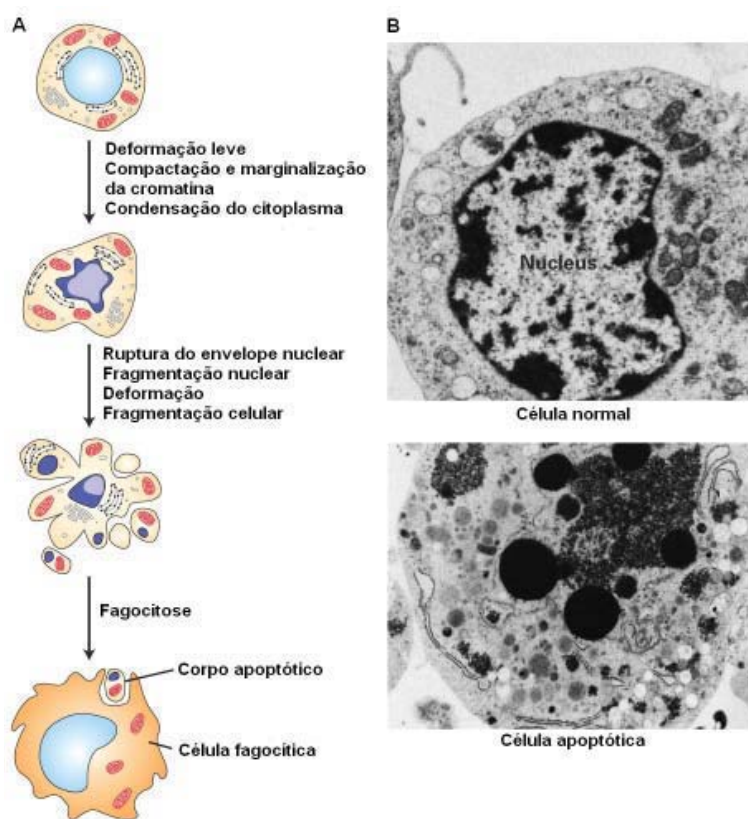


Figura 10-13 - Características ultraestruturais da morte celular por apoptose. Em (A): desenho esquemático ilustrando a progressão das alterações morfológicas observadas em células apoptóticas. Em (B): fotomicrografias comparando uma célula normal (parte superior) e uma célula apoptótica (parte inferior). (Fonte: Lodish et al. (2005) *Biologia Celular e Molecular* 5ª. Ed. Cap. 22)

a dissociação da lâmina nuclear o núcleo se fragmenta e suas partes são englobadas nas bo-lhas que surgem e se desprendem da superfície celular. Estas frações celulares são denominadas corpos apoptóticos. Observe a (figura 10-13) que mostra as principais consequências morfológicas da apoptose e a compare com a (figura 10-12) para que fiquem claras as diferenças entre apoptose e necrose. Além das diferenças morfológicas, outra característica marcante é que a apoptose é “silenciosa”. Não há, como na necrose, o “alvoroço” da inflamação. Em geral, as células apoptóticas são 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.

Mas nem todas as células apoptóticas são logo removidas, podendo continuar no local as vezes por toda a vida sem, contudo, causar dano ao tecido. 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.

A ATIVAÇÃO DA APOPTOSE

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. Este programa pode ser ativado por causas distintas que desencadeiam diferentes cascatas de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados.

A apoptose pode ser acionada por vários motivos. A ausência dos sinais químicos que mantêm a célula em atividade e multiplicação (os chamados

fatores de crescimento) pode ser um dos principais deles. Outra situação pode ser a indução da morte celular programada pela ligação de substâncias apoptóticas a receptores presentes na membrana das células. No caso da cauda do girino, por exemplo, a presença do hormônio tiroxina, liberado por certas células da rã desencadeia o “suicídio celular coletivo” que leva a regressão desta estrutura (figura 10-14). Podemos considerar também como um mecanismo que pode levar a este tipo de morte celular, a ocorrência de danos irreversíveis ao DNA nuclear que possam colocar em risco a viabilidade de todo o organismo.

É importante frisar que estas situações desencadeiam cascatas de eventos intracelulares diferentes entre si, mas que resultam nas alterações morfológicas características de uma célula apoptótica e que foram descritas no tópico anterior. Antes de falarmos um pouco mais sobre cada uma destas situações, é importante apresentar uma classe de moléculas que está sempre envolvida na cascata de eventos que levam à morte celular por apoptose, seja qual for a via de indução. Estou me referindo às caspases, uma classe de enzimas proteolíticas que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuem resíduos do aminoácido aspartato, o que inclui outras caspases. A atividade das caspases sinaliza para a apoptose, uma vez que a clivagem de seus substratos leva à condensação e fragmentação nuclear além da sinalização para que estas células sejam fagocitadas por macrófagos. São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que destas, seis participam da apoptose (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10).

As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios ou pró-caspases. Quando a célula recebe um sinal de morte celular estes precursores são clivados e tornam-se ativos. Geralmente as caspases atuam em cascata, de modo que uma caspase pode clivar outras e esse “corte” parece ser essencial à ativação dessas enzimas. Conforme a posição e o papel que a caspase desempenha nesta cascata ela pode ser considerada uma iniciadora ou uma executora. Assim, ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outras, em sequência, até gerar uma caspase executora (figura 10-15). Esta destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose. Isto nos permite localizar a ação das caspases nas etapas finais das cascatas de eventos intracelulares que produzem as alterações estruturais que levam à morte celular.

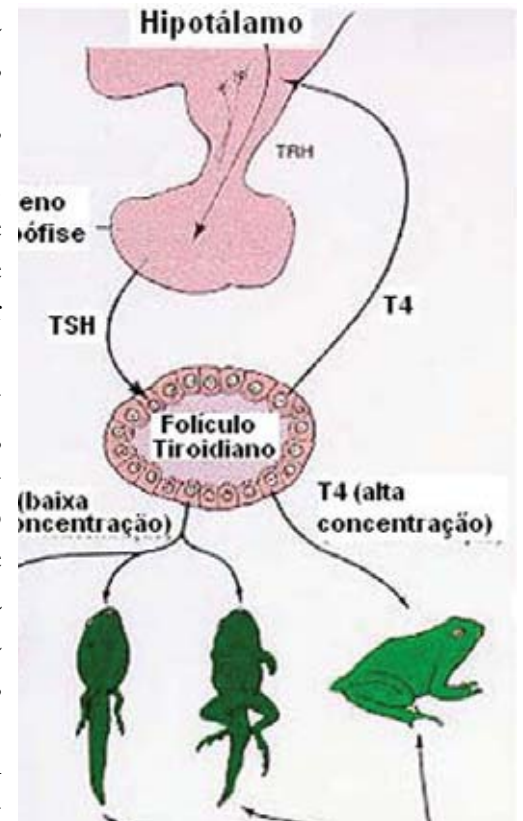


Figura 10-14 - Diagrama evidenciando o papel do hormônio da tireóide na regressão da cauda de anuros por apoptose.

(Fonte: www.qualibio.ufba.br)

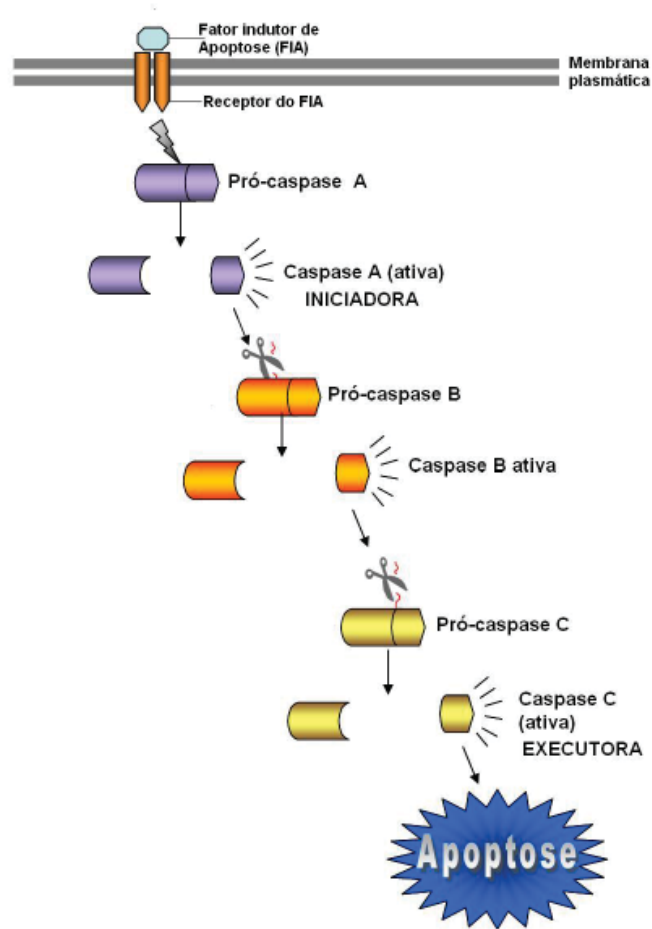


Figura 10-15 - Desenho esquemático da cascata de ativação das caspases. A partir de um estímulo químico externo (fator indutor de apoptose) uma caspase iniciadora se torna ativa e inicia a ativação das demais até a caspase executora, que irá induzir modificações celulares que irão culminar em sua morte por apoptose. (Fonte: produzido pelo autor)

Agora, vejamos como as caspases são ativadas por cada uma das três principais situações que levam a morte celular e que foram anteriormente mencionadas.

Ativação da apoptose pela ausência de fatores tróficos

Para que as células se mantenham vivas e se proliferando, substâncias denominadas fatores de crescimento ou fatores tróficos, produzidos por células vizinhas, devem se ligar a receptores específicos expostos em suas membranas. Esta ligação é o sinal que desencadeia uma série de eventos que informa para as células que elas devem continuar vivas, crescendo e se dividindo.

As principais moléculas que atuam como fatores tróficos são glicoproteínas da família dos fatores estimuladores de colônias – CSF (do inglês clony stimulating factor) e um grupo de substâncias chamadas neurotrofinas. As CFSs estimulam o crescimento e a diferenciação das células sanguíneas. Um tipo especial de CFS, O fator estimulador de colônias granulocitárias

(G-CSF), descrito há mais de vinte anos, é largamente utilizado para o tratamento de estados de **neutropenia** e no transplante de medula óssea. O G-CSF estimula células-fonte hematopoéticas e regula crucialmente a sobrevivência de neutrófilos maduros, pós-mitóticos, através da inibição da apoptose. Já as neurotrofinas são substâncias secretadas pelos tecidos inervados as quais têm por função manter vivos os neurônios e estimular o crescimento de seus axônios. As neurotrofinas são moléculas protéicas da família do fator de crescimento de nervo - NGF (do inglês nerve growth factor) e são importantes na formação do sistema nervoso central e periférico, proporcionando a forma anatômica e controlando a população e atividade celular durante o desenvolvimento embrionário do sistema nervoso.

Portanto, uma vez que os fatores tróficos constituem um estímulo crucial para a sobrevivência e proliferação de grupos celulares extramente importantes para o organismo, quando estas substâncias sinalizadoras estão ausentes ou são suprimidas tais células entram em apoptose.

A presença de um fator trófico no meio influencia a atividade de duas proteínas diretamente envolvidas na sobrevivência celular: uma denominada Bad e outra Bcl-2. Para que a célula se mantenha viva, a ligação deste fator trófico ao seu receptor na membrana da célula faz com que a Bad permaneça inativa e a Bcl-2 ativa. O papel da Bcl-2 ativa é manter fechado um canal chamado PTPC, presente na membrana da mitocôndria, o que previne a morte celular. Quando o fator trófico está ausente, a proteína Bad se torna ativa e vai se ligar a Bcl-2, inativando-a. Na forma inativa, a Bcl-2 é incapaz de manter o canal PTPC fechado. Este canal por sua vez se abre e deixa escapar para o citosol o fator indutor de apoptose AIF (do inglês apoptosis inducing factor) e o citocromo c, que antes estavam presos no espaço intermembrar da mitocôndria. Uma vez livre no citosol, o AIF irá produzir alterações na membrana plasmática que irão atrair os macrófagos. Além disso, AIF entra no núcleo e induz a condensação da cromatina e ativa nucleases que irão degradar o DNA. Mas, e as caspases, onde entram nesta longa história? Neste caso, as caspases são alvos do citocromo c. A cascata começa quando o citocromo c se liga a pró-caspase-9 quebrando-a. Esta modificação a converte em caspase-9 que por sua vez atua da mesma forma sobre a pró-caspase 3 convertendo-a em caspase-3. Esta última, por ser uma caspase executora, irá ativar as enzimas que produzem as mudanças descritas anteriormente as quais, juntamente com as modificações causadas pelo AIF, irão culminar na morte celular. Analisando atentamente a (figura 10-16) enquanto relê este último parágrafo, você com certeza irá compreender melhor este assunto.

Neutropenia

Ocorre quando a contagem de neutrófilos no sangue fica abaixo de 1000/mm³, o que aumenta a suscetibilidade do organismo a infecções.

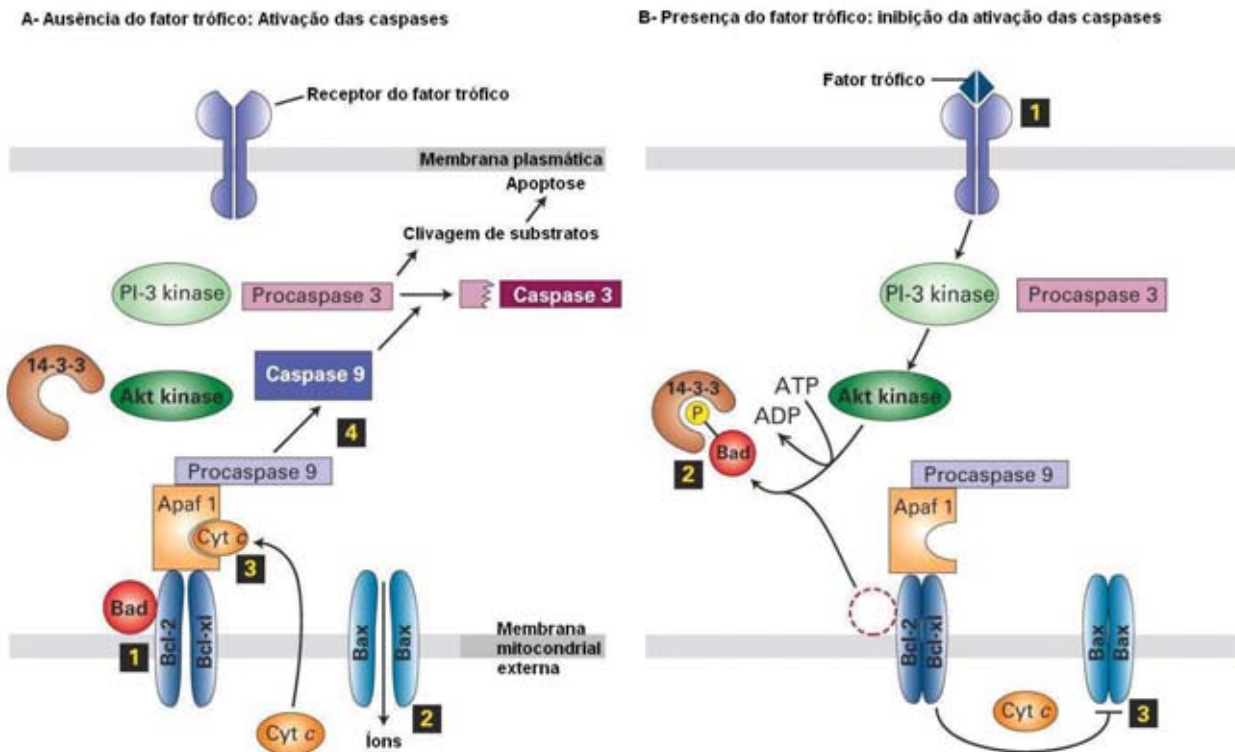


Figura 10-16 - Desenho esquemático representado as vias intracelulares que levam à morte celular por apoptose (em A) ou à sobrevivência celular mediada por fatores tróficos (em B).
 (Fonte: Lodish et al. (2005) Biologia Celular e Molecular 5ª. Ed. Cap. 22)

Ativação da apoptose pela ligação de substâncias apoptóticas

Embora a morte celular possa ocorrer na ausência de fatores de sobrevivência como os fatores tróficos, a apoptose pode também ser induzida pela presença de determinados sinais que causam a morte. Por exemplo, o fator de necrose tumoral - TNF (do inglês tumor necrosis factor), que é liberado pelos macrófagos em algumas doenças inflamatórias crônicas e que dispara a morte celular e a destruição do tecido. Outro importante sinal que induz a apoptose é a proteína denominada Fas, que é produzida por algumas células do sistema imunológico e que pode iniciar a morte de células infectadas por vírus, de algumas células tumorais, assim como células enxertadas (transplantadas) no organismo. Tanto TNF quanto o ligante Fas interagem com receptores específicos na superfície celular. Estes receptores são proteínas transmembranas que apresentam, em suas porções citosólicas, uma sequência de aminoácidos conhecida como domínio de morte. Quando os receptores são ativados pela ligação dos sinais (TNF ou Fas), este domínio atrai uma série de fatores citoplasmáticos que inclui o Domínio de Destruição Associado a Fas – FADD (do inglês Fas receptor-associated death domain) que age recrutando a pro-caspase-8 e convertendo-a em caspase-8 ativa. Logo esta caspase iniciadora ativa uma cascata de caspases que envolve a caspase-9 e a caspase 3, que, como visto no tópico anterior, é a caspase executora responsável pela

ativação das enzimas que agem produzindo as alterações celulares específicas que culminam na morte celular (Figura 10-17).

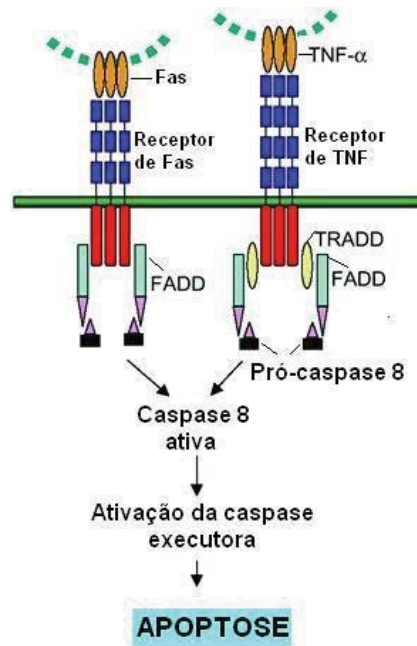


Figura 10-17 - Desenho esquemático da indução da apoptose pelos fatores apoptóticos externos Fas e TNF. O esquema mostra a ligação do Fas e TNF aos seus receptores na membrana celular o que atrai os domínios de morte associados a Fas (FADD) e a TNF (TRADD) que por sua vez ativam a caspase 8 que inicia a cascata de caspase.

(Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Apoptose ativada por mutações no DNA

Outra condição biológica que pode levar a apoptose ocorre quando o DNA sofre alterações irreversíveis em sua estrutura e que podem comprometer a viabilidade celular e acarretar doenças diversas, inclusive o câncer. Tais condições incluem: (1) o envelhecimento celular; (2) defeitos no processo de replicação do DNA; (3) a ação de agentes ambientais, químicos e biológicos (raios X, radiação solar UV, substâncias químicas, vírus, etc) e (4) o acúmulo na célula de agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a espécie reativa do oxigênio (os ânions superóxidos O₂⁻). Diante da presença destas alterações, pode intervir a proteína p53 que participa na resposta intracelular ao dano no DNA, atrasando a progressão da fase G1 do ciclo celular. Este atraso pode prover tempo para o reparo no dano ao DNA. Quando este reparo não tem êxito, estes danos podem ser perpetuadas como mutações caso as células entrem na fase S. Nesta situação, a própria proteína p53 parece iniciar o processo apoptótico celular, a fim de evitar a transferência do DNA danificado às células filhas. Para isso, a p53 inativa a Bcl-2, o que desencadeia o mesmo processo de ativação das caspases que leva à morte celular, descrito anteriormente para a situação em que faltam os fatores tróficos.

CONCLUSÃO

A atividade proteolítica de enzimas denominadas caspases é a base bioquímica para o processo da morte celular programada. As caspases, que geralmente se encontram em uma forma inativa, podem ser ativadas por diversos estímulos tais como a ausência de fatores tróficos, a presença de substâncias apoptóticas assim como danos irreparáveis no DNA. Porém, para que a cascata de caspases seja ativada a partir de qualquer um destes estímulos, vias de sinalizações intracelulares intermediárias que envolvem elementos moleculares diversos como TNF e p53, devem ser acionadas. A apoptose, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associada a inúmeras doenças, como o câncer. Deste modo, a compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer são importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção desta doença.



RESUMO

A maioria dos tecidos sofre uma constante renovação celular graças ao equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte das células. A diferenciação celular assim como a apoptose são processos essenciais para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo o primeiro processo responsável pela diversidade funcional das células enquanto que o segundo é importante na eliminação de células supérfluas ou defeituosas. Tanto a diferenciação quanto a morte celular são resultados de uma programação intrínseca das células e ocorrem em resposta a estímulos internos e externos. Em ambos os processos as células sofrem alterações morfológicas e bioquímicas que de alguma forma as tornam diferentes das demais, o que pode levar à formação de novos tecidos ou à deteriorização de tecidos pré-existentes. O conhecimento dos mecanismos que controlam estes dois fenômenos biológicos é crucial para entendermos e contornarmos os defeitos que afetam a sobrevivência das células e dos organismos e que são a causa de grande parte das doenças.



ATIVIDADES

Responda as questões a seguir

1. Como você diferenciaria os processos de morte celular por apoptose e por necrose? Cite exemplos em que ocorrem os dois eventos.
2. Fale sobre os principais mecanismos de indução da apoptose citando exemplos.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Para facilitar seu trabalho você poderia construir um quadro onde pudessem ser apresentadas de forma comparativa as principais características estruturais e fisiológicas das células que sofrem estes dois processos de morte celular assim como em que condições eles ocorrem.
2. Existem pelo menos três situações em que uma célula pode entrar em morte por apoptose. Estas são geralmente situações de estresse causado por estados de “fome” ou por danos ocasionados em constituintes celulares importantes para a sobrevivência das células. Lembre-se de descrever a ação das caspases na indução e controle da apoptose.

BIBLIOGRAFIA

- ANAZETTI, Maristella Conte; MELO, Patrícia Silva. **Morte celular por apoptose**: uma visão bioquímica e molecular. Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007. ISSN 1981-5883
- ALBERTS, et al. *Molecular Biology of the cell*. 5 ed. New York: Garland Science. 2008.
- CARVALHO, Hernandes F.; RECCO-PIMENTEL, Shirlei M. **A célula**. 2 ed. Barueri: Editora Manole. 2007.
- DE ROBERTIS, E. D. P.; DE ROBERTIS, E. M. F. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- JUNQUEIRA, B. C. V.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; KAY Y. **Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier (Almed). 2006.
- LODISH, et al. **Biologia Celular e Molecular**. 5 ed. Porto Alegre: Art-med. 2005.