DEFINIÇÕES E MECANISMOS MOLECULARES EM MORTE CELULAR

Gabriela Hadler Gabriel¹, Leandro Lopes Nepomuceno², Claudiane Marques Ferreira³, Vanessa de Sousa Cruz Pimenta⁴, Eugênio Gonçalves de Araújo⁵

- 1 Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás
(gabriela.hadler@hotmail.com) - Goiás-Brasil
- 2 Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás
- 3 Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás
- 4 Pós doutoranda, Laboratório Multiusuário de Cultivo Celular da Universidade Federal de Goiás
- 5 Prof.Doutor do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Recebido em: 02/10/2017 – Aprovado em: 21/11/2017 – Publicado em: 05/12/2017
DOI: 10.18677/EnciBio_2017B19

RESUMO

A morte celular ocorre após uma lesão celular irreversível, que pode ter diferentes causas, e é importante no estudo do câncer, doenças auto-imunes e neurodegeneração. O processo é caracterizado basicamente pela perda da integridade da membrana plasmática da célula e consequente fragmentação do núcleo celular. Vários termos foram utilizados para descrever os mais diferentes processos de morte celular, sendo que, em 2012, foi feita uma classificação a partir das características moleculares dos eventos, com a inclusão dos termos apoptose extrínseca, apoptose intrínseca, necrose regulamentada, morte celular autofágica e catástrofe mitótica. A idéia de se classificar os tipos de morte celular surge como uma forma de padronizar e facilitar a comunicação entre os cientistas e pesquisadores, acelerando o ritmo das descobertas. Além disso, o método bioquímico de classificação apresenta vantagens, por ser quantitativo e menos sujeito à falhas. Cientes dos diferentes mecanismos de morte das células, o que pode melhorar o tratamento das doenças e também estudo de novas formas de tratamento. Diante disso, essa revisão objetivou reunir as definições e mecanismos de morte celular, baseando-se nas características moleculares de cada processo.

PALAVRAS-CHAVE: apoptose, mecanismos moleculares, morte celular.

DEFINITIONS AND MOLECULAR MECHANISMS IN CELL DEATH

ABSTRACT

Cell death occurs after an irreversible cellular injury, which may have different causes, and it is important in the study of cancer, autoimmune diseases and neurodegeneration. The process is characterized primarily by loss of plasma membrane integrity of the cell and consequent fragmentation of the nucleus. Various

terms have been used to describe many different cell death processes, and in 2012 a classification made from the molecular characteristics of the events included the terms extrinsic apoptosis, intrinsic apoptosis, regulated necrosis, autophagic cell death and mitotic catastrophe. The idea of classifying the types of cell death appears as a way to standardize and facilitate communication among scientists and researchers, accelerating the pace of discovery. In addition, the biochemical method of classification has advantages, like being quantitative and less prone to failure. Mindful of the different mechanisms of cell death, which can improve the treatment of diseases and also study new forms of treatment. Therefore, this review aimed to talk about these cell death mechanisms, there are based on the molecular characteristics of each process.

KEYWORDS: apoptosis, cell death, molecular mechanisms.

INTRODUÇÃO

A célula é uma estrutura envolvida por membranas e formada por estruturas menores, chamadas organelas, que exercem diferentes funções dentro do organismo. Tais estruturas são alvo de diversos patógenos, como os micro-organismos, doenças genéticas, tóxicas e metabólicas, além de agentes ambientais. A célula é revestida pelas membranas celulares e, no meio intracelular, encontra-se o citosol, onde estão localizadas as organelas, tais como as mitocôndrias. A estrutura celular possui um núcleo, nucléolo, retículo endoplasmático rugoso e liso, complexo de Golgi, lisossomos, inclusões celulares, microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos e matriz extracelular que, embora não faça parte da estrutura da célula, é importante na saúde e função desta (MCGAVIN ; ZACHARY, 2009).

As células precisam passar por um processo de divisão e duplicação, chamado de ciclo celular (VELEZ ; HOWARD, 2015). Este pode ser denominado como uma série de eventos que culminam na proliferação celular por mitose. Nos eucariontes, esse ciclo é formado por quatro fases distintas, que são: a fase G1, considerada uma fase pré-divisão, quando vários genes são ativados para que haja a síntese de ribossomos para atuarem na tradução de proteínas; na fase S ocorre a duplicação do DNA; fase G2, que é a fase pré-mitótica; e fase M, onde o núcleo passa pelo processo de divisão, seguida da citocinese (FERRAZ et al. 2012).

Inúmeras podem ser as causas que levam a uma lesão das células, como os traumas e ação de vírus e toxinas, distúrbios nutricionais, lesões na membrana das células, alterações no sistema imune e hipóxia. Para manter a homeostase, as células dispõem de mecanismos de defesa, e quando tais mecanismos são insuficientes, ocorre lesão celular. As lesões podem ser reversíveis ou irreversíveis, sendo que nem toda lesão tem como consequência a morte da célula (MCGAVIN; ZACHARY, 2009).

A morte celular ocorre quando o processo de lesão celular é considerado irreversível. A membrana plasmática da célula perde a integridade e ocorre a fragmentação do núcleo celular, caracterizando esse processo (KROEMER et al. 2009). Apoptose, necrose e catástrofe mitótica foram os termos utilizados para classificar a morte das células, sendo essa classificação feita a partir de características morfológicas das alterações. No ano de 2012 foi feita uma classificação partindo das características bioquímicas dos eventos, e os termos apoptose extrínseca, apoptose intrínseca, necrose regulamentada, morte celular autofágica e catástrofe mitótica foram incluídos, além de outros tipos, tais como

anoikis, entosis, parthanatos, pyroptosis, netosis e cornificação (GALLUZZI et al. 2012).

A morte celular é importante no estudo do câncer, doenças auto-imunes e neurodegeneração, sendo que, nesses casos, tal evento ocorre em larga escala. Os processos podem ser passivos, quando resultam de danos externos, ou ativos, de forma que a própria célula pode contribuir para sua morte (TAIT et al. 2014).

A idéia de classificar os tipos de morte celular surgiu como uma forma de padronizar e facilitar a comunicação entre os cientistas e pesquisadores, acelerando o ritmo das descobertas. Essa classificação segundo as características bioquímicas apresenta vantagens e desvantagens, o que explica porque a comunidade científica conservou, por tanto tempo, a classificação morfológica. Uma das razões é o fato de ter fácil acesso ao microscópio de luz convencional nos laboratórios, o que não ocorre com os mais sofisticados equipamentos, como, por exemplo, leitores para monitoramento da atividade das caspases. Por essa razão, muitos biólogos celulares estão familiarizados com a observação de culturas celulares em microscópio, sendo este outro motivo para que a classificação morfológica fosse mantida. Além disso, acreditava-se que existia uniformidade morfológica, mas, recentemente, estudos mostraram que morfotipos semelhantes de morte celular escondem um alto grau de heterogeneidade funcional, bioquímica e imunológica. O método bioquímico de classificação surgiu então como uma vantagem, sendo o método quantitativo, menos sujeito às falhas de interpretação (GALLUZZI et al. 2012).

MORTE CELULAR

Para que haja a manutenção da homeostasia do organismo, é necessário que exista uma interação entre as células. Em algumas situações, onde ocorre lesão celular, ausência de fatores para o crescimento ou infecções, os quais são considerados processos degenerativos e passivos, ou fatores extrínsecos, ocorre a morte celular. Nesses casos, há aumento do volume da célula, perda das funções metabólicas e alterações na membrana plasmática, que perde a integridade. Além dos processos passivos, ocorrem estímulos intracelulares ou extracelulares e, como consequência, alguns organismos tornam-se capazes de induzir o evento de morte celular, como uma forma de resposta a esses estímulos (GRIVICICH et al. 2007).

Para que uma célula seja considerada morta, é necessário que haja perda da integridade da membrana plasmática, fragmentação do núcleo da célula e/ou fagocitose dos fragmentos por células adjacentes *in vivo*. É preciso diferenciar as células mortas das células em processo de morte celular, ou células que ainda estão morrendo, já que alguns processos são reversíveis e a célula pode se recuperar (TAIT et al. 2014).

Para a correta classificação dos diferentes tipos de morte celular, foi criado um comitê de nomenclatura de morte celular (NCCD - *Nomenclature Committee on Cell Death*). As primeiras descrições dos mecanismos de morte celular programada foram feitos em 1960. Em 2009, o NCCD publicou uma série de recomendações para a definição dos diferentes tipos de morte celular, usando como referência as características morfológicas, classificando as células em três principais mecanismos, de apoptose, necrose e catástrofe mitótica. Já em 2012 foi proposta uma classificação baseada nas características bioquímicas das células e novos termos foram utilizados, sendo que os tipos de morte celular foram classificados em: apoptose extrínseca, apoptose intrínseca caspase-dependente, apoptose intrínseca caspase-independente, necrose regulamentada, morte celular autofágica e catástrofe mitótica. Foram ainda incluídos e descritos outros tipos de morte celular,

como anoikis, entosis, parthanatos, pyroptosis, netosis e cornificação (GALLUZZI et al. 2012).

APOPTOSE EXTRÍNSECA

É o termo utilizado para indicar a morte celular apoptótica que é induzida por sinais de estresse provenientes do meio extracelular, os quais são propagados por receptores transmembrana específicos, denominados receptores de morte (GALLUZZI et al. 2012). A apoptose nas células dos mamíferos pode ocorrer por meio de duas diferentes vias. A via intrínseca envolve a ação dos receptores de morte da família TNF. Essa via é dependente da ação das caspases, mais precisamente a caspase 8, a qual é uma protease responsável pelo início da cascata de morte celular, que existe nas células sob a forma de uma proenzima inativa. Ela pode ser convertida para sua forma ativa quando ligada aos receptores de morte presentes no citoplasma, chamados de TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Após a ligação com o receptor, ocorre o recrutamento de uma proteína adaptadora FADD (*Fas-Associated Death Domain*), promovendo a ativação da proenzima (ROGALSKA et al. 2014).

A caspase 8 na forma ativa estimula a apoptose através da ativação das caspases executoras, incluindo as caspases 3, 6 e 7 (CHU et al. 2015). A utilização da terapia fotodinâmica, com a porfirina SBTP (5,10,15,20-tetraquis (7-sulfonatobenzo [b] tiofeno), em células de câncer de mama responsivas a estrógeno (MCF-7), causa danos às mitocôndrias e ao DNA. Por meio da ativação das caspases 3, 7 e 8, o estudo da dinâmica de morte celular demonstrou que houve apoptose extrínseca nas células MCF-7 (RANGASAMY et al. 2015).

O coronavírus, causador da Síndrome Respiratória do Oriente, ou MERS-CoV, é capaz de infectar as células T no baço, causando apoptose maciça das células, induzida pela ativação de ambas as vias da apoptose. Nas células T infectadas com o vírus, há ativação da caspase-3, induzindo a apoptose das células e permitindo a descoberta de um novo alvo para a terapêutica da doença. As intervenções devem se basear no bloqueio da ação da caspase ou no impedimento da sua ativação, evitando que haja a apoptose das células (CHU et al. 2015).

APOPTOSE INTRÍNSECA

A apoptose intrínseca pode ser dividida em duas diferentes definições, sendo uma a apoptose intrínseca dependente da ativação das caspases, e outra independente da ativação enzimática. O processo de apoptose pode ser iniciado por diferentes condições que causam estresse intracelular, incluindo dano ao DNA, estresse oxidativo, aumento do influxo de cálcio citosólico, excitotoxicidade, acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático, entre outras (GALLUZZI et al. 2012).

O mecanismo de apoptose ocorre rapidamente e promove a retração celular, a qual perde a ligação com as células vizinhas e a matriz extracelular. À exceção das mitocôndrias, que podem ter a membrana externa rompida durante esse processo, as organelas mantêm as características morfológicas, mas ocorre condensação da cromatina e são formados os *blebs* na membrana celular. *Blebs* são prolongamentos, os quais se multiplicam até o rompimento, dando origem a estruturas compostas pelo mesmo conteúdo da célula de origem. Ocorre fragmentação nuclear e os fragmentos, juntamente com o produto do rompimento dos prolongamentos formados na membrana, formam os chamados corpos apoptóticos, que são removidos por fagócitos especializados, os macrófagos, sem que causem um processo inflamatório. Ainda na apoptose, ocorre a ativação de

endonucleases, as quais são responsáveis pelo processo de fragmentação do DNA, outro processo importante no mecanismo de morte celular. Dessa forma, pode-se dizer que a apoptose trata-se de um mecanismo de defesa do organismo que vem sendo cada vez mais estudado no tratamento do câncer, já que vários agentes anti-câncer agem por meio da ativação da cascata de apoptose, promovendo a morte das células tumorais (GRIVICICH et al. 2007).

A via apoptótica dependente da ação das caspases é a forma clássica da morte celular programada, sendo que ocorre a participação da caspase-8, caspase-9, caspase-12, caspase-7 e caspase-3, além da atuação de uma série de receptores, tais como o receptor TNF (fator de necrose tumoral), receptor de FasL, TLR, entre outros, os quais são chamados de receptores de morte. Nesse mecanismo, a concentração de cálcio no citosol desempenha um papel importante na regulação da transdução e na proliferação e morte celular, havendo participação também dos canais de cálcio, os quais controlam o destino das células por meio da abertura ou fechamento (HONGMEI, 2012).

Na maioria dos casos, as terapias anti-câncer resultam na ativação das caspases, as quais são proteases pertencentes à família da cisteína, sendo as moléculas efetoras de vários tipos de morte celular. Essas enzimas, quando sintetizadas, estão sob a sua forma inativa e, após a ativação, estas clivam resíduos de aspartato e promovem a ativação de outras caspases, resultando numa amplificação da sua atividade, gerando a cascata de ativação de células efetoras da morte das células. Elas são responsáveis pela clivagem de vários substratos diferentes no citoplasma ou núcleo das células. A ativação das caspases pode ser iniciada por diferentes mecanismos, como a ligação dos receptores de morte na membrana plasmática ou nas mitocôndrias (FULDA ; DEBATIN, 2006).

Embora os sinais que desencadeiam a apoptose intrínseca sejam variáveis, todos os estímulos estão relacionados a um mecanismo de controle mitocondrial. Juntamente com a ativação da cascata de sinalização e dos mecanismos pró-apoptóticos, também são ativados mecanismos anti-apoptóticos, em uma tentativa de permitir que as células respondam ao estresse intracelular. Com isso, a membrana externa da mitocôndria passa por um processo de permeabilização da membrana, ou MOMP. Após esse processo, ocorre a ativação de membros pró-apoptóticos da família BCL-2, como o Bak e Bax, os quais atuam na formação de poros na membrana. Esse evento de MOMP cursa com consequências, tais como: colapso do potencial de membrana mitocondrial interna, cessando a produção de ATP mitocondrial; liberação de proteínas tóxicas do espaço intermembrana da mitocôndria para o citosol, tais como o citocromo c, fator indutor da apoptose (AIF), endonuclease G, ativador de caspases derivado da mitocôndria (SMAC/DIABLO) e proteína A2 de alta temperatura; inibição da cadeia respiratória (pela perda de citocromo c), aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e ativando um mecanismo de amplificação dos sinais apoptóticos (GALLUZZI et al. 2012).

Esse aumento na produção de EROS promove a oxidação lipídica, proteica e de ácidos nucleicos, piorando a situação de colapso do potencial da membrana mitocondrial, além de promover a ativação da caspase-9 e caspase-3. As moléculas pró-apoptóticas formam poros na membrana mitocondrial, por onde é liberado o citocromo c ao citosol, sendo que, como consequência desse evento, ocorre a formação de um complexo entre o citocromo c e a proteína associada à apoptose (APAF-1), além da ativação da caspase-9. Esse complexo pode ser denominado de apoptossomo. Formado o complexo, ocorre a clivagem da caspase-

9 e sua liberação na sua forma ativa, a qual promove a ativação de outra enzima, a caspase-3, promovendo a apoptose. Outro fator que vem sendo cada vez mais estudado é o AIF, o qual capta os estímulos da apoptose e induz condensação da cromatina e produção de fragmentos de DNA, por meio da migração da mitocôndria para o núcleo. Esse fator age de forma independente da ativação das caspases (GRIVICICH et al. 2007).

Um dos eventos que marca o mecanismo de apoptose intrínseca é a ocorrência de despolarização mitocondrial (GALLUZZI et al. 2012), e estudos observaram a ocorrência de apoptose intrínseca e extrínseca em células hepáticas de humanos, a partir de uma sobrecarga de ferro induzida pelo uso do citrato de amônio férrico (FAC) e mediada por espécies reativas de oxigênio. A exposição ao FAC pode aumentar o nível de espécies reativas, induzindo a apoptose das células hepáticas através da ativação da enzima proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), ativando as duas vias da apoptose, tanto a via mitocondrial, quanto a via extrínseca. Além disso, foi observado que a n-acetilcisteína e a glutatona atuam como agentes antioxidantes e anti-apoptóticos, conferindo proteção das células sobrecarregadas com ferro e inibindo a ativação da MAPK, diminuindo a ocorrência de apoptose. Esses eventos fornecem base para o estudo das terapias utilizadas nas lesões hepáticas associadas ao ferro (LI et al. 2016).

NECROSE REGULAMENTADA

A necrose era considerada como um mecanismo meramente acidental de morte celular, definida pela ausência de características morfológicas de apoptose ou autofagia. Após vários trabalhos e pesquisas, sabe-se agora que a necrose pode ocorrer de forma regulada, além de possuir um papel importante nos mecanismos fisiológicos e patológicos. Várias são as formas de indução da necrose regulamentada, incluindo danos ao DNA, excitotocinas e a ligação de receptores de morte (GALLUZZI et al. 2012).

Histologicamente, a maioria dos danos celulares nos rins e outras formas de lesão envolvendo isquemia e reperfusão são causados por necrose (HWANG ; BAEK, 2015). O aumento no volume celular, inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e perda de conteúdo intracelular são eventos que caracterizam esse mecanismo. Tais alterações também podem ser observadas nas doenças inflamatórias do intestino, pancreatite, infecções por vírus, salmonelose, e infarto do miocárdio (CAI; LIU, 2014).

A necrose regulamentada não resulta apenas da ativação de uma proteína de interação com o receptor, a RIP-quinase-3 (RIPK-3), mas pode também ser ativada por diferentes processos moleculares. Hoje em dia, vários tipos desse mecanismo de morte celular foram caracterizados, incluindo a necroptosis, transição da permeabilidade mitocondrial e parthanatos, que é considerada por alguns autores como sendo um tipo de necrose regulamentada (GALLUZZI et al. 2012).

A forma mais estudada de necrose regulamentada, e de maior ocorrência, é a necroptosis. Nesse processo, a atuação da proteína de interação com receptores (RIP) e da enzima RIPK-3, são de extrema importância. Outro fator importante é a participação do TNF e a formação de um complexo de sinalizador do TNF no receptor de morte, o complexo TNF-R1, formando um domínio de morte, que promove o recrutamento de várias proteínas adaptadoras e efetoras. A proteína TRADD, é a primeira a interagir com esse receptor, promovendo o recrutamento de outras proteínas efetoras, como a RIP1, TRAF2 e o inibidor de apoptose celular (cIAP1/cIAP2), para formar o complexo de sinalização de superfície TNF-R1, o

complexo I, que ativa as vias pró-sobrevivência, como a NF- κ B e MAPK. Sob condições apoptóticas, o complexo TNF-R1 é libertado para o citosol e recruta outras proteínas para formar o complexo II. O recrutamento da Fas associada ao FADD induz ativação das caspases, que executam a apoptose.

A poliubiquitinação da RIP1 pelo hidroxianisol butilado atua na formação do complexo TNF-R1. Sob condições necroptóticas, a deubiquitinação da RIP1 por cilindromatose (CYLD) e inibição das caspases, permitem o recrutamento da RIP3 para os complexos secundários, formando o necrossomo. A inibição da atividade da caspase-8 é importante na formação do necrossomo pois, caso não seja inibida, esta faria a clivagem da RIP1, RIP3 e do CYLD. Com o necrossomo formado, a RIP1 e RIP3 interagem com os sítios de interação homotípica (RHIMs) e formam grandes complexos. Outro componente-chave do necrossomo é a proteína MLKL, recrutada para o complexo por intermédio da RIP3, sendo um substrato para a RIP3-quinase (RIPK3).

A fosforilação da MLKL pela RIP3 resulta na oligomerização dessa proteína e sua migração para a membrana plasmática, aumentando a permeabilidade e o influxo de íons, o que aumenta a pressão osmótica e resulta na ruptura da membrana e necroptose da célula (CAI, 2014). O composto 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, ou DAPE, induziu morte celular em células malignas de mesotelioma pleural. A morte celular se deu sob o mecanismo de necroptosis, mediada pela RIPK (KAKU et al., 2015).

MORTE CELULAR AUTOFÁGICA

A autofagia é um processo celular no qual o material citoplasmático, incluindo as organelas, é degradado. Durante a autofagia, os constituintes do citoplasma são sequestrados dentro de vesículas de dupla membrana, chamados de autofagossomos, e são levados aos lisossomos para que sejam degradados e reciclados. A autofagia ocorre quando as células são expostas ao estresse, que pode ocorrer por hipóxia, radiação, ação de produtos químicos ou privação nutricional. Muitos agentes utilizados no tratamento do câncer, tais como o trióxido de arsênio, tamoxifeno e rapamicina, são indutores de autofagia. A ativação desse mecanismo de morte celular depende de fatores referentes à célula e a duração dos sinais de estresse. A autofagia produz uma forma de morte celular chamada de morte celular autofágica, ou morte celular programada tipo II (HWANG ; BAEK, 2010).

Esse mecanismo de morte celular executa pelo menos duas diferentes funções distintas. A autofagia pode atuar como uma mediadora fisiológica da morte das células *in vivo*, mas também atua na morte de algumas células cancerígenas, principalmente na ausência de moduladores apoptóticos como o Bax e Bak, ou as caspases (GALLUZZI et al. 2012).

Um conjunto de proteínas evolutivamente conservadas, as proteínas Atg ou proteínas relacionadas à autofagia, fazem a manutenção da homeostase do mecanismo de autofagia por meio da formação do autofagossomo. Na fase inicial, quando ocorre a nucleação da vesícula, o complexo ULK/Atg1 ativa o complexo fosfatidilinositol-3-quinase, que recruta uma série de proteínas Atg de membrana, que fazem a síntese de lipídeos. Nas fases subsequentes, ocorre o alongamento da vesícula e formação da membrana externa do autofagossomo. Essa membrana se funde ao lisossomo para formar o autolisossomo, em que o material citoplasmático sequestrado é degradado (LIU; LAVINE, 2015).

A glucosamina, um amino monossacarídeo considerado como suplemento dietético para aliviar o desconforto articular em pacientes com osteoartrite, induz a morte celular autofágica por meio da estimulação de estresse no retículo endoplasmático das células de câncer de glioma U87MG. Este composto apresenta um potencial anticâncer e possui ação na inibição do crescimento tumoral (HWANG ; BAEK, 2010).

O arsenito de sódio está relacionado com a ocorrência de morte celular autofágica em células pancreáticas. O arsênico é um poluente e considerado um agente cancerígeno e tóxico. A exposição à esse composto afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Com relação ao diabetes, os fatores de risco incluem a idade, obesidade, sexo, sedentarismo e história familiar. O aumento no número de casos dessa doença faz com que os poluentes diabetogênicos ambientais sejam cada vez mais estudados. Já o meta-arsenito de sódio induz autofagia em células de câncer de próstata, mas esse mecanismo de morte celular também pode ser considerado como uma forma de autoproteção das células contra a transformação celular induzida por arsênico nas células epiteliais brônquicas de humanos (ZHANG et al., 2013). Com isso, fica evidente que o processo de autofagia causado pelo arsenito é variável e depende do tipo de células e do tipo de estresse celular. Nas células pancreáticas o arsenito promoveu morte celular autofágica, mostrando que este contribui para o aumento nos casos de diabetes (ZHU et al., 2014).

CATÁSTROFE MITÓTICA

Várias tentativas têm sido feitas para que sejam determinadas as vias que levam à catástrofe mitótica, mas, ocasionalmente, os pesquisadores empregam esse termo à morte celular que ocorre durante a mitose. Recentemente, foi proposto que esse tipo de morte celular constitui uma via oncossupressiva, que opera através de morte celular ou senescência. Após a ocorrência de mitose aberrante, as células exibem alterações nucleares, como, por exemplo, micro e multinucleação, eventos os quais têm sido usados como marcadores da ocorrência de catástrofe mitótica. No entanto, traços da ocorrência de apoptose e necrose também foram observados nessas células, não sendo possível determinar qual é a sequência de eventos responsáveis pela morte da célula (GALLUZZI et al. 2012).

O termo catástrofe mitótica (MC) é utilizado para definir a morte celular que ocorre durante ou após uma mitose defeituosa, geralmente tendo como consequência a poliploidia e formação de células multinucleadas. É a principal forma de morte induzida por radiação ionizante nas células, e ocorre como um resultado de uma falha no início da mitose após a replicação do DNA. Esse mecanismo é diferente do mecanismo de apoptose, contudo, vários modelos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que existe associação dos precursores de morte celular na MC, que pode ser acompanhada pela liberação de proteínas pró-apoptóticas e ativação de caspases, o que mostra que alguns eventos se assemelham entre este mecanismo e o mecanismo de apoptose (PORTUGAL et al. 2010).

A fase mitótica G2 é crucial para a prevenção da morte e, quando essa fase não ocorre, observa-se o evento de MC, com formação das células micronucleadas gigantes, que reflete a segregação anormal de cromossomos. Embora existam vários estudos relacionando a apoptose com esse mecanismo de morte celular, a ligação entre esses dois eventos ainda permanece incerta. Pesquisadores demonstram que esse evento envolve ativação das caspases, liberação de citocromo c, condensação da cromatina e degradação do DNA, o que também pode ser observado na apoptose (FRAGKOS ; BEARD, 2011).

A catástrofe mitótica é uma forma aberrante de mitose associada a inúmeras alterações morfológicas e bioquímicas das células, sendo que a etapa final desse processo cursa com a formação de envelopes nucleares e segregação cromossômica. Também existe relação com a síntese de DNA e condensação prematura e incompleta dos cromossomos. Para que esse mecanismo de morte das células ocorra, deve haver, então, defeito na mitose e, em alguns casos, a ativação da caspase-2, responsável por promover danos ao DNA, ou ativação dos genes TP53 ou TP73 (VAKIFAHMETOGLU et al. 2008; GALLUZZI et al. 2012). Muitos pesquisadores continuam fazendo experimentos a fim de descobrir se a MC é um tipo de morte celular ou é um processo que leva a ocorrência de apoptose ou necrose, ou seja, precede um mecanismo de morte das células (VAKIFAHMETOGLU et al. 2008).

A definição de MC, com base nas características funcionais, foi proposta a partir da afirmação de que as aberrações mitóticas podem induzir a senescência celular e que a morte celular pode ser apoptótica ou necrótica. Na ausência de perturbações genéticas e químicas da mitose, as células se dividem por meio das diferentes fases do ciclo celular para gerar uma descendência diplóide. No caso de anomalias cromossômicas ou problemas que afetam o mecanismo mitótico e que ocorrem durante a fase M do ciclo, as células ficam presas na mitose e não podem concluir a divisão, ocorrendo então um erro, causando a catástrofe mitótica. As células podem, então, submeter-se a diferentes destinos, sendo que elas podem morrer sem sair do ciclo mitótico, alcançar a fase G1 do ciclo celular subsequente, por meio de um fenômeno conhecido como deslizamento mitótico, e depois podem morrer, ou saem da mitose e passam pelo processo de senescência. Independentemente dessa diversidade de resultados, a MC pode ser definida como um mecanismo que ocorre em função de um defeito na mitose, sendo um processo oncossupressivo, que cursa com morte celular e senescência (GALLUZZI et al. 2012).

Com o dano no processo de mitose, as células ficam presas no ciclo, no ponto de transição entre a fase de metáfase e anáfase, passando pelo processo de deslizamento mitótico para que seja possível sair do ciclo, sem que haja segregação adequada dos cromossomos. As células ficam, então, estagnadas em um estado G1 tetraplóide. Este fato é mediado por meio da proteína p53 que promove a ativação da proteína p21 e consequente parada irreversível no ciclo celular, impedindo a propagação de erros da mitose e geração de aneuploidia. Falhas na p53 permitem a geração e sobrevivência de células poliploides, ou células defeituosas (GUADAMILLAS et al. 2011).

A MC foi identificada como sendo a principal resposta das células a vários quimioterápicos. Danos ao DNA ativam a p53, que possui subtipos capazes de realizar a apoptose e senescência das células, embora não seja crucial para a ocorrência desse tipo de morte celular. Sabe-se que para a célula cancerígena se tornar maligna esta precisa fugir da via de apoptose e que podem ser frequentemente observadas, nas células de câncer, falhas na mitose em conjunto com a ausência da p53 funcional, o que pode fazer com que as células sofram catástrofe mitótica após a quimioterapia. Por outro lado, os mecanismos indutores da morte celular após tratamentos com drogas anti-câncer ainda vêm sendo estudados e acredita-se que, no geral, tumores originados nos timócitos, incluindo linfomas de células T, espermatogônias, alguns cânceres sanguíneos ou de medula óssea, geralmente são suscetíveis a indução da apoptose após tratamentos com agentes que causam danos ao DNA. Esse fato ocorre na dependência da ação da p53. Já no

caso de tumores sólidos, que geralmente não apresentam a p53 funcional, a via de morte celular primária após o uso de quimoterápicos lesivos ao DNA, envolve a MC (PORTUGAL et al. 2010).

ANOIKIS

É um termo de origem grega introduzido em 1994 para descrever a resposta apoptótica de células aderentes, devido à ausência de interação entre a célula e a matriz extracelular. A sobrevivência das células aderentes não transformadas depende de sinais transmitidos pelas integrinas e alguns receptores de fatores de crescimento, como por exemplo o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) após interação com a matriz extracelular. Segundo a classificação bioquímica, anoikis pode ser definida como uma cascata restrita às células aderentes, que pode ser iniciada pelo desprendimento da matriz e é caracterizada pela falta de ligação da integrina B1, regulação negativa da expressão do EGFR, inibição da sinalização da quinase extracelular (ERK1) e aumento na expressão de Bim, um membro da família BCL-2 (GALLUZZI et al. 2012).

As integrinas fornecem a informação de que as células estão corretamente posicionadas dentro dos tecidos, pois são receptores de superfície que detectam a matriz extracelular e conectam esta ao citoesqueleto, um processo que promove a ativação de muitas cascatas e respostas celulares. Após essa ligação, as células precisam de fatores de crescimento e citocinas para a proliferação, mecanismo este que assegura o correto desenvolvimento e formação de todos os órgãos e tecidos. O que acontece nesse tipo de morte celular é que ocasionalmente as células adquirem propriedades migratórias ou proliferativas, que resultam no deslocamento para um ambiente inadequado. Desse modo, quando as células perdem as interações normais com a matriz, a célula entra num processo de morte celular programada mediado por caspases, que recebe o nome de anoikis (GUADAMILLAS et al. 2011).

Outro fator importante é que, na maioria dos casos, a anoikis é executada pelos mesmos mecanismos moleculares responsáveis pela apoptose intrínseca das células, sendo um ponto em comum entre os dois programas de morte celular (GALLUZZI et al. 2012). O início e a execução da anoikis é mediado por diferentes vias, todas com a mesma finalidade de promover a ação das caspases mediante sua ativação, tendo como consequência a ativação de endonucleases, fragmentação do DNA e morte celular. A indução da cascata de morte celular ocorre através da interação de duas vias apoptóticas, ou seja, a via das mitocôndrias (via intrínseca) ou a ativação dos receptores de morte da superfície celular (via extrínseca). As proteínas da família BCL-2 são os principais atuantes em ambas as vias (PAOLI et al. 2013).

Acredita-se que a anoikis seja um grande contribuinte para a ampla morte celular que ocorre após transplantes experimentais de cérebro e outros transplantes no SNC, já que este é o processo no qual as células morrem por falta de ligação (NEWLAND et al. 2015). As células tumorais desenvolvem rapidamente vários mecanismos para resistir à anoikis, espalhando metástases para órgãos distantes. Essas células buscam a resistência por diferentes modos: promovendo mudança específica em suas integrinas, impedindo a ligação dos receptores e adaptando-se ao sítio metastático; realizando a transição do epitélio mesenquimal; ativando uma cascata pró-sobrevivência a fatores intrínsecos e ambientais; e ainda, desregulamentando e adaptando o metabolismo, principalmente pela realização da autofagia (PAOLI et al. 2013).

ENTOSIS

O processo de entose precisa de caderina para estabilizar o contato entre as células. O processo de internalização necessita de polimerização pela actina e miosina, Rho e Rho quinase (ROCK) nas células internalizadas. A célula responsável pela fagocitose usa os lisossomos para mediar a degradação da célula englobada, sem que haja envolvimento das caspases nesse processo (YUAN ; KROEMER, 2010).

As células apoptóticas são comumente englobadas por fagócitos de ofício, como os macrófagos, ou células vizinhas não especializadas. No entanto, células vivas podem ser fagocitadas por outras células, um processo denominado de entose, um verdadeiro caso de “canibalismo” no âmbito da biologia celular. Esse mecanismo foi primeiramente descoberto em células tumorais de humanos, e é ativado quando as células perdem sua ligação com a matriz extracelular. Ainda não se sabe o que faz com que a célula se sujeite à entose, já que as células vivas englobadas não expõem resíduos de fosfatidilserina na camada externa das suas membranas plasmáticas, sendo este um dos mais importantes sinais de englobamento nas células apoptóticas (OVERHOLTZER et al. 2007). Além disso, as células englobadas podem ser liberadas ou sofrerem divisão, o que também diferencia esse processo do que ocorre na apoptose (OVERHOLTZER et al. 2007).

Esse tipo de morte celular ocorre com maior frequência nos tumores metastáticos, com consequente progressão dos tumores. Por outro lado, o canibalismo entre as células pode atuar na supressão de tumores em alguns contextos, como a ingestão de células tumorais por células vizinhas, induzindo a morte tumoral (SUN et al. 2014).

Para que a entose seja considerada um mecanismo de morte celular, são necessárias três condições: que as células englobadas não devam sair do fagossomo e serem degradadas dentro do lisossomo; o fenótipo das células deve surgir de interações homotípicas, envolvendo células do mesmo tipo, e não deve envolver fagócitos de ofício; o processo deve ser insensível à ação de químicos e intervenções genéticas que normalmente bloqueiam a apoptose intrínseca caspase dependente e independente (GALLUZZI et al. 2012).

Para definir a entosis, muitos autores utilizam a expressão “canibalismo celular”, mas esse processo difere do processo de canibalismo, sendo que na entose ocorre a invasão de uma célula *in vivo* enquanto o canibalismo não tem seletividade para as células mortas ou células vivas. Durante a entose, células epiteliais vivas ou células tumorais se separam da matriz extracelular e invadem células vizinhas. Este processo difere do processo normal de fagocitose das células apoptóticas e depende de junções ou aderências, além de ser necessária a presença das enzimas Rho e ROCK para que as células sejam internalizadas, sugerindo que a entose é um processo ativo e que precisa de polimerização pela actina para ocorrer. Além dessas enzimas, ocorre envolvimento da caderina-E, proveniente do epitélio, que está envolvida na adesão célula-célula (QIAN ; SHI, 2009).

O mecanismo de entose foi descrito em 1986 em linfoblastos de pacientes portadores da doença de Huntington. Sabe-se também que as células mais eficientes na realização da entose são as células MCF-7 presentes nos tumores de mama, que são células que carecem de caspase-3, não realizando apoptose ou autofagia, o que permite supor que a entose ocorre quando outras reações catabólicas são impedidas ou suprimidas (TAIT et al. 2014).

PARTHANATOS

O termo parthanatos se refere à personificação da morte em grego, e é utilizado para denominar o tipo de morte celular que ocorre mediado pela poli-ADP-ribose (PAR), com importante atuação da enzima poli-ADP-ribose-polimerase-1 (PARP-1). Essa enzima está envolvida nos processos de reparo e transcrição do DNA, mitose e morte celular, sendo que sua atuação neste último processo desperta o interesse das pesquisas para que sejam propostas novas formas de terapias para as doenças. A ativação exacerbada da PARP-1 cursa com morte celular em pacientes com derrame, diabetes, inflamação e neurodegeneração (DAVID et al. 2009).

É uma forma distinta de morte celular e cursa com a rápida ativação da PARP-1 e eventos bioquímicos subsequentes, como a síntese e acúmulo de PAR, despolarização mitocondrial, translocação nuclear do AIF e, possivelmente, ativação das caspases, a qual não ocorre obrigatoriamente. Vale ressaltar que os eventos de ativação da PARP-1, síntese e acúmulo de PAR e translocação nuclear de AIF são fatores exclusivos do mecanismo de parthanatos, o que caracteriza bioquimicamente esse processo, o mesmo não requer a ativação das caspases, sendo impossível a inibição por precursores dessas enzimas, o que distingue esse mecanismo da apoptose caspase-dependente. Além disso, diferente da apoptose, não ocorre a formação de corpos apoptóticos, e a fragmentação do DNA ocorre em larga escala. Assim como na necrose, a morte por parthanatos envolve a perda da integridade da membrana, mas não envolve tumefação celular. Alguns estudos, no entanto, consideram parthanatos e necroptose dois exemplos do programa de necrose regulamentada, mas o envolvimento da PARP-1, PAR e AIF distingue esse mecanismo dos demais. Ainda assim, existem muitas semelhanças bioquímicas e estruturais entre os eventos de apoptose, necrose, autofagia e parthanatos (FATOKUN et al. 2014).

O AIF executa um importante papel nesse tipo de morte celular ao ser, esse fator é liberado pela mitocôndria e migrar para o núcleo da célula. Um evento importante desse mecanismo é a interação entre a PAR com o AIF mitocondrial, causando sua liberação e iniciando uma cascata de morte. Essa interação é chamada de *binding*. Na mitocôndria existem dois sítios de AIF, sendo que aproximadamente 80% do AIF está localizado no citosol da membrana mitocondrial, onde se encontra viável para ligar-se a PAR e ser liberado durante o evento de parthanatos. Com essa ligação, ocorre a migração do AIF para o núcleo, além de induzir uma mudança na conformação do AIF. O AIF é, então, uma molécula-chave no processo de parthanatos, sendo a moduladora da morte celular nessa via (WANG et al. 2011).

PYROPTOSIS

É um tipo de morte celular programada caspase-dependente que se diferencia em vários aspectos da apoptose, dependendo da ativação da caspase-1 ou caspase-11. Assim como sugere seu nome, o termo piroptose é um tipo de morte celular inflamatória (TAIT et al. 2014) e as células piroptóticas podem exibir características morfológicas apoptóticas ou necróticas (GALLUZZI et al. 2012).

A piroptose é uma das vias mais recentemente identificadas como causadora de morte celular, sendo estimulada por uma variedade de infecções, como por exemplo pela *Salmonella*, *Francisella* e *Legionella*, além de estímulos não infecciosos, incluindo fatores produzidos pelo próprio hospedeiro, como ocorre no infarto do miocárdio. A principal enzima que executa esse processo de morte celular

é a caspase-1, que foi primeiramente reconhecida como uma protease que transforma os precursores inativos das IL-1 e IL-18 em citocinas inflamatórias maduras. No entanto, a ativação dessa caspase não resulta apenas na produção de citocinas ativas, mas também na morte celular caracterizada pela ruptura da membrana plasmática e liberação de conteúdo intracelular inflamatório (BERGSBAKEN et al. 2009).

A ação da caspase-1, necessária para que a piroptose seja iniciada, não é pré-requisito para a ocorrência da apoptose. Esse tipo de morte celular está associada à tumefação celular e rápida lise da membrana plasmática, o que ocorre em resposta a uma infecção bacteriana ou toxinas. Desse modo, ocorre o aumento de volume da célula e lise osmótica desta. Curiosamente, semelhante à apoptose, o DNA nuclear sofre uma considerável fragmentação. Embora o mecanismo subjacente de fragmentação do DNA durante a piroptose permaneça indefinido, acredita-se que não ocorra a participação das caspases apoptóticas. Independente das suas funções pró-inflamatórias ou pró-morte, a caspase-1 é ativada em complexos denominados inflamossomos, que são formados em resposta à detecção de moléculas estranhas ao organismo, como as toxinas bacterianas e RNA viral. Após a formação do complexo, ocorre a ativação da caspase-1 e consequente morte da célula (TAIT et al. 2014).

Em linfócitos T CD4 infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), ocorreu intensa piroptose celular, com liberação do conteúdo citoplasmático e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 (DOITSH et al. 2014). Essa via de morte celular liga dois dos maiores eventos que ocorrem na infecção pelo HIV, que são a depleção de células T CD4 e inflamação crônica, criando um ciclo patogênico vicioso onde os linfócitos T CD4 mortos liberam sinais inflamatórios que atraem mais células para a via de morte celular. Esse ciclo pode ser quebrado pela utilização de inibidores da atividade da caspase-1, que, segundo os estudos, são de uso seguro em humanos, aumentando assim as possibilidades de uma nova classe de medicamentos para essa doença, tendo como alvo não o vírus, mas a melhora na condição do hospedeiro (DOITSH et al. 2014).

NETOSIS

Em resposta a diversos estímulos, os neutrófilos e eosinófilos podem liberar as chamadas armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs), que são compostas por estruturas microbidas, cromatina nuclear, histonas e proteínas granulares (GALLUZZI et al. 2012). Os neutrófilos são importantes células atuantes nos processos imunológicos. Eles migram para o sítio da infecção e matam os patógenos por meio da fagocitose, degranulação e liberação de armadilhas, as NETs, que capturam e matam uma série de micro-organismos. Além disso, essas estruturas desempenham uma variedade de funções adicionais para a imunidade do organismo, sendo importantes nos eventos inflamatórios e doenças autoimunes (BRANZK ; PAPAYANNOPOULOS, 2013).

Essas armadilhas dos granulócitos são ricas em histonas e são liberadas a partir de células viáveis intactas. Em contraste com as células autofágicas, as células netóticas não exibem sinais “*eat-me*”, como no caso da fosfatidilserina exposta na membrana plasmática; não ocorre a exposição do lipídio sem que haja a ruptura da membrana, ao contrário do que ocorre nas células autofágicas, evitando que haja depuração das células netóticas pelos fagócitos. Diferentes fungos, bactérias e protozoários induzem a liberação das NETs. Ao contrário ao que ocorre na autofagia e necrose regulamentada, na netose ambas as membranas nuclear e

granular são desintegradas, mas a integridade do plasma é mantida, o que permite que os grânulos antimicrobianos se misturem à cromatina nuclear. Não são observados sinais morfológicos de apoptose, como a condensação da cromatina nuclear, exposição de fosfatidilserina, alterações na membrana e clivagem do DNA (REMIJSEN et al. 2011).

O primeiro sinal da ocorrência da netose como um mecanismo de morte celular é uma alteração na morfologia do núcleo da célula, que perde a arquitetura lobulada característica. Posteriormente, as membranas nucleares se desmontam e ocorre descondensação da cromatina no citoplasma, enquanto a membrana plasmática permanece intacta. Por fim, ocorre rompimento da membrana, com liberação das NETs. Esse processo é irreversível e dependente de espécies reativas de oxigênio, como o superóxido, gerado pela clivagem de NADPH, sendo necessária a ativação da enzima NADPH oxidase (CHEN et al. 2014).

A netose é insensível aos inibidores das caspases e a necrostatina-1, o que também diferencia do processo de apoptose e necroptose. No entanto, o processo de netose pode ser suprimido pela inibição da enzima NADPH oxidase, já que o depende das espécies reativas de oxigênio, que precisam dessa enzima para sua síntese. Com isso, a netose pode ser definida como um processo restrito aos granulócitos, insensível à inibição das caspases e necrostatina, dependente da NADPH oxidase, com consequente geração de superóxido e dependente de componentes do mecanismo de autofagia (GALLUZZI et al. 2012).

A cicatrização de feridas em diabéticos possui relação com a netosis, pois apresentam aumento da liberação das NETs, por meio do processo de morte celular. É desencadeado pelo aumento das taxas de glicose nos pacientes com diabetes, inibindo ou retardando a cicatrização das feridas (MENEGAZZO et al. 2015).

Os neutrófilos invadem o sítio inflamatório e secretam as NETs para que os micro-organismos sejam neutralizados por meio da descondensação da cromatina, as quais são geradas pela ação da peptidilarginina-desaminase-4 (PAD4). A expressão desses neutrófilos é regulada pela hiperglicemia, aumentando a ocorrência da netose e prejudicando a cicatrização das feridas em portadores da diabetes. O elevado teor de glicose *in vitro* e consequente hiperglicemia *in vivo* induziram netose e liberação das armadilhas dos neutrófilos e seus produtos, prejudicando a cicatrização de feridas em pacientes com diabetes tipo dois (WRIGHT et al. 2014).

A netosis pode ser, então, considerada uma forma especializada de morte celular. O processo envolve o influxo de cálcio e a produção de espécies reativas de oxigênio. Ocorre descondensação da cromatina e formam-se poros na membrana nuclear, permitindo a saída de grânulos e proteínas citoplasmáticas, que se misturam com a cromatina. Por fim, ocorre a ruptura da membrana celular dos neutrófilos, com liberação das NETs, que são compostas por materiais nucleares, como o DNA e histonas, bem como enzimas granulares como a mieloperoxidase, elastase, lactoferrina e as proteínas citoplasmáticas. Essas proteínas funcionam como agentes antimicrobianos durante a netosis induzida por patógenos, mas também pode atuar como fonte de auto-antígenos durante a netosis do tipo auto-imune, em doenças como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatoide. Essa participação nas doenças auto-imunes foi confirmada com o aumento da liberação das NETs na artrite reumatoide. A liberação foi maior no tecido sinovial dos pacientes com a doença, em comparação aos pacientes saudáveis do grupo controle. A liberação ocorre mediante a ação de citocinas inflamatórias IL-17 e TNF, o que explica a persistência da doença e da inflamação nesses casos, contribuindo

para a fisiopatologia da inflamação nessa doença maneiras e auxiliando na abordagem da terapêutica (ECKHART et al. 2013).

CORNIFICAÇÃO

Embora as células da camada basal da epiderme respondam a agressões, como a radiação UV, por meio de apoptose ou necrose, as células da camada mais externa continuam sendo submetidas a uma morte celular “fisiológica”, que foi chamada de cornificação (GALLUZZI et al. 2012). A superfície do corpo dos animais terrestres está sempre exposta ao ar e a estresse mecânico, o que faz com que um mecanismo de defesa seja necessário para a proteção das células dessa região. Além disso, a pele funciona como barreira mecânica às infecções microbianas. Os queratinócitos produzem antimicrobianos para exercerem essa função de proteção, protegendo o organismo contra a entrada de bactérias, vírus, fungos e parasitas (ECKHART et al. 2013).

Essas células, os queratinócitos, são o maior tipo celular presente na epiderme, e sofrem uma forma especializada de morte celular, a cornificação, que é diferente da apoptose, sendo que, durante esse processo, as células perdem as organelas, incluindo o núcleo, para se tornarem corneócitos mortos. No estágio final desse mecanismo, as células mortas são removidas da pele por um processo conhecido como descamação. Para que a cornificação aconteça, não são necessários mediadores apoptóticos, mas é necessária a ativação da caspase-14, uma caspase não-apoptótica expressada exclusivamente no epitélio cornificado e ativada durante o processo de morte celular (YUAN ; KROEMER, 2010).

O processo de cornificação compreende três elementos chave: a substituição das organelas intracelulares e conteúdo intracelular por um compacto citoesqueleto proteínico; a reticulação das proteínas na periferia das células para formar um envelope celular cornificado; a ligação entre os corneócitos com uma estrutura multicelular, funcional, mas biologicamente morta. As estruturas da epiderme da pele e apêndices são mantidas por diferenciação de queratinócitos a partir de um *pool* de células-tronco, que estão localizadas na camada basal da epiderme, especialmente nos folículos pilosos (ECKHART et al. 2013).

Essas células dão origem a novas células por meio de divisão assimétrica e proliferação de queratinócitos, gerando células filhas que se mudam para as camadas suprabasais da epiderme e se instalam nos folículos pilosos. Uma vez que os queratinócitos são separados da base da membrana epitelial, eles mudam a expressão gênica sob o controle da enzima p63 e de outros fatores de transcrição. Ao invés de expressarem queratina K5 e K14, como fazem as células da camada basal, os queratinócitos proliferados expressam K1 e K10. No folículo piloso, os queratinócitos expressam queratina rica em cisteína, capaz de formar múltiplas pontes de dissulfureto, que conferem resistência mecânica adicional a essas células (ECKHART et al. 2013).

Todos os processos que ocorrem nesse mecanismo de morte das células estão associados com a ativação de células de morte, como as caspases. Já do ponto de vista bioquímico, a cornificação está associada com a síntese de enzimas e substratos que são necessários para a formação do estrato córneo. Nesse processo, como dito anteriormente, ocorre envolvimento das caspases e da transglutaminase, as quais catalisam as reações, além da participação de proteínas como a filagrina, involucrina e loricrina. Há também a participação dos lipídios, que atuam no espaço extracelular e se ligam por meio de ligações covalentes às proteínas do envelope córneo, assegurando a impermeabilidade da pele (GALLUZZI et al. 2012).

A epiderme é formada por camadas, onde observa-se queratinócitos em vários estados de diferenciação, com características morfológicas diferentes e presença de marcadores de expressão. As células da camada basal da epiderme estão associadas à membrana por meio de hemidesmossomos, que são células com capacidade de proliferar e fornecer novas células que irão se diferenciar e serem transportadas em direção à superfície da pele. As células da camada espinhosa da epiderme não se dividem, e expressam marcadores típicos de diferenciação, tais como as queratinas K1 e K10, e ainda expressam a caspase-14. Já na camada granulosa, existem grânulos de querato-hialina, e as proteínas do complexo de diferenciação epidérmica (EDC) são expressas. Na transição entre a camada granulosa para a camada cornificada, ocorre a ativação da caspase-14, o que contribui para a degradação da filagrina, e a queratina e outras proteínas são sintetizadas pelas transaminases. Já no citoplasma das células, ocorre a ligação cruzada das proteínas com a membrana plasmática, constituindo o envelope córneo, que está firmemente ligado aos envelopes córneos das células vizinhas, por meio de junções ou aderências, que formam fortes interações intercelulares (ECKHART et al. 2013).

O processo de morte celular por cornificação também pode ser chamado de queratinização ou formação do envelope córneo, e se assemelha aos processos de diferenciação de outros tecidos, como o epitélio do cristalino e as células vermelhas do sangue (GALLUZZI et al. 2012). A compreensão do processo de cornificação é de extrema importância para auxiliar no desenvolvimento de estratégias para melhorar a função de barreira da pele e resposta desse órgão às inflamações, auxiliando os pacientes com doenças como a dermatite atópica e psoríase (ECKHART et al. 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A classificação da morte celular, quanto às suas características bioquímicas, é importante para que se faça uma análise minuciosa dos processos e vias que a compõem, permitindo um maior entendimento das consequências das lesões irreversíveis nas células. Com isso, é possível lançar mão de estratégias e tratamentos para que a morte das células seja prevenida ou cessada.

Essa forma de se classificar os tipos de morte celular, levando em consideração as alterações moleculares, é vantajosa por se basear em métodos quantitativos, mas tem como desvantagem o alto custo de implantação, já que a maioria dos testes e experimentos requer maquinário específico e materiais de alto custo, em comparação aos utilizados nas análises morfológicas, como é o caso do microscópio de luz.

Como essa alteração na nomenclatura foi feita em 2012, é ainda muito recente, e faltam pesquisas e trabalhos envolvendo essa nova forma de classificar e definir a morte celular, principalmente na veterinária.

As vias de ativação de tais processos bioquímicos vêm sendo cada vez mais estudadas na medicina, sendo de extrema importância na oncologia e infectologia. Vários estudos baseiam-se na determinação dos mecanismos de morte das células nos processos tumorais e de doenças que preocupam a população, como no caso do HIV.

Conhecendo as cascatas de ativação da morte celular e as enzimas e receptores que atuam nelas, é possível lançar mão de estratégias que objetivam a interrupção ou ativação desses mecanismos, que são importantes no combate aos processos patológicos e defesa do organismo, garantindo a sua homeostasia.

REFERÊNCIAS

- BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 99, 2009. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2910423/> >. doi: 10.1038/nrmicro2070.
- BRANZK, N.; PAPAYANNOPOULOS, V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2013. p. 513-530. Disponível em < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-013-0384-6> >. doi: 10.1007/s00281-013-0384-6.
- CAI, Z., LIU, Z. G.. Execution of RIPK3-regulated necrosis. **Molecular & cellular oncology**, v. 1, n. 2, p. e960759, 2014. Disponível em < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/23723548.2014.960759> >. doi: 10.4161/23723548.2014.960759.
- CHEN, F., BARMAN, S., YU, Y., HAIGH, S., WANG, Y., DOU, H. et al. Caveolin-1 is a negative regulator of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 201-213, 2014. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4228786/> >. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.029.
- CHU, H., ZHOU, J., WONG, B. H. Y., LI, C., CHAN, J. F. W., CHENG, Z. S. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus efficiently infects human primary T lymphocytes and activates the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. **The Journal of infectious diseases**, v. 213, n. 6, p. 904-914, 2015. Disponível em < <https://academic.oup.com/jid/article/213/6/904/2459221/Middle-East-Respiratory-Syndrome-Coronavirus> >. doi: 10.1093/infdis/jiv380.
- DAVID, K. K., ANDRABI, S. A., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L. Parthanatos, a messenger of death. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 1116, 2009. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4450718/> >.
- DOITSH, G., GALLOWAY, N. L., GENG, X., YANG, Z., MONROE, K. M., ZEPEDA, O. et al. Pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 509, 2014. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047036/> >. doi: 10.1038/nature12940.
- ECKHART, L., LIPPENS, S., TSCHACHLER, E., DECLERCQ, W. Cell death by cornification. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3471-3480, 2013. Disponível em < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913002334> >. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.010.
- FATOKUN, A. A.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 8, p. 2000-2016, 2014. Disponível em < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.12416/full> >. doi: 10.1111/bph.12416.

FERRAZ, L. D. C., SANTOS, A. B. R., DISCACCIATI, M. G.. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 30, n. 2, p. 107-111, 2012. Disponível em < <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=655200&indexSearch=ID> >.

FRAGKOS, M; BEARD, P. Mitotic catastrophe occurs in the absence of apoptosis in p53-null cells with a defective G1 checkpoint. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e22946, 2011. Disponível em < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0022946> >. doi: 10.1371/journal.pone.0022946.

FULDA, S., DEBATIN, K. M.. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798, 2006. Disponível em < <https://search.proquest.com/openview/02a9a1ea3f122b61d5fe5097e162b139/1?pq-origsite=gscholar&cbl=36330> >.

GALLUZZI, L., VITALE, I., ABRAMS, J. M., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107, 2012. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3252826/> >. doi: 10.1038/cdd.2011.96.

GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007. Disponível em < https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34283765/revisao4.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1506796279&Signature=aQ1AC4DwnTHuNgdJ0qqT1lfbluQ%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DMorte_Celular_por_Apoptose_Apoptosis_Pro.pdf >.

GUADAMILLAS, M. C.; CEREZO, A; DEL POZO, M. A. Overcoming anoikis-pathways to anchorage-independent growth in cancer. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 19, p. 3189-3197, 2011. Disponível em < <http://jcs.biologists.org/content/124/19/3189.short> >. doi: 10.1242/jcs.072165.

HONGMEI, Z. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. In: **Apoptosis and Medicine**. Intech, 2012. Disponível em < <https://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review> >. doi: 10.5772/50129.

HWANG, M. S., BAEK, W. K. Glucosamine induces autophagic cell death through the stimulation of ER stress in human glioma cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 399, n. 1, p. 111-116, 2010. Disponível em < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10013616> >. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.050.

KAKU, Y., TSUCHIYA, A., KANNO, T., NAKANO, T., NISHIZAKI, T. Diarachidonoylphosphoethanolamine induces necrosis/necroptosis of malignant pleural mesothelioma cells. **Cellular signalling**, v. 27, n. 9, p. 1713-1719, 2015. Disponível em <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656815001552> >. doi:
10.1016/j.cellsig.2015.05.007.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3, 2009. Disponível em <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2744427/> >. doi:
10.1038/cdd.2008.150.

LI, S. W., LIU, C. M., GUO, J., MARCONDES, A. M., DEEG, J., LI, X., GUAN, F. Iron overload induced by ferric ammonium citrate triggers reactive oxygen species-mediated apoptosis via both extrinsic and intrinsic pathways in human hepatic cells. **Human & experimental toxicology**, v. 35, n. 6, p. 598-607, 2016. Disponível em <
<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0960327115597312> >. doi:
10.1177/0960327115597312.

LIU, Y.; LEVINE, B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. **Cell death and differentiation**, v. 22, n. 3, p. 367, 2015. Disponível em <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326571/> >. doi:
10.1038/cdd.2014.143.

MCGAVIN, M. D; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. 1476p.

MENEGAZZO, L., CICILIOT, S., PONCINA, N., MAZZUCATO, M., PERSANO, M., BONORA, B. et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. **Acta diabetologica**, v. 52, n. 3, p. 497-503, 2015. Disponível em <
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00592-014-0676-x> >. doi: 10.1007/s00592-014-0676-x

NEWLAND, B., WELZEL, P. B., NEWLAND, H., RENNEBERG, C., KOLAR, P., TSURKAN, M. et al. Tackling cell transplantation anoikis: an injectable, shape memory cryogel microcarrier platform material for stem cell and neuronal cell growth. **Small**, v. 11, n. 38, p. 5047-5053, 2015. Disponível em <
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/smll.201500898/full> >. doi:
10.1002/smll.201500898.

OVERHOLTZER, M., MAILLEUX, A. A., MOUNEIMNE, G., NORMAND, G., SCHNITT, S. J., KING, R. W. et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 966-979, 2007. Disponível em <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407013943> >. doi:
10.1016/j.cell.2007.10.040.

PAOLI, P; GIANNONI, E; CHIARUGI, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell**

Research, v. 1833, n. 12, p. 3481-3498, 2013. Disponível em < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913002498> >. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026.

PORTUGAL, J., MANSILLA, S., BATALLER, M. Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 1, p. 69-78, 2010. Disponível em < <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2010/00000016/00000001/art00007> >. doi: 10.2174/138161210789941801.

QIAN, Y; SHI, Y. Natural killer cells go inside: entosis versus cannibalism. **Cell research**, v. 19, n. 12, p. 1320, 2009. Disponível em < <https://search.proquest.com/openview/3b8a8e40b8d9cc4018ad7853ed7e07eb/1?pq-origsite=gscholar&cbl=536307> >.

RANGASAMY, S., JU, H., UM, S., OH, D. C., SONG, J. M. Mitochondria and DNA targeting of 5, 10, 15, 20-tetrakis (7-sulfonatobenzo [b] thiophene) porphyrin-induced photodynamic therapy via intrinsic and extrinsic apoptotic cell death. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 17, p. 6864-6874, 2015. Disponível em < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.5b01095> >. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01095.

REMIJSEN, Q., KUIJPERS, T. W., WIRAWAN, E., LIPPENS, S., VANDENABEELE, P., BERGHE, T. V. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 4, p. 581, 2011. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3131909/> >. doi: 10.1038/cdd.2011.1.

ROGALSKA, A., GAJEK, A., MARCZAK, A. Epothilone B induces extrinsic pathway of apoptosis in human SKOV-3 ovarian cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 4, p. 675-683, 2014. Disponível em < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233314000320> >. doi: 10.1016/j.tiv.2014.02.007.

SUN, Q., CIBAS, E. S., HUANG, H., HODGSON, L., OVERHOLTZER, M. Induction of entosis by epithelial cadherin expression. **Cell research**, v. 24, n. 11, p. 1288, 2014. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4220160/> >. doi: 10.1038/cr.2014.137.

TAIT, S. W., ICHIM, G., GREEN, D. R. Die another way—non-apoptotic mechanisms of cell death. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 10, p. 2135-2144, 2014. Disponível em < <http://jcs.biologists.org/content/127/10/2135.short> >. doi: 10.1242/jcs.093575.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 7, p. 1153, 2008. Disponível em < <https://search.proquest.com/openview/ea8cb63faf82147c0e49fdec57f2940a/1?pq-origsite=gscholar&cbl=44124> >. doi: 10.1038/cdd.2011.96.

VELEZ, A. M. A; HOWARD, M. S. Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin. **North American journal of medical sciences**, v. 7, n. 5, p. 176, 2015. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462812/> >. doi: 10.4103/1947-2714.157476.

WANG, Y., KIM, N. S., HAINCE, J. F., KANG, H., DAVID, K. K., ANDRABI, S. A. et al. Poly (ADP-ribose)(PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). **Science signaling**, v. 4, n. 167, p. ra20, 2011. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086524/> >. doi: 10.1126/scisignal.2000902.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 593-601, 2014. Disponível em < <http://www.nature.com/nrrheum/journal/v10/n10/full/nrrheum.2014.80.html?foxtrotcallback=true> >. doi: 10.1038/nrrheum.2014.80.

YUAN, J; KROEMER, G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. **Genes & development**, v. 24, n. 23, p. 2592-2602, 2010. Disponível em < <http://genesdev.cshlp.org/content/24/23/2592.short> >. doi: 10.1101/gad.1984410.

ZHANG, Y., SONG, L., CAI, L., WEI, R., HU, H., JIN, W. Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. **Food and chemical toxicology**, v. 53, p. 325-333, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512008927> >. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.019

ZHU, X. X., YAO, X. F., JIANG, L. P., GENG, C. Y., ZHONG, L. F., YANG, G. et al. Sodium arsenite induces ROS-dependent autophagic cell death in pancreatic β -cells. **Food and chemical toxicology**, v. 70, p. 144-150, 2014. Disponível em < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691514002403> >. doi: 10.1016/j.fct.2014.05.006.