

Departamento de Química

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

AZT - Molécula de Morte e Sobrevivência Celular



Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Avançada. O trabalho foi realizado no Instituto Bioquímica da Faculdade de Medicina e Laboratório de Bioquímica Genética do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Manuela Monteiro Grazina e a co-orientação da Professora Doutora Mariette Pereira.

Catarina Inês Sanches Pinto

2010/2011

Dedicatória:

*“ Sem Sonhos, as pedras tornam-se insuportáveis,
as pedras do caminho tornam-se montanhas,
os fracassos transformam-se em golpes fatais.
Mas se você tiver grandes sonhos...
os seus erros produzirão crescimento,
os seus desafios produzirão oportunidades,
os medos produzirão coragem.
Por isso, o meu ardente desejo é que você
NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS.”*

Augusto Cury

Resumo:

Neste trabalho descrevem-se os efeitos do AZT, um fármaco usado na terapia anti-HIV, mas que pode provocar efeitos secundários, nomeadamente miopatia. Apesar do seu amplo uso terapêutico, os mecanismos moleculares de acção e os múltiplos efeitos tóxicos do AZT continuam por esclarecer. Uma vez que a mitocôndria constitui um dos principais alvos de acção de muitos fármacos, o estudo das alterações nas funções mitocôndriais poderá contribuir para clarificar a acção e efeitos secundários tóxicos do AZT e ajudar a entender melhor os seus múltiplos efeitos em diferentes tipos de células.

As células HeLa foram obtidos de tecido da Senhora Henrietta Lacks, que sofria de cancro do colo do útero e foi seguida no Hospital Johns Hopkins. Desde a sua morte, as suas células foram continuamente usadas em diversos estudos, tais como na área do cancro, SIDA, efeitos da radiação, mapeamento genético e muito mais.

O AZT ou Zidovudina, é um fármaco utilizado como antiviral, inibidor de transcriptase reversa viral. Indicado para tratamento da SIDA. Compreender os mecanismos da acção do AZT, incluindo o papel de regulação da apoptose, é essencial para compreender os seus efeitos na célula.

Este trabalho teve o objectivo de avaliar a citotoxicidade do AZT, em células HeLa, tendo sido avaliada por duas metodologias: I) Avaliação Morfológica da Apoptose e II) Avaliação da Libertação de LDH.

Foram analisados os efeitos do AZT em células HeLa na morfologia celular através de técnicas de microscopia de fluorescência. Os resultados revelam um efeito inibitório do AZT, dependente da concentração e tempo de exposição, no crescimento / viabilidade das células HeLa, confirmando a susceptibilidade ao AZT (Zidovudina). O efeito do AZT na morfologia de células HeLa, foi visualizado por microscopia de fluorescência, nomeadamente por avaliação da cromatina, e fragmentação do núcleo e formação de projecções em forma de bolha na membrana celular.

Foi possível observar células apoptóticas, que aumentaram em número com o aumento da concentração e tempo de exposição ao AZT. Por outro lado, observou-se o aumento da Libertação de LDH com o aumento da concentração de AZT, embora sem significado estatístico.

Abstract:

In the present work, we describe the effects of AZT, a drug used in the AIDS therapy, although it may cause secondary effects, namely myopathy. Even though the wide therapeutic use, the molecular mechanisms of AZT action are still unclear.

Since mitochondria is one of the major targets of different drugs, the study of mitochondrial function may contribute to clarify the effects and secondary changes mediated by AZT, in order to achieve a better understanding of its multiple effects on different cell types.

HeLa cells were obtained from tissue of Mrs. Hernrietta Lacks, whom suffered from cervical cancer and was followed at Johns Hopkins Hospital. Since her death, her cells have been used for many studies, such as in cancer, AIDS, radiation effects, gene mapping and many more.

AZT, or Zidovudin, is an antiviral drug, which inhibits reverse transcriptase, indicated for treatment of AIDS. The understanding of AZT mechanisms of action is essential to the clarification of its effects at the cell level.

The present work aimed to evaluate the cell toxicity induced by AZT, in HeLa cells, by two methodological approaches: I) Morphologic evaluation of apoptosis and II) Evaluation of LDH release.

The effects of AZT in HeLa cells morphology were analysed by fluorescent microscopy techniques. The results show an inhibitory effect, concentration- and incubation time-dependent, in the cell viability and proliferation, confirming the susceptibility to AZT.

The AZT effect on the HeLa cells morphology was visualized by fluorescent microscopy, namely by evaluation of chromatin condensation, nuclei fragmentation and formation of membrane blebbing.

It was possible to observe apoptotic cells, which increased in number, with the increasing of concentration and time of exposure. Additionally LDH release was increased with higher concentrations, although it was not statistically significant.

Palavras-chave / Keywords:

Palavras-chave

AZT

Apoptose

Mitocôndria

Células HeLa

Teste de Citotoxicidade

Microscopia de Fluorescência

Keywords

AZT

Apoptosis

Mitochondrial

Hela Cells

Cytotoxicity assays

Fluorescence microscopy

Agradecimentos:

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio e encorajamento que fui recebendo ao longo deste período. A todos deixo o meu agradecimento.

O meu mais profundo agradecimento é dirigido à Professora Doutora Manuela Grazina, à Professora Doutora Mariette Pereira, não só pela orientação deste trabalho, como pela confiança em mim depositada para a sua concretização e pelo entusiasmo, disponibilidade e amizade que sempre me dispensou.

Aos meus amigos e colegas de “viagem”, que embarcaram no mesmo cais, reservo uma passagem para a outra margem da amizade e um lugar certo no canto do coração e da memória, e agradeço todo o apoio que me permitiu abraçar um projecto que, sendo exigente, os torna mais queridos.

A todos os docentes e demais elementos da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra no Instituto Bioquímica e Laboratório de Bioquímica Genética do Centro de Neurociências e Biologia Celular, de quem sempre recebi simpatia e amizade.

Aos meus familiares, por todo o apoio que sempre me dispensaram, pela educação que me deram e pela formação que me proporcionaram, e toda a paciência que sempre revelaram, mesmo quando parecia impossível ter mais.

A todos o meu muito Bem-Haja

Coimbra, 30 de Outubro de 2010

Catarina Inês Sanches Pinto

Índice geral:

<i>1. Introdução.....</i>	<i>17</i>
<i>1.1. A Célula.....</i>	<i>17</i>
<i>1.2. A Célula HeLa.....</i>	<i>18</i>
<i>1.3. Cultura de Células HeLa.....</i>	<i>18</i>
<i>1.3.1. Condições da Cultura de Células HeLa.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4. A Mitocôndria.....</i>	<i>21</i>
<i>1.4.1. Descrição Geral e Estrutura das Mitocôndrias.....</i>	<i>21</i>
<i>1.4.2. Funções das Mitocôndrias.....</i>	<i>22</i>
<i>1.4.3. Mitocôndria na Apoptose.....</i>	<i>23</i>
<i>1.5. Apoptose.....</i>	<i>24</i>
<i>1.5.1. Características da Apoptose.....</i>	<i>24</i>
<i>1.5.2. Mecanismos Moleculares de Activação da Apoptose.....</i>	<i>25</i>
<i>1.5.3. Apoptose e as Doenças.....</i>	<i>28</i>
<i>1.5.4. Potenciais Tratamentos.....</i>	<i>30</i>
<i>1.6. AZT.....</i>	<i>30</i>
<i>1.6.1. Estrutura dos Vírus.....</i>	<i>30</i>
<i>1.6.2. Função Viral e Histórica do Ciclo Biológico.....</i>	<i>31</i>
<i>1.6.3. Fármacos Antivirais.....</i>	<i>34</i>
<i>1.6.4. Fármacos Anti-HIV.....</i>	<i>35</i>
<i>1.6.5. Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa.....</i>	<i>36</i>
<i>1.6.5.1. Zidovudina.....</i>	<i>36</i>
<i>1.6.6. Efeitos Citotóxicos – AZT na Apoptose.....</i>	<i>37</i>
<i>2. Materiais e Métodos.....</i>	<i>38</i>
<i>2.1. Materiais.....</i>	<i>39</i>

<i>2.1.1. Meio de Cultura e Reagentes.....</i>	<i>39</i>
<i>2.2 Métodos.....</i>	<i>40</i>
<i>2.2.1. Cultura de Células.....</i>	<i>40</i>
<i>2.2.2. Indução de Apoptose.....</i>	<i>40</i>
<i>2.2.3. Ensaio do Lactato Desidrogenase (LDH).....</i>	<i>40</i>
<i>2.2.4. Avaliação Morfológica da Apoptose nas Células em Cultura.....</i>	<i>41</i>
<i>2.2.5. Exposição de Células HeLa ao AZT.....</i>	<i>41</i>
<i>3. Resultados.....</i>	<i>43</i>
<i>4. Discussão e Conclusões.....</i>	<i>48</i>
<i>5. Bibliografia.....</i>	<i>51</i>

Lista de abreviaturas:

ADP – Adenosine Diphosphate (Adenosina Difosfato)

AIF – Factor Indutor da Apoptose

APAF – 1 – Factor Activador de Proteases Pró-apoptóticos

ATP – Adenosine Triphosphate (Adenosina Trifosfato)

AZT – Azidotimidina

Bax e Bim – Proteínas Pró-apoptóticas

Bcl-2 e Bcl-xL – Proteínas Anti-apoptóticas

CARD – Domínio de Recrutamento de Caspases

CCR5 – Chemokine (C-C Motif) Receptor 5 (C-C Receptor Quemoquina Tipo 5)

CD4⁺ - Cluster of Differentiation 4 (Grupamento de Diferenciação 4)

CD8⁺ - Cluster of Differentiation 8 (Grupamento de Diferenciação 8)

CD95 – Receptor de Morte

CoA – Coenzima A

CRM – Cadeia Respiratória Mitocôndrial

CTL - Citotóxicos T Linfócitos

Cyt c – Citocromo c

DCA – Ácido Dicloroacético

DD – Domínio de Morte

DED – Domínio Efeitor de Morte

DISC – Complexo de Sinalização Indutor de Morte

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

Endo G – Endonuclease G

FADD – Fas-Associated protein with Death Domain (Fas-proteína associada com o domínio de morte)

FADH₂ – Flavina Adenina Dinucleotídeo

Fas – Receptor de Morte

FBS (SFB) – Foetal Bovine Serum (Soro do Feto Bovino)

HAART – Terapia Antiretroviral Altamente Activa

HeLa - Linha Celular do Carcinoma Cervical Humano

HIV – Vírus da Imunodeficiência Vírus

HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana 1

HIV-2 – Vírus da Imunodeficiência Humana 2

Hsp10 – Cofactor Genoma

IAPs – Inibidores das Proteínas Apoptóticas

IMS – Factor Pró-apoptóticos do Espaço Intermembranar

IPs – Inibidor de Protease

ITRN – Inibidor Nucleosídeo da Transcriptase Reversa

LCR – Concentração no Líquido Cefalorraquidiano

LDH – Lactato Desidrogenase

MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos-1

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleótidos (Oxidado)

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleótidos (Reduzido)

NIAP – Proteínas Inibidoras da Apoptose Neuronal

Omi/HtrA2 – Protease Serina

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

PTM – Permeabilidade Transitória Mitocôndrial

RANTES – Célula T Regulamentado na Activação Normal Expressa e Secretada

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m – Ácido Ribonucleico Mensageiro

ROS – Espécies Reactivas de Oxigénio

SDF-1 – Factor derivado de Células do Estroma - 1

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Smac/DIABLO – Activador de Caspases derivado na Segunda Mitocondria (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) / ***DIABLO***

TNF - α – Factor de Necrose Tumoral Alfa

TRADD – Factor Receptor do Tipo 1 do Necrose Tumor Associado ao Domínio de Morte

TRAIL – Receptor Efectores de Morte

UQ – Ubiquinona (Coenzima Q)

UV – Ultravioleta

XIAP – X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (Inibidor X – ligado da Proteína de Apoptose)

Lista de figuras:

<i>Figura 1</i> – A Célula Animal.....	17
<i>Figura 2</i> – A Célula Procariótica e Eucariótica.....	17
<i>Figura 3</i> – Cultura de Células HeLa.....	19
<i>Figura 4</i> – O Microscópio Óptico, a Câmara de Fluxo Laminar e a Incubadora	20
<i>Figura 5</i> – Mitocôndria.....	21
<i>Figura 6</i> – Descrição da Disfunção Mitocôndrial.....	22
<i>Figura 7</i> – Representação Gráfica da Mitocôndria.....	22
<i>Figura 8</i> – A Via Mitocôndrial de Morte Celular.....	24
<i>Figura 9</i> – Apoptose.....	25
<i>Figura 10</i> – Cascatas de Activação de Caspases Intrínsecas versus Extrínsecas.....	26
<i>Figura 11</i> – Via Apoptótica Extrínseca.....	26
<i>Figura 12</i> – Via Apoptótica Intrínseca.....	27
<i>Figura 13</i> – Libertação de proteínas IMS.....	27
<i>Figura 14</i> – Caspases Iniciadoras e Caspases Efectoras.....	28
<i>Figura 15</i> – Diagrama Esquemático dos Componentes de uma Partícula Viral ou Vírião.....	31
<i>Figura 16</i> – Números Mundiais de Adultos e Crianças Infectadas com o HIV.....	33
<i>Figura 17</i> – Diagrama esquemático da Infecção da Célula TCD4+ por um vírião HIV, com os locais de acção das duas principais classes de fármacos e locais de possíveis fármacos novos.....	33
<i>Figura 18</i> – Resumo Esquemático da Evolução da Infecção por HIV.....	34
<i>Figura 19</i> – HIV (Vírus da Imunodeficiência Vírus).....	35
<i>Figura 20</i> – AZT (Zidovudina).....	36
<i>Figura 21</i> – Resultados de Análise de Microscópio de Fluorescência.....	45

Figura 22 – Resultados de Liberação de LDH em Função da Concentração de AZT.....46

Lista de tabelas:

Tabela 1 - Algumas estruturas das células do hospedeiro que podem actuar como receptores para vírus.....31

Objectivos de trabalho:

O objectivo deste trabalho foi realizado e culminou nesta Dissertação:

1. Avaliar os efeitos citotóxicos e morfológicos do AZT em células HeLa: relação concentração / tempo de exposição – resposta;
2. Caracterização da morte celular por apoptose através de técnicas de microscopia de fluorescência (Hoechst 33258).

Capítulo 1

1. Introdução

1. Introdução:

1.1. A Célula:

A célula é a unidade básica da vida (**Figura 1**). É a unidade estrutural e funcional de todos os seres vivos. Os organismos multiplicam-se, reproduzem-se, sendo estes processos efectuados através das células. A forma de vida mais simples que é capaz de produzir cópias de si mesma, é a célula.

As células foram descobertas em 1665 por Robert Hooke, ao examinar lâminas de cortiça num microscópio rudimentar. Hooke observou cavidades poliédricas, às quais chamou células (do latim *cella*, pequena cavidade). Na prática observou paredes de células vegetais mortas. As células são limitadas por uma membrana celular (citoplasmática) e no seu interior contêm uma solução aquosa, o citoplasma. No citoplasma encontram-se dispersas numerosas estruturas designadas no seu conjunto por organelos.



Figura 1. A célula Animal

[Fonte: <http://clientes.netvisao.pt/biolgeol/Imagens%20e%20Animacoes.htm>]

As células podem ser divididas em dois grandes grupos, consoante possuem ou não uma estrutura designada por núcleo. De acordo com esta divisão temos as células: procarióticas e eucarióticas (**Figura 2**). As células procarióticas são relativamente simples (comparativamente às eucarióticas) e são as que se encontram nas bactérias e cianófitas. São organismos constituídos por uma só célula. As células eucarióticas podem ser encontradas em seres unicelulares e pluricelulares. São células complexas que se encontram nos animais e plantas.

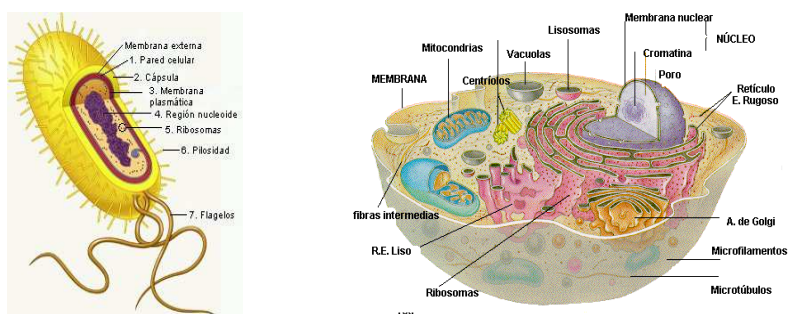


Figura 2. A célula procariótica e eucariótica

[Fonte: <http://citologiaturma108.blogspot.com/2007/11/principal-caracteristica-da-clula.html> and http://html.rincondelvago.com/teoria-celular_2.html]

1.2. Células HeLa:

Henrietta Lacks (Roanoke, 18 de Agosto de 1920 — Baltimore, 4 de Outubro de 1951), foi a doadora involuntária de uma cultura de células cancerosas, mais conhecidas por células HeLa, muito utilizada em pesquisas médicas. As células HeLa foram cultivadas quando a senhora Lacks recebia tratamento a um cancro do colo do útero no Hospital Johns Hopkins. O seu cancro produzia normalmente metástases rápidas, mais que qualquer outro tipo de cancro conhecido pelos médicos. Após o óbito de Henrietta Lacks, as células continuaram a ser cultivadas para o estudo de sua longevidade, sendo distribuídas por vários laboratórios em todo o mundo. Jonas Salk utilizou as células para produzir uma vacina contra a poliomielite. Foram utilizadas em experiências sobre gravidade zero. Neste meio século, desde a sua morte, as suas células foram continuamente usadas em experiências e pesquisas contra o cancro, SIDA, efeitos da radiação, mapeamento genético e muito mais. Calcula-se que a quantidade de células existentes nos laboratórios de todo o mundo supere o número de células da senhora Lacks em vida. As células HeLa são chamadas de imortais por se dividirem num número ilimitado, desde que mantidas em condições ideais de laboratório. Atribui-se isso ao facto dessas células terem uma versão activa da enzima Telomerase, implicada no processo de morte das células e no número de vezes que uma célula pode ser dividida. Talvez algumas linhagens tenham sido contaminadas por outras células, mas todas provém da amostra retirada do tumor da senhora Lacks. Elas são cultivadas, até hoje, nos laboratórios a nível mundial, em frascos de plástico contendo soro bovino. Milhares de trabalhos científicos foram realizados com essas células. **(Landecker, Hannah; Brodwin, Paul E., 2000)**

1.3. Cultura de Células HeLa:

A cultura de células (**Figura 3**) é o método de células de ciências biológicas e de pesquisa clínica, bem como em muitas áreas da engenharia biotecnológica e biomédica. Normalmente, as células de mamíferos são cultivadas numa reserva de nutrientes em frascos de cultura de plástico ou em placas de vários poços, que são colocados numa incubadora de bancada. A incubadora mantém as condições fisiológicas necessárias para o crescimento de células, como esterilidade, temperatura ambiente e pH. O cultivo celular é confiável e é usado na maioria das experiências de cultura de células. No entanto, tem limitações quando os processos dinâmicos das células têm que ser investigados. As células podem ser retiradas da incubadora para uma breve observação e depois voltam para a incubadora até a próxima observação, mas isto não permite a monitorização em contínuo dos processos celulares. **(Sarunas Petronis, Michael Stangegaard, Claus Bo Vogge Christensen, and Martin Dufva, 2006)**

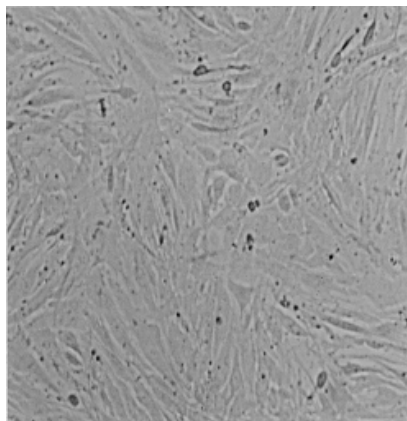


Figura 3. Cultura de Células HeLa

[Fonte:http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003489101998000200008&lng=pt&nrm=iso&userID=-2]

Distinguem-se três tipos principais de cultura celular: primárias, secundárias e de linhagens estabelecidas.

Um cultivo primário é obtido directamente dos tecidos vegetais ou animais. O tecido é separado em condições assépticas, seccionado em fragmentos pequenos e é obtida uma suspensão de células livres tratando-o com tripsina ou com quelantes de cálcio. A seguir, as células livres são submersas em cultivo apropriado. Diferentemente das bactérias, as células não são capazes de se reproduzir no meio líquido, porque necessitam de um suporte adequado, em geral o vidro ou plástico de uma placa de Petri, ocasionalmente coberto por material do tipo das matrizes extra celulares.

Um cultivo secundário é obtido pela tripsina de um cultivo primário noutra placa de Petri. Apesar da crença inicial de que as células normais seriam capazes de crescer e se dividir indefinidamente em cultivos, estas não sobrevivem por muitas gerações e, ao fim de vários subcultivos, tendem a deixar de se dividirem e morrem. Por exemplo, os fibroblastos embrionários humano possuem um número fixo de divisões mitóticas – aproximadamente 50 – depois das quais envelhecem e morrem. Se os fibroblastos forem provenientes de um adulto, o número de divisões possíveis é ainda menor.

Os cultivos de linhagens celulares estabelecidas são de uso corrente. Neles, as células foram adaptadas a um crescimento prolongado “*in vitro*”, geralmente por uma transformação do tipo tumoral. Entre as mais conhecidas, encontram-se as células HeLa, obtidas de um carcinoma cervical humano, os fibroblastos 3T3 do rato, os fibroblastos BHK do rim do *hamster* recém-nascido, os mioblastos L de rata ou as células CHO do ovário de rata. As linhagens celulares estabelecidas têm características distintas: crescem de forma mais acelerada, necessitam de menor concentração de soro sanguíneo e em geral são heteroplóides, ou seja, o número de cromossomos varia de uma célula para outra. Apesar destas anomalias, são muitos úteis como modelo para o estudo do cancro e de vários processos bioquímicos e estruturais.

1.3.1. Condições da Cultura de Células HeLa:

Para a observação contínua em tempo real das células, a incubadora tem de ser: **(Figura 4)** (i) ampliada para acomodar todos os instrumentos de observação, bem como o operador, (ii) modificado para incluir o instrumento de observação e de fornecer o instrumento de controlo para o operador no exterior, ou (iii) reduzido para caber dentro do instrumento, por exemplo, no palco de um microscópio. Além disso, para permitir ao operador respirar normalmente, a atmosfera não é enriquecida em CO₂, o que requer meios especiais de cultura celular e, portanto, limita o tipo de células que podem ser investigadas. Além disso, o operador trabalha com a incubadora e pode contaminar culturas de células. Juntando os instrumentos de investigação do microscópio, pela incubadora é menos onerosa e proporciona melhor esterilidade. No entanto, neste caso, a acessibilidade física ao instrumento é significativamente reduzida, por isso tem que ser equipado com controlo remoto e ferramentas de manipulação. Incubadoras de cultura de células miniaturizadas, não só permitem o crescimento e a observação em linha de células directamente sobre o microscópio óptico, mas também fornecem toda a lista de benefícios intrínsecos de microsistemas, incluindo o baixo consumo de energia e reagentes, bem como de resposta rápida devido a pequena massa e volume dos dispositivos. Além disso, este tipo de instalação proporciona oportunidades para funcionamento em paralelo para a análise de alto rendimento e integração de múltiplos sensores para a monitorização de parâmetros ambientais. Finalmente, os microsistemas podem ser concebidos como de uso único descartável, devido ao baixo custo, que são uma consequência de pequena quantidade de matéria-prima e do potencial de produção em massa, utilizando um lote de fabricação-tipo. **(Fiorini, G.S. and D.T. Chiu., 2005)** As oportunidades oferecidas pelas tecnologias de microfabricação e microfluídica na concepção de sistemas de cultura de células miniaturizadas e exploradas por pesquisadores. **(Park, T.H. and M.L. Shuler., 2003)** O desenvolvimento de cultura de pequenas células em câmara destinada ao estudo da célula relacionado com fenómenos biológicos. **(Prokop, A., Z. Prokop, D. Schaffer, E. Kozlov, J. Wikswo, D. Cliffler, and F. Baudenbacher., 2004, Wakamoto, Y., I. Inoue, H. Moriguchi, and K. Yasuda., 2001)**



Figura 4. O Microscópio Óptico, a Câmara de Fluxo Laminar e a Incubadora

[Fonte: www.icb.usp.br/~rgjaeger/images/Fluxo.jpg, www.reoterm.com.br/.../co2cell.jpg and bp0.blogger.com/.../s320/microscopio_m3.jpg]

1.4. A Mitocôndria:

1.4.1. Descrição Geral e Estrutura das Mitocôndrias:

A mitocôndria é um dos organelos celulares mais importantes, visto que a sua função é vital para a célula. É neste organelo que ocorre a respiração aeróbica, fornecendo substratos energéticos (como o ATP) para as diversas vias metabólicas intracelulares (Vilarinho et al., 2008), a sua participação na sinalização celular, particularmente no processo de morte celular por apoptose é também muito importante. (Simons et al., 1999) As mitocôndrias possuem duas membranas – uma externa e uma interna – que originam dois compartimentos, o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial. (Figura 5)

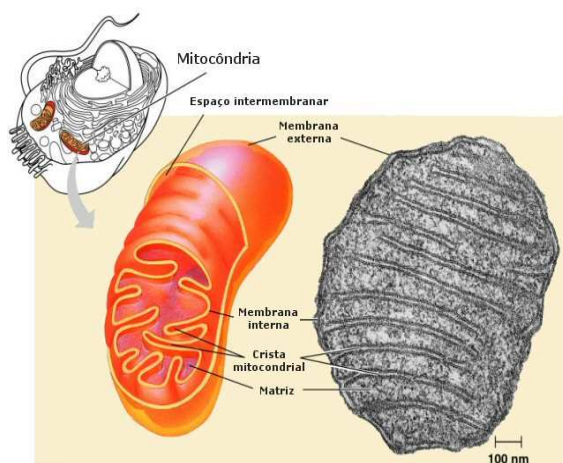


Figura 5. Mitocôndria.

[Fonte: http://calazans.ccems.pt/cn/images/Imagens_celula.htm]

A disfunção mitocondrial (Figura 6) está subjacente não só a vários mecanismos neurodegenerativos, tais como, os envolvidos nas doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer, como também às denominadas doenças mitocondriais. As mutações do ADN mitocondrial, quer sejam herdadas ou adquiridas, comprometem o funcionamento da cadeia respiratória. Por seu lado, estas alterações conduzem ao decréscimo da produção de ATP, à formação de radicais livres e a alterações da homeostase do Ca^{2+} celular. Estes eventos podem iniciar a peroxidação do ADN, de proteínas e de lípidos mitocondriais, bem como induzir a permeabilidade transitória mitocondrial (PTM), um processo envolvido na regulação da morte celular, quer por apoptose quer por necrose, na defesa da célula e nos mecanismos de regulação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} . Assim, muitos fármacos são especificamente desenhados para alterar as funções mitocondriais, enquanto outros têm como alvo primário diversas localizações celulares, podendo modificar secundariamente as funções mitocondriais. (Szewczyk & Wojtczak, 2002)

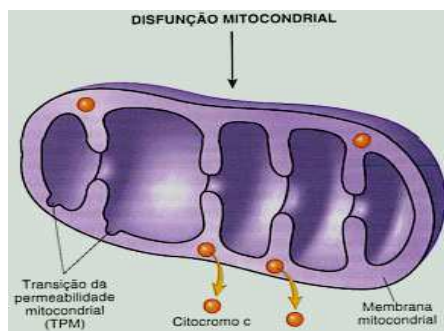


Figura 6. Descrição da Disfunção Mitocôndrial.

[Fonte: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=216&materiaver=1]

1.4.2. Funções das Mitocôndrias:

A função principal das mitocôndrias é gerar ATP, como foi anteriormente mencionado, na presença de O_2 , através da descarboxilação oxidativa, do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, a mitocôndria translada o ADP para formar ATP, a energia depositada nas ligações químicas dos alimentos. (De Robertis (Jr.), 2001) (Figura 7)

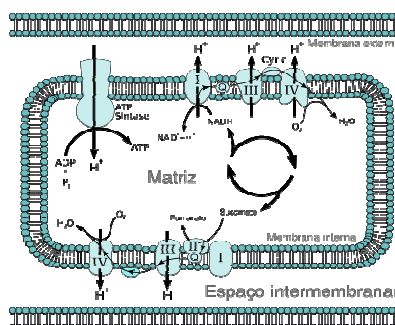


Figura 7. Representação Gráfica da Mitocôndria.

[Fonte: <http://otaodabiologia.wordpress.com/2008/10/31/ursos-nao-hibernam-ii-o-despertar/>]

A cadeia respiratória mitocondrial é composta por quatro complexos enzimáticos designados por NADH-UQ redutase (NADH-ubiquinona oxidoreductase ou NADH desidrogenase) (Complexo I), succinato-UQ redutase (Complexo II), ubiquinol-citocromo *c* redutase (ou ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductase) (Complexo III) e citocromo *c* oxidase (complexo IV). Os dinucleótidos de nicotinamida adenina (NADH) e de flavina adenina ($FADH_2$) fornecem, após oxidação, os elétrons para os Complexos I e II da cadeia respiratória, respectivamente. A ubiquinona (ou coenzima Q) (UQ) transfere os elétrons entre estes dois Complexos e o Complexo III e, por último, o O_2 aceita os elétrons do Complexo IV. As mitocôndrias produzem ATP através da associação entre o gradiente de prótons, gerado pela respiração, e a fosforilação oxidativa do ADP pela F_0F_1 ATPase (ATP sintase ou Complexo V). (Lee & Wei, 2000) (Figura 7)

1.4.3. Mitocôndria na Apoptose:

As mitocôndrias desempenham um papel regulador na iniciação da apoptose e/ou da necrose, tendo-se verificado que muitos compostos induzem estes tipos de morte celular através de vias que envolvem a mitocôndria, nomeadamente, através da indução da PTM. A morte celular programada ou apoptose é um processo comum nos organismos multicelulares que conduz à eliminação de células quando a sua função biológica natural terminou ou quando as células se encontram danificadas ou mutadas, a sua existência pode tornar-se perigosa para o organismo. (Kerr et al., 1972) Trata-se, assim, de um programa natural de morte celular activado para eliminar as células danificadas, mutadas ou envelhecidas. (Ravagnan et al., 2002) As mitocôndrias, para além da sua função na produção da energia para a célula, desempenham também um papel central na apoptose.

Genericamente, duas vias interdependentes podem conduzir à apoptose. (Hengartner, 2000; Kaufmann & Earshaw, 2000) Uma delas inicia-se pela ligação dos, designados, receptores de morte à superfície da célula, enquanto a outra envolve a mitocôndria. (Petit et al., 1997; Green & Reed, 1998; Susin et al., 1998; Kroemer, 1999; Desagher & Martinou, 2000) (Figura 8)

Este, na presença de ATP ou dATP, forma um complexo com o apaf-1 (*apoptosis activating factor 1*) e a pró-caspase 9. A formação deste complexo, designado por *apoptossoma*, cliva a pró-caspase 9 com libertação da caspase 9 activa que cliva e activa a pró-caspase 3. Por sua vez, a caspase 3 activa induz a clivagem proteolítica de uma série de proteínas e na membrana plasmática, responsáveis pela morfologia característica da apoptose. (Liu et al., 1996; Kluck et al., 1997; Li et al., 1997; Li & Yuan, 1999) Alguns inibidores, como os inibidores das proteínas apoptóticas (IAPs), NIAP e XIAP, impedem a activação da caspase 3 e, conseqüentemente, a apoptose. O *citocromo c* desencadeia, assim, no citossol uma cascata de eventos que conduzem à activação de proteases intracelulares da família das caspases (Earnshaw et al., 1999) e, eventualmente, a uma auto-digestão parcial da célula. (Bossy-Wetzel & Green, 1999) Adicionalmente, libertam-se precursores inactivos de caspases (Susin et al., 1999a; Samali et al., 1998) e a proteína de choque térmico de 10 Kda (Hsp 10), que favorece a activação do apoptossoma. (Samali et al., 1998) Por outro lado, libertam-se também o factor indutor da apoptose (AIF) (Susin et al., 1999b; Daugas et al., 2000) e a endonuclease G (Endo G) (Van Loo et al., 2001) que medeiam a clivagem do ADN durante a morte celular independente de caspases. A Smac/DIABLO (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) e a Omi/HtrA2 (Van Loo et al., 2002) encontram-se também no espaço intermembranar e ao serem libertadas para o citossol asseguram a inactivação dos inibidores das proteínas apoptóticas (IAPs). (Figura 8)

De acordo com alguns autores (Scarlett & Murphy, 1997; Vander Heiden et al., 1997; Petit et al., 1998), a libertação de *citocromo c* é precedida por um intumescimento mitocondrial que conduz à ruptura da membrana externa. Mais recentemente, tem sido indicado que o *citocromo c* é libertado da

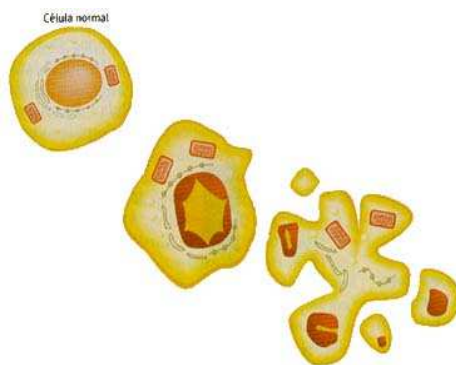


Figura 9. Apoptose

[Fonte: http://maisbiogeologia.blogspot.com/2008_11_01_archive.html]

1.5.2. Mecanismos Moleculares de Activação da Apoptose:

Contudo, actualmente sabe-se que o mitocôndrio e uma família de proteases, designadas por caspases, desempenham um papel extremamente importante neste processo de morte celular. Perante um estímulo apoptótico, a activação das caspases poderá ocorrer através de duas vias apoptóticas: a Via Intrínseca (ou Via Mitocondrial) e a Via Extrínseca (ou Via dos Receptores de Morte). (**Figura 10**)

A Via Apoptótica Extrínseca ou Via dos Receptores de Morte é activada após a ligação de um ligando, tal como o Fas, o TNF- α ou o TRAIL, a membros de uma superfamília de receptores TNF- α , os quais são designados por receptores de morte, e de entre os quais se destacam o receptor Fas, também designado por CD95, o receptor 1 TNF- α e os receptores TRAIL.

Estes receptores celulares são receptores transmembranares que contêm um domínio intracelular designado por domínio de morte (DD, do inglês, *death domain*). Uma das moléculas adaptadoras mais bem conhecida é a FADD, a qual possui um DD que pode interagir directamente com o DD do receptor de morte ou, indirectamente, através de uma outra molécula adaptadora designada por TRADD, a FADD possui ainda um outro domínio de interacção com proteínas, o domínio efector de morte (DED, do inglês *death-effector domain*).

Assim, o domínio DED da FADD interage com o domínio DED da pró-caspase-8, formando-se um complexo multiproteico intracelular designado por complexo de sinalização indutor de morte (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*). As células podem ser classificadas em tipo I ou tipo II, consoante a quantidade de caspase-8 que se forma ao nível do DISC. (**Scaffidi et al., 1998; Schmitz et al., 1999**) Nas células tipo I, esta quantidade é elevada, pelo que, a caspase-8 vai activar directamente as caspases executoras, nomeadamente a caspase-3.

Pelo contrário, nas células tipo II, a quantidade de caspase-8 formada ao nível do DISC é pequena, não sendo suficiente para activar directamente as caspases efectoras.

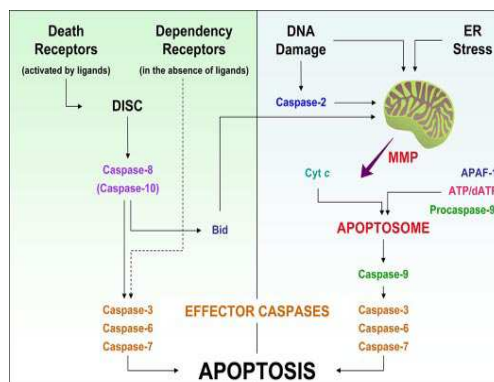


Figura 10. Cascatas de Ativação de Caspases Intrínsecas versus Extrínsecas.

Esquerda: Via Extrínseca. Direita: Via Intrínseca.

(Guido Kroemer, Lorenzo Galluzzi, and Catherine Brenner, 2007)

Deste modo, neste tipo de células, a caspase-8 cliva Bid, gerando a Bidt, a qual vai activar a via apoptótica mitocondrial e, conseqüentemente, a pró-caspase-3 (Figura 11), tal como referido atrás, constituindo esta via um sistema de amplificação do sinal de morte.

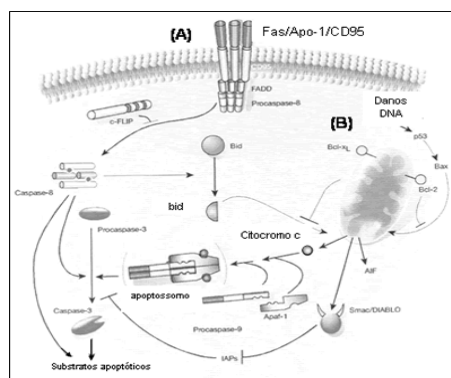


Figura 11. Via Apoptótica Extrínseca

[Fonte: <http://www.metrocamp.com.br/pesquisa/artigo.php?artigo=2>]

A Via Apoptótica Intrínseca ou Via Mitocondrial está actualmente bem estabelecida que o mitocôndrio, além de produzir a maior parte de energia metabólica necessária para que a célula possa desempenhar as suas funções, desempenha, também, um papel extremamente importante na integração de vias de sinalização celular, incluindo as envolvidas no mecanismo de morte celular apoptótico. Os factores apoptogénicos libertados a partir do espaço intermembranar mitocondrial para o citossol, após permeabilização da membrana externa mitocondrial, incluem o *citocromo c*, o segundo activador de caspases de origem mitocondrial/proteína de ligação directa ao IAP com baixo pI (SMAC/DIABLO, do inglês, *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*), a Omi/Htra2, o factor indutor da apoptose (AIF, do inglês *apoptosis-inducing factor*) e a endonuclease G (Endo G). (Figura 12)

Nas células normais, o *citocromo c* encontra-se presente no espaço intermembranar mitocondrial, fazendo parte da cadeia respiratória mitocondrial, onde é responsável pelo transporte de electrões do complexo III para o complexo IV.

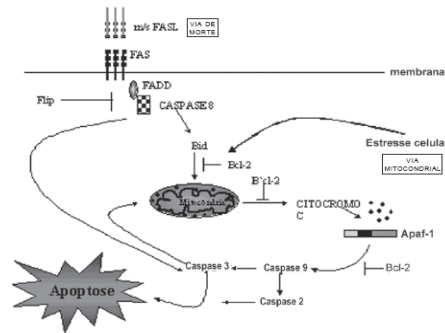


Figura 12. Via Apoptótica Intrínseca

[Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842005000200012]

Após um estímulo apoptótico, em que ocorre permeabilização da membrana externa mitocondrial, o *citocromo c* é libertado para o citosol, ligando-se ao Apaf-1 (do inglês, *apoptotic protease activating factor-1*). Esta ligação aumenta a afinidade do dATP e/ou ATP, o qual liga ao Apaf-1, induzindo modificações conformacionais na proteína que conduzem à sua oligomerização num heptâmero e à exposição do seu domínio CARD. A exposição deste domínio resulta no recrutamento da pró-caspase-9, a qual possui igualmente um domínio CARD, através do qual se liga ao Apaf-1, originando, desta forma, um complexo macromolecular designado por apoptossoma. (Figura 13) Consequentemente, a caspase-9 é activada indo, por sua vez, activar as caspases executoras do programa de morte celular, nomeadamente a caspase-3. As células contêm inibidores naturais das caspases, as quais são designadas por proteínas inibidoras da apoptose (IPAs, do inglês *inhibitors of apoptosis proteins*).

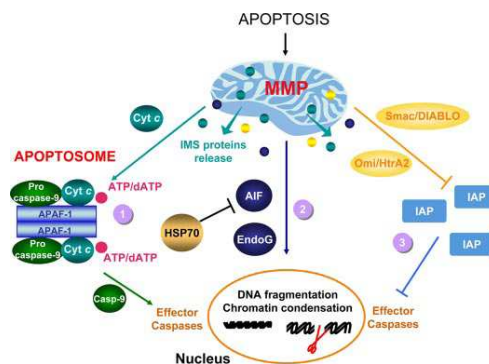


Figura 13. Libertação de proteínas IMS.

(Guido Kroemer, Lorenzo Galluzzi, and Catherine Brenner, 2007)

As caspases constituem uma família de proteases dependentes de cisteína, que clivam as proteínas a

seguir aos resíduos de aspartato. Estas proteases são sintetizadas como pró-enzimas que apresentam uma actividade intrínseca muito baixa, necessitando de ser activadas de forma exercer a sua actividade catalítica. Consoante a sua ordem de activação, as caspases podem ser classificadas em caspases iniciadoras (caspases -2, 8, 9 e 10) e caspases efectoras (caspases -3, 6 e 7). As caspases iniciadoras possuem um grande domínio N-terminal que contém motivos de interacção homotípicos, como o domínio de recrutamento de caspases (CARD, do inglês *caspase-recruitment domain*) ou o domínio efector de morte (DED, do inglês *death-effector domain*). Segundo este modelo, as caspases iniciadoras que se encontram sob a forma de monómeros, com uma actividade mínima (**Renatus et al., 2001**), são recrutadas para as chamadas plataformas de activação, onde atingem uma elevada concentração, iniciando-se, desta forma, um processo de dimerização que as torna activas. (**Boatright et al., 2003; Riedl e Salvesen, 2007**) O apoptossoma, constituído pelo Apaf-1 e pelo citocromo c, é responsável pela activação da pró-caspase-9. A caspase-8 e a caspase-10 são recrutadas e activadas numa outra plataforma de activação, designada por complexo de sinalização indutor de morte (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*).

As caspases efectoras, sintetizadas sob a forma de cadeia simples, sofrem clivagem do domínio N-terminal e dimerizam, existindo constitutivamente na célula, como um homodímero inactivo.

As caspases efectoras, uma vez activadas, são responsáveis pela clivagem proteolíticas de uma série de proteínas conduzindo a alterações morfológicas e bioquímicas das características das apoptoses.

(Figura 14)

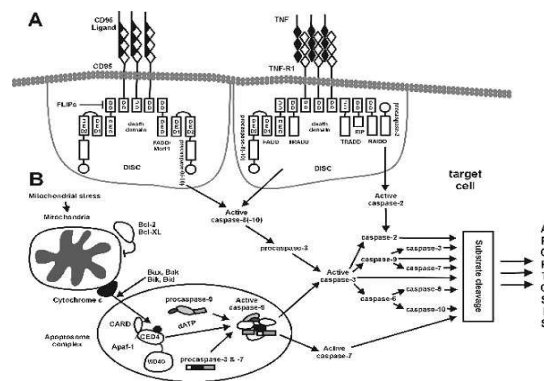


Figura 14. Caspases Iniciadoras e Caspases Efectoras

[Fonte: <http://www.uku.fi/neuro/56the.htm>]

1.5.3. Apoptose e as Doenças:

A apoptose é parte integrante em inúmeros processos vitais e alterações nos genes responsáveis pela autodestruição podem ser desastrosas, já que qualquer distúrbio na sua regulação pode causar uma variedade de doenças. Se o distúrbio conduzir à indução da morte celular programada surge uma apoptose excessiva ou aumentada, característica da SIDA, doenças neurodegenerativas (doença de

Alzheimer e doença de Parkinson) lesões isquémicas, hepatites virais, lesões hepáticas associadas ao álcool e induzidas por toxinas, entre outras. **(Andrew G. Renehan, Catherine Booth, Christopher S. Potten, 2001)**

Relativamente à doença de Alzheimer crê-se que ela esteja associada à apoptose excessiva, pois os neurónios morrem precocemente, o que resulta em demência progressiva e irreversível, por perda da cognição e da memória. **(Davis H. Cribbs, Wayne W. Poon, Robert A. Rissman and Mathew blurton-Jones (2004), Shimohama S. et al., 2000)**

Nas lesões isquémicas, tais como, enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral o bloqueio sanguíneo leva à necrose das células dependentes do vaso afectado, cujo conteúdo tóxico conduz a células vizinhas à apoptose. **(Andrew G. Renehan, Catherine Booth, Christopher S. Potten, 2001)**

A presença de corpos apoptóticos em espécimes de biopsia hepática de portadores de hepatites virais é achada comum e ilustra a participação da apoptose como mecanismo de morte celular nessas infecções. A via do sistema Fas da apoptose tem sido documentada como um dos mecanismos de citotoxicidade pelos quais os linfócitos T citotóxicos induzem à morte dos hepatócitos nas hepatites virais. Para assegurar o sucesso dessa função, visto que muitos vírus desenvolvem estratégias anti-apoptóticas, produzindo proteínas capazes de inactivar o p53 ou estimular maior expressão do Bcl-2, os linfócitos T citotóxicos dispõem de diferentes mecanismos capazes de levar à morte celular por apoptose, incluindo o sistema Fas. **(Kim H., Lee H., Yun Y., 1998)**

A apoptose é um mecanismo importante nas lesões celulares induzidas pelo álcool. Os hepatócitos de pacientes com lesão hepática pelo álcool apresentam expressão aumentada de Fas ligando, o que propicia que essas células possam induzir a morte de hepatócitos vizinhos pela expressão de receptores-Fas. **(Patel T. et al., 2000)**

Na SIDA, a indução da apoptose em células sãs contribui para a deficiência do sistema imunitário que caracteriza a doença. O vírus da SIDA (HIV) infecta basicamente os linfócitos T auxiliares, usando como porta de entrada a proteína de superfície CD4, reconhecida pela proteína vírica gp120. Os doentes com SIDA perdem grande parte dos linfócitos T CD4 por apoptose. **(Miura Y., Koyanagi Y., 2005)**

O cancro é uma doença que envolve tanto a proliferação excessiva de células como uma deficiência na morte programada. Quando uma mutação parece irreparável, a célula afectada suicida-se; caso contrário ela poderá viver bastante para acumular mutações, o que a torna capaz de se dividir descontroladamente. Em muitos tumores, os constituintes celulares desactivam o gene que codifica a proteína p53, que leva à activação da maquinaria apoptótica da célula quando o DNA é danificado. Em mais de metade de todos os tumores sólidos, incluindo o pulmonar, do cólon e da mama, houve perda da proteína p53. **(Wyllie A.H., Bellamy C.O., Bubb V.J., Clarke A.R., Corbert S., Curtis L., 1999)**

1.5.4. Potenciais Tratamentos:

A modulação dos processos apoptóticos é um importante método de tratamento de várias doenças. Existem muitas drogas (anti-inflamatórios não esteróides) que actuam alterando os níveis de apoptose, como por exemplo, as drogas citotóxicas e programas de radioterapia que induzem a apoptose em células tumorais. Contudo, estas terapias também induzem a apoptose noutras células normais, como as da medula óssea e das mucosas oral e intestinal, pelo que a dosagem tem de ser limitada. Estudos futuros permitirão descobrir novos métodos terapêuticos para doenças associadas à apoptose. (Wyllie A.H., Bellamy C.O., Bubb V.J., Clarke A.R., Corbert S., Curtis L., 1999)

1.6. AZT:

Este trabalho apresenta uma defesa antiviral. É o desenvolvimento e o uso de fármacos antivirais capazes de prevenir uma infecção ou de combatê-la, uma vez começada. Entretanto, apesar de quase 50 anos de pesquisa, o arsenal de fármacos antivirais permanece pequeno (Flint et. al., 2000) e apresenta graves restrições de uso, tais como reduzido espectro de actividade, utilidade terapêutica limitada e vários graus de toxicidade. (Simões et. al., 1999a)

A segurança é um dos parâmetros de grande importância no desenvolvimento de fármacos antivirais. Os testes de toxicidade celular fornecem as primeiras informações sobre a segurança dos compostos em teste. Muitas moléculas promissoras são descartadas logo de início, devido à sua citotoxicidade. Um composto antiviral deve ser mais tóxico para os vírus do que para as células. (Flint et. al., 2000) Com o intuito de contribuir com a pesquisa de novos agentes antivirais a partir de célula HeLa e devido à Apoptose e do seu metabólito majoritário, a mitocôndria, optou-se por este último como objecto desta dissertação, avaliando a citotoxicidade do AZT.

1.6.1. Estrutura dos Vírus:

Os vírus são pequenos agentes infecciosos, que consistem basicamente em ácido nucléico (RNA ou DNA) circundado por um Envoltório proteico ou Capsídio. (Figura 15) O revestimento mais o cerne de ácido nucléico constituem o denominado nucleocapsídeo. Além disso, alguns vírus possuem um envelope de lipoproteína, que pode conter lipoprotéínas virais antigénica, bem como fosfolipídios do hospedeiro adquiridos quando o nucleocapsídeo viral brota através da membrana nuclear ou da membrana plasmática da célula hospedeira. Alguns vírus também contêm enzimas que dão início à replicação na célula do hospedeiro. Toda a partícula infecciosa é denominada Vírião. Em diferentes tipos de vírus, o genoma pode consistir em filamento duplo ou simples. (Challand & Young, 1997)

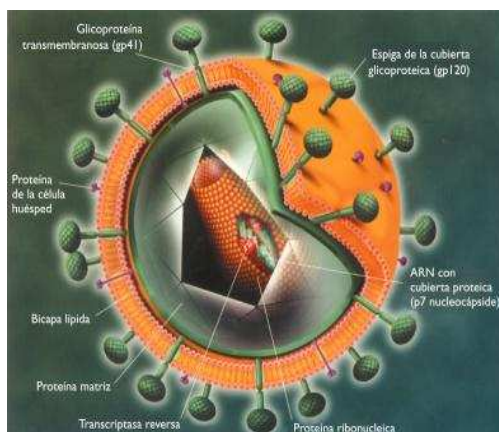


Figura 15. Diagrama esquemático dos componentes de uma partícula viral ou vírion

[Fonte: http://quimicosclnicosxalapa04.spaces.live.com/?_c11_BlogPart_pagedir=Next&_c11_BlogPart_handle=cns!204AC1C68E772D5!1537&_c11_BlogPart_BlogPart=blogview&_c=BlogPart]

1.6.2. Função Viral e Histórica do Ciclo Biológico:

Os vírus são parasitas intracelulares que não possuem mecanismo metabólico próprio. Para a sua replicação, devem fixar-se a uma célula viva do hospedeiro – animal, vegetal ou bacteriana -, nela penetrar e utilizar os seus processos metabólicos. Os sítios de ligação do vírus consistem em polipeptídios do envelope ou capsídeo. Os receptores na célula hospedeira, aos quais o vírus se fixa, consistem em componentes normais da membrana – receptores de citocinas, neurotransmissores ou hormônios, canais iónicos, glicoproteínas integrantes da membrana, etc. A **Tabela 1** fornece alguns exemplos de receptores das células do hospedeiro utilizados por determinados vírus. No caso de muitos vírus, o complexo receptor-vírus penetra na célula através de endocitose mediada por receptores. Durante esse processo, o envoltório do vírus pode ser removido. (Alguns vírus escapam dessa via). Uma vez no interior da célula hospedeira, o ácido nucléico do vírus utiliza então o mecanismo da célula para sintetizar ácido nucléico e proteínas e produzir novas partículas virais. A replicação do vírus exige a síntese de DNA ou RNA, a síntese de proteínas virais e glicosilação. (Rang H. P., MB BSMA D Phil FMedSci FRS, M. M. Dale MB Bch PhD, J. M. Ritter MA D Phil FRCP FMed Sci and P. K. Moore BSC PhD., 2004)

Tabela 1. Algumas estruturas das células do hospedeiro que podem actuar como receptores para vírus	
Estrutura para célula do hospedeiro	Vírus
Glicoproteína CD4 nos linfócitos T auxiliares	HIV (Vírus da SIDA)

<i>O receptor CCR5 das quimiocinas MCP-1 e RANTES</i>	HIV (Vírus da SIDA)
<i>Receptor de quimiocina CXCR4 para citocina SDF-1</i>	HIV (Vírus da SIDA)
<i>Receptor de acetilcolina no Músculo esquelético</i>	Vírus da Raiva
<i>Receptor do complemento C3d de linfócitos B</i>	Vírus da Febre Glandular
<i>Receptor de interleucina-2 nos linfócitos T</i>	Vírus da Leucemia de Células T
<i>Receptor beta-adrenérgicos</i>	Vírus da Diarreia Infantil
<i>Moléculas MHC</i>	Adenovírus que causam Faringite; conjuntivite; Vírus da Leucemia de Células T
<p>HIV, Vírus da Imunodeficiência Humana; AIDS, Síndrome de Imunodeficiência Adquirida; MCP-1, Proteína Químioatraente de Monócitos 1 (monocyte chemoattractant protein-1); RANTES, Regulado por Activação, Expresso e Secretado por Células T Normais (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted); SDF-1, factor derivado de células do estroma-1 (stromal cell-derived factor-1); MHC, complexo principal de histocompatibilidade</p> <p>Observação: Para maiores detalhes sobre o complemento, a interleucina-2, a glicoproteína CD4 nos linfócitos T auxiliares, as moléculas de MHC, etc.</p>	

O Vírião dos retrovírus contém uma transcriptase reversa (DNA-polimerase RNA-dependente viral), que efectua uma cópia de DNA a partir do RNA viral. Esta cópia de DNA é integrada ao genoma da célula hospedeira, sendo então denominada *pró-vírus*. O DNA pró-viral é transcrito em novo RNA genómico e mRNA para tradução em proteínas virais. Os vírus completos são libertados muitos podem replicar-se sem destruir as células do hospedeiro. Alguns retrovírus de RNA podem transformar células normais em células malignas. O HIV é um retrovírus de RNA.

A infecção pelo HIV, na verdade, existe dois vírus associados à SIDA – o HIV-1 e o HIV-2, leva ao desenvolvimento da SIDA. O HIV-1 é responsável pela maioria das infecções por HIV no mundo inteiro, enquanto o HIV-2 ocorre em partes da África e da Índia. Em 2001, foi estimado que cerca de 20 milhões de pessoas faleceram de SIDA, com 30 milhões HIV-positivos e 16.000 novos casos de infecção diariamente. A epidemia concentra-se de forma avassaladora na África Subsaariana, onde até 35% da população adulta são infectados pelo HIV. (Figura 16)



Figura 16. Números mundiais de adultos e crianças infectadas com o HIV

[Fonte: http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2002/imuno02_HIV.htm]

Para uma revisão da patogenia da SIDA, a interação do HIV com o sistema imunológico do hospedeiro é complexa. O vírus utiliza proteínas de superfície das células do sistema imune para penetrar nelas. As células do sistema imune possuem o equivalente de “emblemas específicos” que as identificam. A proteína de superfície CCR5, que é um emblema específico nos macrófagos e nas células dendríticas, constitui o receptor natural das β -quimiocinas, MCP-1 e RANTES.

No interior da célula, o HIV integra-se no DNA do hospedeiro (a forma pró-viral) sofre transcrição e produz novos vírions quando a célula é activada. (Figura 17)

No indivíduo não-tratado, podem ser produzidas cerca de 10^{10} novas partículas virais a cada dia. Grande parte do HIV intracelular pode permanecer silencioso por um longo período de tempo antes de ser estimulado a entrar em actividade, quando esse clone de células T particular entra em contacto com seu parceiro antigénico e começa a proliferar.

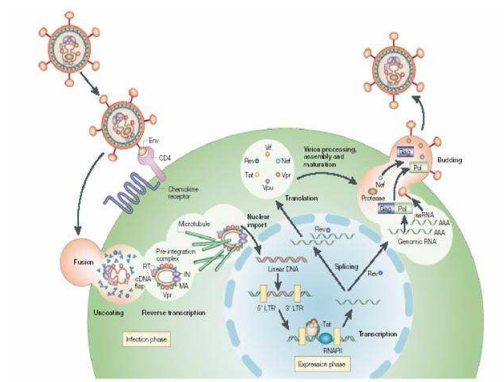


Figura 17. Diagrama esquemático da infecção da célula T CD4⁺ por um vírion HIV, com os locais de acção das duas principais classes de fármacos e locais de possíveis fármacos novos.

[Fonte: http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2002/imuno02_HIV.htm]

São produzidos anticorpos contra diversos componentes do HIV, porém é a acção dos CTL (as células T auxiliares CD4⁺ são importantes no desenvolvimento das células T CD8⁺, que impede

inicialmente a disseminação dos vírus, principalmente ao destruir as células infectadas por HIV, mas também ao libertar factores anti-HIV). (Grant A. D., de Kock K. M., 2001)

Ocorre perda progressiva de células T auxiliares CD4 (Figura 17), o que constitui a característica que define a infecção por HIV. A razão dessa perda ainda não foi esclarecida; pode resultar de destruição pelos CTL, de lesão directa induzida pelo vírus, etc.

Existe uma considerável variação na evolução da doença, porém a evolução clínica habitual na infecção por HIV não tratada é apresentada na Figura 18. Em geral, ocorre uma doença aguda inicial semelhante à gripe, associada a um aumento no número de partículas virais no sangue, ampla disseminação pelos tecidos e invasão do tecido linfóide pelas partículas de Vírión. Dentro de poucas semanas, a Viremia é reduzida pela acção dos CTL, conforme descrita anteriormente.

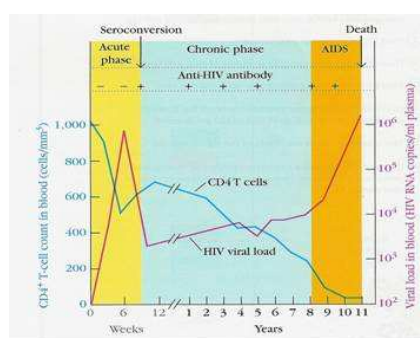


Figura 18. Resumo Esquemático da Evolução da Infecção por HIV.

[Fonte: http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2002/imuno02_HIV.htm]

A doença aguda é seguida de um período assintomático, durante o qual ocorre redução da Viremia, acompanhada de replicação silenciosa do vírus nos linfonodos, associada à lesão da arquitectura dos linfonodos e perda dos linfócitos CD4 e das células dentríticas. A latência clínica (duração mediana de 10 anos) acaba quando a resposta imune finalmente falha, e aparecem os sinais e os sintomas da SIDA – infecções oportunistas (por exemplo, por *Pneumocystis carinii* ou pelo bacilo da tuberculose), doença neurológica (por exemplo, confusão, paralisia, demência), depressão da medula óssea e cânceres. As infecções gastrointestinais crónicas contribuem para a acentuada perda de peso. Além disso, podem ocorrer lesão cardiovascular e lesão renal. No paciente não-tratado, a morte geralmente sobrevém em 2 anos. O advento de complexos esquemas de combinação de fármacos mudou o prognóstico nos países onde podem ser empregados. (Rang H. P., MB BSMA D Phil FMedSci FRS, M. M. Dale MB Bch PhD, J. M. Ritter MA D Phil FRCP FMed Sci and P. K. Moore BSc PhD., 2004)

1.6.3. Fármacos Antivirais:

Como os vírus partilham muitos dos processos metabólicos da célula hospedeira, é difícil encontrar

fármacos que sejam selectivos para o patógeno. Todavia, existem algumas enzimas que são específicas do vírus e que podem constituir alvos potenciais para fármacos. Os agentes antivirais actualmente disponíveis são, em sua maioria, apenas eficazes durante a replicação do vírus. Inicialmente, trataremos dos agentes anti-HIV e, a seguir, consideraremos outros agentes antivirais. (Rang H. P., MB BSMA D Phil FMedSci FRS, M. M. Dale MB Bch PhD, J. M. Ritter MA D Phil FRCP FMed Sci and P. K. Moore BSC PhD., 2004)

1.6.4. Fármacos Anti-HIV:

Existem duas classes principais de fármacos anti-HIV: os inibidores da transcriptase reversa e os inibidores da protease. Cada classe apresenta um mecanismo de acção diferente (**Figura 15**), e são utilizadas combinações na terapia do HIV/SIDA. Os inibidores da transcriptase reversa são subdivididos em inibidores nucleosídios da transcriptase reversa e inibidores não-nucleosídios da transcriptase reversa. A terapia de combinação é conhecida como terapia antiretroviral altamente activa (HAART, *highly active antiretroviral therapy*). Uma combinação de HAART típica envolve dois inibidores nucleosídios da transcriptase reversa, com um inibidor não-nucleosídeo da transcriptase reversa ou um ou dois inibidores da protease.

Com o uso do esquema HAART, a replicação do HIV é inibida, com redução da presença do RNA do HIV no plasma para níveis indetectáveis e prolongamento da sobrevivência do paciente. Todavia, o esquema é complexo e apresenta muitos efeitos adversos; além disso, a adesão no paciente a esse tratamento é difícil, e sua administração pode ser permanente, visto que o HIV (**Figura 19**) não é erradicado. No momento actual, não existe nenhuma resistência cruzada nos três grupos de fármacos; entretanto, é preciso ter em mente que o vírus apresenta uma elevada taxa de mutação – de modo que a resistência poderá representar um problema no futuro. (O HIV certamente ainda não se deu por vencido). (H. P. Rang MB BSMA D Phil FMedSci FRS, M. M. Dale MB Bch PhD, J. M. Ritter MA D Phil FRCP FMed Sci and P. K. Moore BSC PhD., 2004)

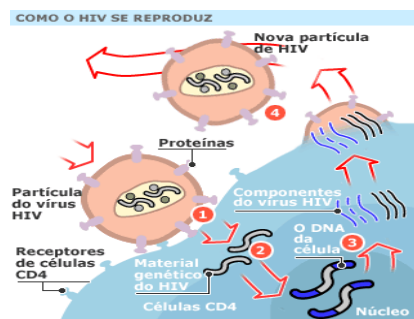


Figura 19: HIV (Vírus da Imunodeficiência Vírus)

[Fonte: http://www.bbc.co.uk/portuguese/especial/images/1357_biologia_aids/5162124_06_anti_hiv_drugs.]

1.6.5. Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa:

1.6.5.1. Zidovudina:

A Zidovudina (**Figura 20**) é um análogo da timidina. Pode prolongar a vida dos indivíduos infectados por HIV e na demência moderada associada ao HIV. Quando administrada à parturiente e, a seguir, ao recém-nascido, pode reduzir a transmissão da mãe para o recém-nascido em mais de 20%.

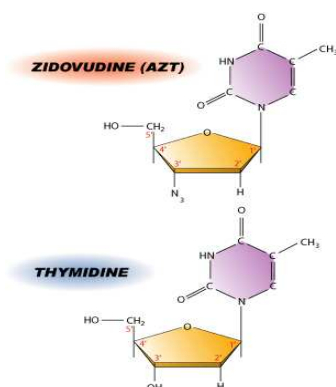


Figura 20: AZT (Zidovudina)

[Fonte: <http://www.scq.ubc.ca/viral-infection/>]

É administrada por via oral, duas vezes ao dia, mas também pode ser administrada por infusão intravenosa. A biodisponibilidade é de 60%-80%, e a concentração plasmática máxima é alcançada em 30 minutos. A meia-vida é de uma hora, enquanto a meia-vida intracelular do trifosfato activo é de três horas. A concentração no líquido cefalorraquidiano (LCR) atinge 65% dos níveis plasmáticos. A maior parte do fármaco é metabolizada a glicuronídeo inactivo no fígado, e apenas 20% da forma activa são excretados na urina.

Os efeitos indesejáveis normalmente são comuns a ocorrência de anemia e neutropenia, particularmente com administração a longo prazo. Outros efeitos indesejáveis consistem em distúrbios gastrintestinais, parestesias, exantema, insónia, febre, cefaleia, anormalidades da função hepática e, mais particularmente miopatia. Foi também relatada a ocorrência de confusão, ansiedade, depressão e síndrome de tipo gripal. O uso profilático do fármaco a curto prazo em indivíduos em boa condição física, após exposição específica ao vírus, está associado a efeitos indesejáveis reversíveis e insignificantes. A resistência à acção antiviral da zidovudina, em virtude de sua rápida mutação, o vírus constitui um alvo em constante mudança, de modo que, a resposta terapêutica diminui com uso prolongado, sobretudo na doença de estágio avançada. Outros factores responsáveis pela perda de eficácia do fármaco consistem em menor activação da zidovudina na forma trifosfato e aumento da carga viral decorrente de uma redução dos mecanismos imunológicos.

1.6.6. Efeitos Citotóxicos – AZT na Apoptose:

Os efeitos do AZT na viabilidade e morfologia celular têm sido descritos em linhas primárias e permanentes de adenocarcinoma de colo do útero e, em menor extensão, em linhas permanentes de outros tipos celulares. Vários estudos indicam que o AZT induz a diminuição da viabilidade celular de uma forma dependente da dose e do tempo de exposição à toxina.

Em adição, o AZT também provoca alterações morfológicas. Ocorrem modificações na forma celular e redução do seu volume, perdendo-se a sua morfologia característica. Efeitos sobre a membrana celular, citosqueleto e núcleo têm sido amplamente descritos.

Os efeitos do AZT ao nível nuclear reflectem-se essencialmente na condensação da cromatina, logo, observa-se a condensação da cromatina, a redução do volume nuclear de adenocarcinoma de colo do útero. E a fragmentação do núcleo quando utilizadas exposições prolongadas ao AZT.

As alterações morfológicas descritas anteriormente ao nível da membrana celular, citosqueleto e núcleo têm sido atribuídas ao processo de morte celular programada por apoptose. **(Fladmark et al., 1998)** Com doses do AZT mais elevadas e /ou tempos de exposição mais prolongados, alguns estudos reportam para uma morte celular por necrose. O modo pelo qual o AZT provoca a morte celular por apoptose ou necrose tem sido uma área que tem chamado a atenção de vários grupos de investigação. As mitocôndrias desempenham um papel crítico na apoptose mediada pelo AZT. **(Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., 1972)**

É um facto que as mitocôndrias são um organelo crucial no desenvolvimento da apoptose celular, apesar disso, observaram-se alterações morfológicas das mitocôndrias de linhas celulares permanentes expostas ao AZT. O AZT tem capacidade de causar uma rápida formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a libertação de cálcio e *citocromo c* mitocondrial para o citosol, perdendo-se o potencial de membrana mitocondrial e conseqüente morte celular por apoptose. A formação de ROS, a libertação de cálcio e *citocromo c* mitocondrial parecem ter um papel crítico na apoptose mediada pelo AZT. **(Gerner C., Gotzmann J., Frohwein U., Schamberger C., Ellinger A., Sauer mann G., 2002)**

Simultaneamente, o AZT encontra-se envolvido na promoção tumoral, caracterizada pela proliferação celular. No caso do AZT, a promoção tumoral ocorrerá a doses que não provocam nenhum sinal de citotoxicidade. Em oposição, a apoptose desenvolver-se-á em resposta a doses de AZT mais elevadas, com efeito citotóxico visível. **(Toivola & Eriksson, 1999)** Por outro lado, o stress oxidativo, através da produção de ROS, torna-se uma importante conseqüência da exposição ao AZT se dá a doses mais elevadas, é desencadeado um processo de morte, em detrimento da proliferação celular e conseqüente promoção tumoral, apresentando-se o AZT como uma toxina que provoca uma resposta dualista. **(Tamura T., Sadakat N., Oda T., Muramatsu T., 2002)**

Capítulo 2

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais:

2.1.1. Meio de Cultura e reagentes:

Meio de Cultura: O meio de cultura (MCI) (Sigma) foi utilizado para permitir o crescimento e a manutenção das células, complementado com bicarbonato de sódio. A proporção de meio/bicarbonato de sódio é previamente estabelecida para que o pH do meio permaneça entre 7,2 e 7,4. Estas condições requerem o uso de uma estufa de CO₂ (atmosfera: 5% CO₂ e 95% de O₂), uma vez que os frascos de cultura celular não são totalmente herméticos. A regulação da concentração de CO₂ na estufa é de extrema importância quando o tampão utilizado é o sistema Bicarbonato. O CO₂ influencia também a proliferação celular através de sua participação na biossíntese das bases púricas e pirimídicas. A atmosfera dentro da estufa deve estar saturada com vapores de água a fim de prevenir a evaporação e a alteração da osmolaridade do meio.

Soro Fetal Bovino (SFB): Foi adicionado ao meio MCI para permitir que as células em cultura não apenas sobrevivam, mas também se reproduzam. Sabe-se que a divisão celular só é possível na presença de um certo número de fatores mitógenos, que são fornecidos pelo soro fetal. Ao MCI foi acrescentado 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL) para o crescimento e manutenção das células.

Antibióticos e antifúngico: Foram adicionados ao meio para evitar a contaminação das culturas por bactérias, fungos e leveduras, na proporção de 1ml de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Gibco BRL: 10.000U penicilina, 10.000 mg estreptomicina, 25 mg anfotericina B) para cada 100ml de meio.

Tripsina: A tripsina é uma enzima que faz parte do grupo das proteases, que catalisam reações de quebra da cadeia polipeptídica em determinadas sequências de aminoácidos. A tripsina rompe a cadeia peptídica quando os aminoácidos da extremidade aminoterminal são L-lisina ou L-leucina. Esta enzima não requer a presença de co-fatores e é muito utilizada em culturas celulares, que necessitam de um suporte para se fixarem e proliferarem. (Ela age, então, sobre as proteínas que permitem a fixação das células no suporte, liberando-as). A tripsina deve ter a sua acção proteolítica inibida, após o descolamento das células, para evitar a citólise. Nas experiências foram utilizadas tripsina (Sigma) preparada numa solução de EDTA a 0,05%.

Técnica: Célula Hela foi cultivada em placas de 12 poços com lamelas ($0,75 \times 10^6$ células/Well) até confluência (24 h). Então, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 mL das diferentes concentrações do AZT, ($100 \mu\text{M} - 800 \mu\text{M}$), dissolvidas em meio MCI sem SFB.

2.2. Métodos:

2.2.1. Cultura de Células:

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem de células HeLa, derivada de adenocarcinoma de colo do útero humano, obtida a partir da American Type Culture Collection (Manassas, VA). A linha celular foi mantida em câmara de cultura a 37°C com 5 % CO_2 , em frascos de cultura com meio DMEM suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio e 10% de FBS. O meio foi filtrado e, antes de cada utilização, aquecido a 37°C . (Olivero et al., 1994)

2.2.2. Indução de Apoptose:

As Células HeLa foram incubadas com meio como controlo positivo, completado com $500 \mu\text{M}$ DCA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A.).

2.2.3. Ensaio do Lactato Desidrogenase (LDH):

O teste do LDH (lactato desidrogenase) permite a detecção de danos ao nível da membrana celular. Baseia-se na redução de NAD a NADH pela LDH (enzima citosólica, libertada para o meio extracelular quando a integridade membranar é afectada). Posteriormente, o NADH é usado na conversão de um substrato num produto corado, analisado por espectrofotometria UV/visível. Após 24 h de exposição à AZT, As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 min. para sedimentar as células. As células foram tratadas com 50 litros / poço de reacção da mistura LDH. A reacção da mistura LDH foi preparada pela mistura com substrato WST LDH - tampão de ensaio. Após 30min de incubação à temperatura ambiente, as actividades da LDH foram quantificados por ELISA reader em OD 450nm e interpretados os múltiplos pontos temporais até que sejam obtidos resultados consistentes.

2.2.4. Avaliação Morfológica da Apoptose nas Células em Cultura:

Na sequência de incubação com Hoesht, os núcleos apoptóticos foram visualizados por microscopia de fluorescência. Após as incubações e exposição ao AZT, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS, sendo depois incubadas com 15 µg / ml Hoechst 33342 (usado para identificar a fragmentação nuclear) a 37 °C. As células foram em seguida, visualizados com microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Axiomot 2) e avaliada a presença de núcleos fragmentados.

2.2.5. Exposição de células HeLa ao AZT:

As células HeLa foram usadas como para avaliação dos efeitos do AZT através de ensaios de citotoxicidade (Mildronato (Mild), LDH, DCA) e técnicas de microscopia de fluorescência.

Para os ensaios de citotoxicidade, as células HeLa em crescimento exponencial foram tripsinadas e ressuspensas em meio DMEM, contadas num hemacitómetro pelo método do azul de triptano (Merck, Darmstadt, Alemanha) (Sandstrom, 1965) e semeadas em microplacas de 96 poços (Sarstedt, Newton, EUA). As microplacas foram mantidas na câmara de culturas, durante 24 horas para permitir a adesão e crescimento celular. (Rao et al., 2007) Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com o AZT (100 µM, 400 M e 800 µM), durante 24 horas.

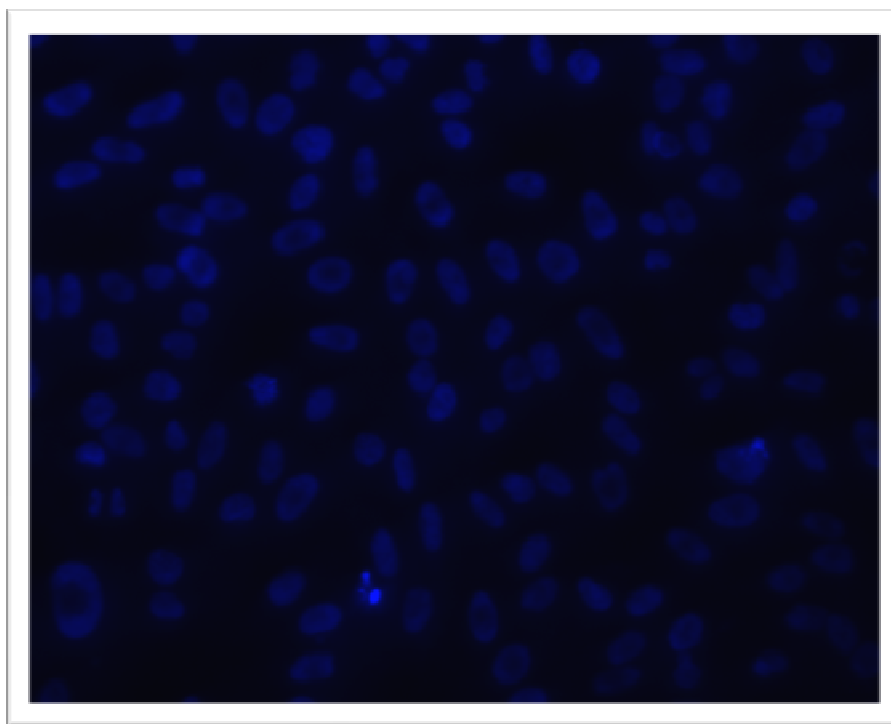
Capítulo 3

3. Resultados

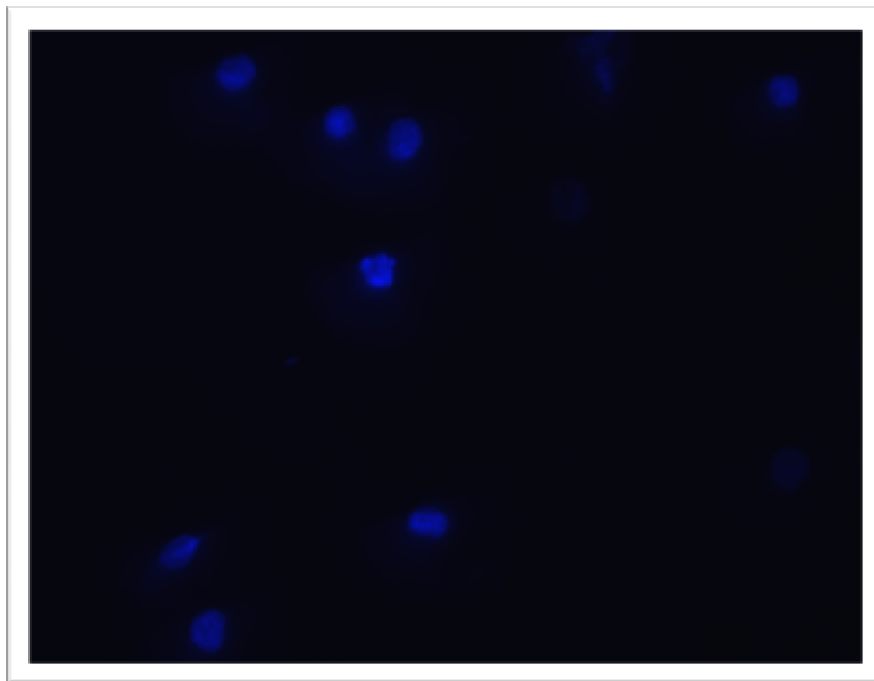
3. Resultados:

Os resultados do teste de citotoxicidade com AZT (o DCA foi usado como controlo positivo) foram obtidos por microscopia de fluorescência. Permite avaliar a fragmentação de DNA, a morfologia nuclear típica de apoptose. Assim, observou-se a correspondência entre células apoptóticas e núcleos de morfologia alterada ou fragmentados, com cromatina mais condensada.

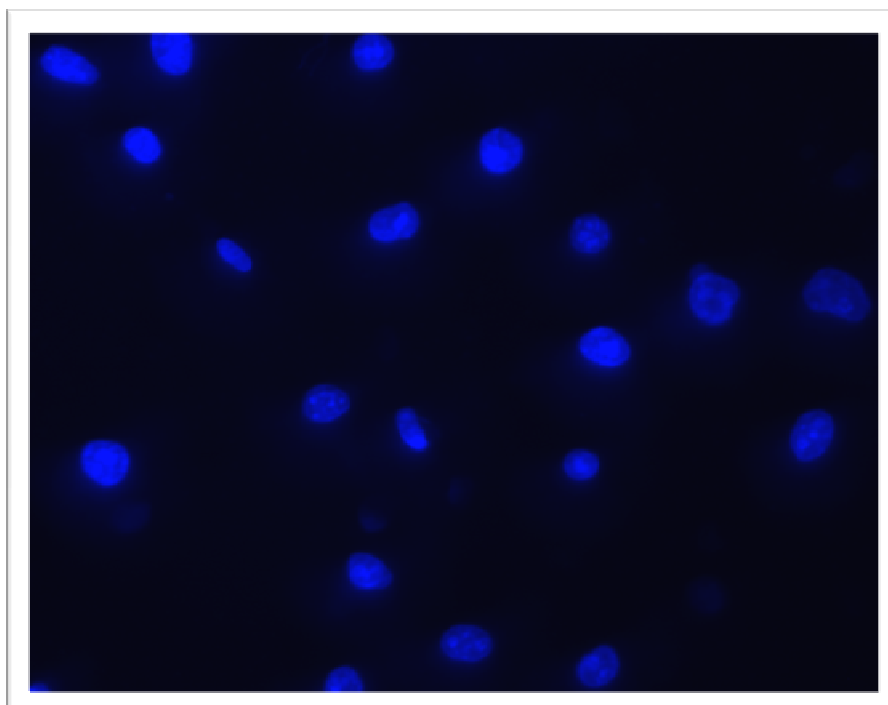
A morfologia das células controlo manteve-se inalterada, durante 24 horas de incubação e a confluência celular aumenta (**Figura 21 – A**). A análise das células com DCA 500 μM , 24 horas, permite observar alguns núcleos com morfologia alterada e a confluência celular diminui bastante (**Figura 21 – B**). O efeito do AZT na morfologia celular começou a ser visível às 24 horas com 800 μM (**Figura 21 - C**), as células perderam a sua forma poliédrica típica, tornando-se mais arredondadas e a confluência celular diminuiu. Finalmente, o efeito do AZT de 800 μM com o Mildronato de 100 μM por 24 horas, mostra que o midronato não previne completamente o efeito do AZT com 800 μM (**Figura 21 – D**).



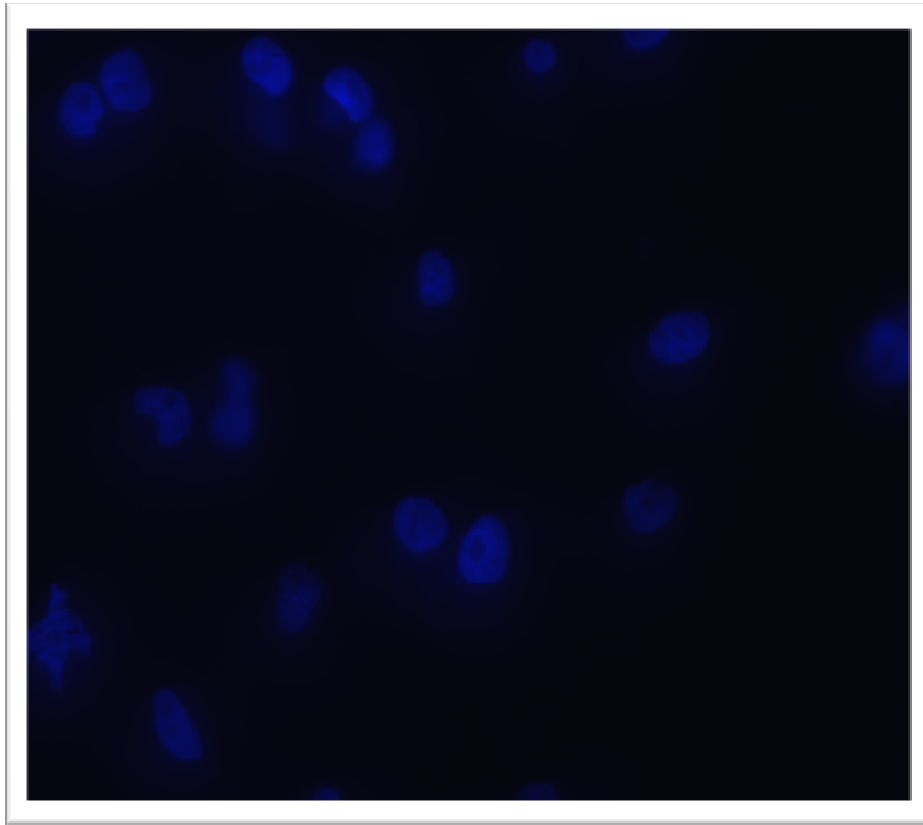
A) Controlo – 24 horas



B) DCA – 500 μ M (24 horas)



C) AZT – 800 μ M (24 horas)



D) AZT (800 μ M) + Mildronato (100 μ M) – 24 horas

Figura 21 – **A)** Resultados de análise de Microscópio de Fluorescência, ou seja, o Teste de Hoecsht em Controlo sem AZT e nem Mildronato, durante 24 horas. **B)** Morfologia de células HeLa expostas a 500 μ M de DCA por 24 horas. **C)** Morfologia de células HeLa expostas a 800 μ M do AZT por 24 horas. **D)** Morfologia de células HeLa expostas a 800 μ M do AZT com 100 μ M de Mildronato por 24 horas.

Na Figura 22 estão apresentados os resultados obtidos pelo teste do LDH libertada para a avaliação do efeito do AZT na viabilidade das células HeLa. Com 24 horas de tratamento, a percentagem da Libertação de LDH aumentou de 1,0 % para 1,3 %; 2,7 %; 3,4 %; 6,6 %, respectivamente para as concentrações de 100 μ M, 400 μ M, 800 μ M de AZT e 500 μ M de DCA (**Figura 22**) relativamente ao controlo. Adicionalmente, o teste estatístico mostrou que as diferenças encontradas nas condições estudadas são significativas, excepto para o controlo positivo (DCA) ($p < 0,05$; Teste One-Way ANOVA Kruskal Wallis, com pós-teste Dunns).

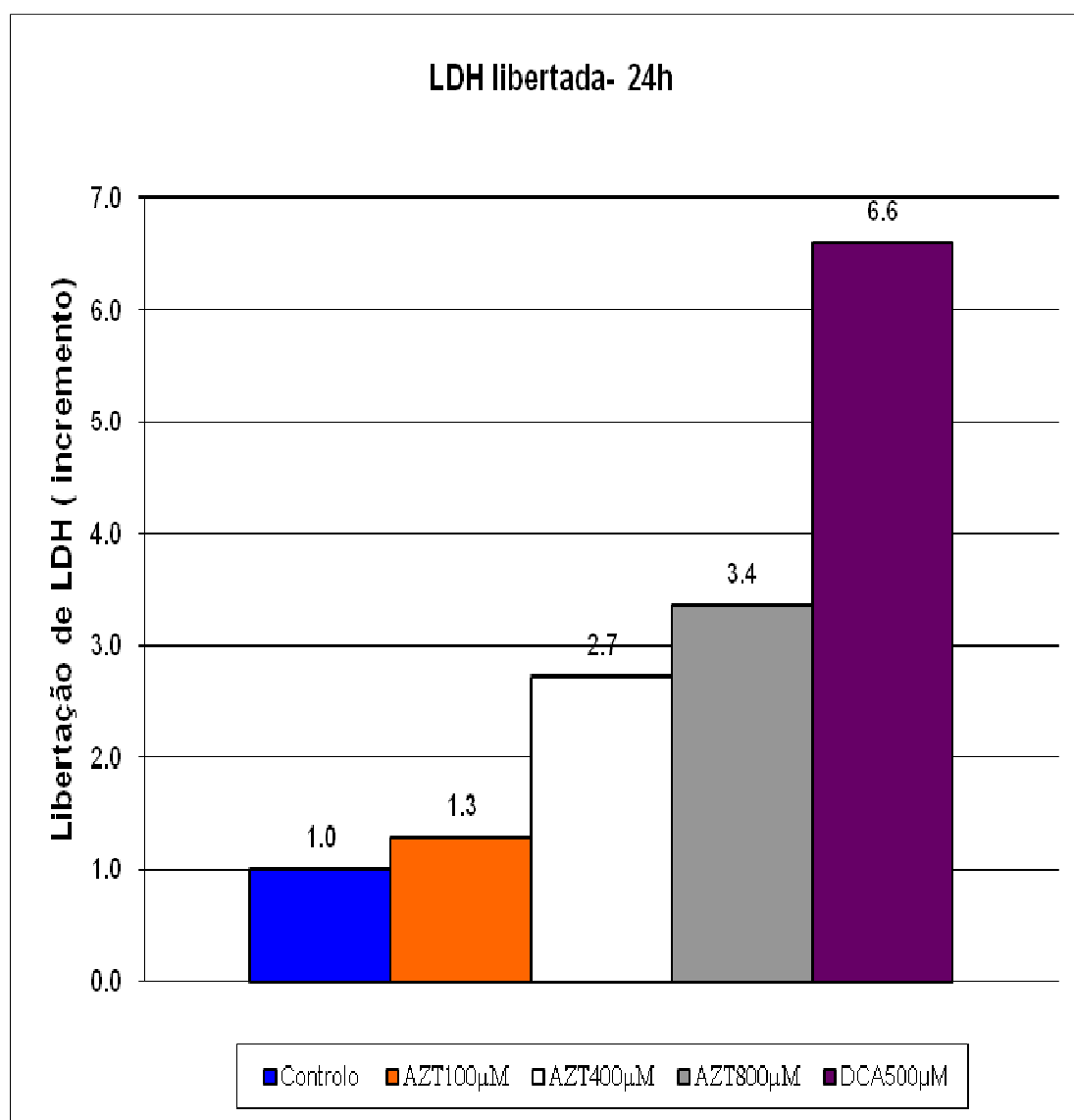


Figura 22: Resultados de Libertação de LDH em função da concentração de AZT: Teste One-Way ANOVA Kruskal Wallis, com pós-teste Dunns. As diferenças são consideradas significativas quando $p < 0,05$. O DCA foi usado como controlo positivo.

Capítulo 4

4. Discussão e Conclusões

4. Discussão e conclusões:

O AZT (Zidovunina) é um análogo da timidina. Pode prolongar a vida dos indivíduos infectados por HIV e na demência moderada associada ao HIV. Neste trabalho pretendeu-se testar o efeito do AZT ao nível morfologia celular de uma linha celular de adenocarcinoma de colo do útero humano (Células HeLa), contribuindo para a elucidação dos mecanismos de acção tóxica do AZT neste modelo celular.

Os resultados deste trabalho permitem também realçar a importância do método escolhido para avaliar a citotoxicidade do AZT. O facto da resposta citotóxica ser detectada a diferentes concentrações consoante o método, reforça o interesse de aplicar vários métodos simultaneamente. Sugerem que a libertação de LDH é precedida por outros efeitos relacionados com a apoptose. **(Ding & Ong, 2000)**

Pelo teste do LDH, o AZT revelou algumas alterações significativas na viabilidade celular, a partir das 24 horas com a dose de 800 μ M. No entanto, a tendência é para que ocorra maior de libertação de LDH quando se aumenta a concentração do AZT. São necessários mais estudos, fazendo outros testes de viabilidade, e aumentar o número da amostragem para se poderem tirar conclusões mais detalhadas.

A apoptose é um mecanismo autónomo de morte celular programada, caracterizado morfologicamente pela condensação da cromatina nuclear, redução do tamanho celular, condensação do citoplasma, perda de ligações intercelulares e destacamento das células da superfície de crescimento, formação de projecções membranares e de corpos apoptóticos. **(Desagher & Martinou, 2000; Darnell et al., 2001)**

A incubação das células HeLa com AZT originou efeitos nas mitocôndrias em ambos os tempos de exposição, embora a concentrações de toxina mais elevadas em células expostas ao AZT durante 24 horas. Vários estudos têm reportado efeitos do AZT ao nível mitocondrial, e ligados estes efeitos à apoptose mediada pelo AZT. **(Ding & Ong, 2000)** Estes efeitos passam pela perda do potencial de membrana da mitocôndria, conseqüente libertação de Ca^{2+} e *citocromo c*, conduzindo à morte celular programada. Os resultados colocam em evidência que apesar dos benefícios terapêuticos do AZT, existem efeitos tóxicos associados que podem levar à morte das células e à disfunção tecidual. Estudos mais detalhados sobre a função mitocondrial permitirão elucidar o seu envolvimento neste processo.

Muito ainda falta pesquisar para um melhor esclarecimento das vias sinalizadoras envolvidas na apoptose, cujos participantes são proteínas codificadas por genes específicos envolvidos no processo de morte celular programada.

Conclui-se que a linha celular HeLa é susceptível à acção citotóxica do AZT, reflectida por diminuições da viabilidade celular, sendo observada uma resposta dependente da concentração e

tempo de exposição ao fármaco e o mildronato não protegem completamente estas células dos efeitos do AZT.

As células HeLa necessitam de concentrações e tempos de exposição ao AZT mais elevados para desenvolver as mesmas respostas que linhas celulares primárias. Deste modo, as células HeLa surgem como uma linha permanente mais resistente à ação tóxica do AZT, podendo servir como modelo para estudos toxicológicos.

O efeito tóxico do AZT reflecte-se em alterações ao nível da membrana plasmática, no núcleo e nas mitocôndrias, podendo estar envolvidos em processos de sinalização de autofagia e de apoptose induzida pelo AZT.

Capítulo 5

5. Bibliografia

5. Bibliografia:

- ✚ **Andrew G., Renehan, Catherine Booth, Christopher S. Potten (2001).** What is apoptosis, and why is it important?. *BMJ*; 322:1536 – 1538.
- ✚ **Boatright K. M., Renatus M., Scott F. L., Sperandio S., Shin H., Pedersen I. M., Ricci J. E., Edris W. A., Sutherlin D. P., Green D. R. and Salvesen G. S. (2003).** A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell.* 11 (2): 529 – 41.
- ✚ **Bossy-Wetzel E. & Green D. R. (1999).** Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier, *Mutat. Res.* 434, 243 – 251.
- ✚ **Challand R., Young R. J. (1997).** Antiviral Chemotherapy. Biochemical and Medicinal Chemistry Series. Spectrum, USA. Series Editor John Mann. Spektrum Academic Publishers, Oxford, and University Science Books, Sausalito. ISBN 1-901217-03-5.
- ✚ **Crompton M., et al. (1999).** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *Biochem. J.* 341, 233 – 249.
- ✚ **Darnell JE, Baltimore D, Matsudaira P, Zipursky SL, Berk A, Lodish (2001).** *Molecular Cell Biology.* Freeman and Company, fourth edition, USA.
- ✚ **Dasegher S. & Martinou J. C. (2000).** Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell. Biol.* 10, 369 – 377.
- ✚ **Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler m., Susin S. A., Zamzami N. & Kroemer G. (2000).** Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis, *FEBS Lett.* 476, 118- 123.
- ✚ **Davis H., Cribbs, Wayne W. Poon, Robert A. Rissman and Mathew Blurton-Jones (2004);** Caspases-Mediated Degeneration in Alzheimer’s Disease; from the Institute for Brain Aging Dementia, University of California Irvine, Irvine, California. *Am J Pathol.* August; 165(2): 353–355.

- ✚ **De Robertis (Jr.) – HIB – PONZIO (2001)**. *Biologia Molecular e Celular*. Librerias Yenne, Patagones 2463, Buenos Aires (c1282ACA), Argentina. t(54.11) 4943.8300 f. (54.11) 4308.4199.
- ✚ **Desagher S, Martinou J-C (2000)**. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 10: 369 – 377.
- ✚ **Ding W-X, Shen H-M, Ong C-N (2000)**. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*, 32(3): 547 – 555.
- ✚ **Doran E. & Halestrap A. P. (2000)**. Cytochrome c release from isolated rat liver mitochondria can occur independently of outer-membrane rupture: possible role of contact sites, *Biochem. J.* 348, 343 – 350.
- ✚ **Du C., Fang M., Li Y., Li L. & Wang X., (2000)**. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition, *Cell*. 102, 33 – 42.
- ✚ **Earnshaw W. C., Martins L. M. & Kaufmann S. H. (1999)**. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and function during apoptosis, *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383 – 424.
- ✚ **Ferreira, Mariana; Aguiar, Tatiana; Vilarinho, Laura (2008)**. Laboratório de Investigação, Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães, INSA. Cadeia Respiratória Mitocondrial, Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Défice do Complexo I. ISSN 0871-3413 • ©ArquiMed.
- ✚ **Fiorini, G.S. and D.T. Chiu. (2005)**. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *BioTechniques* 38:429-446.
- ✚ **Fladmark KE, Serres MH, Larsen NL, Yasumoto T, Aune T, Deskeland SO (1998)**. Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon*, 36(8): 1101 – 1114.

- ✚ **Flint, S. J.; Enquist, L. W.; Krug, R. M.; Racaniello, V. R.; Skalka A. M. (2000).** Principles of virology: molecular, biology, pathogenesis and control. Washington: ASM, p. 662-714.

- ✚ **Gerner C., Gotzmann J., Frohwein U., Schamberger C., Ellinger A., Sauermann G. (2002).** Proteome analysis of nuclear matrix proteins during apoptotic chromatin condensation. *Cell. Death Differ.*; 9: 671 – 81.

- ✚ **Grant, Alison D. and Kevin M. De Kock (2001).** HIV Infection and AIDS in the developing world. *BMJ*. June 16; 322 (7300): 1475 – 1478.

- ✚ **Green D. R. & Reed J. C. (1998).** Mitochondria and apoptosis, *Science* 281, 1309 – 1312.

- ✚ **Hengartner M. O., et al. (2000).** The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407, 770 – 776.

- ✚ **Jurgensmeier J. M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D. & Reed J. C. (1998).** Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4997 – 5002.

- ✚ **Kaufmann S. H. & Earnshaw W. C. (2000).** Induction of apoptosis by cancer chemotherapy, *Exp. Cell. Res.* 256, 42 – 49.

- ✚ **Kerr J. F., Wyllie A. H. & Currie A. R. (1972).** Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26, 239 – 257.

- ✚ **Kim H., Lee H., Yun Y. (1998).** X-Gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J. Biol. Chem.*; 273: 381 – 5.

- ✚ **Kluck R. M., Bossy-Wetzel E., Green D. R. & Newmeyer D. D. (1997).** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science* 275, 1132 – 1136.

- ✚ **Kroemer G., et al. (1999).** Mitochondrial control of apoptosis: an overview, *Biochem. Soc. Symp.* 66, 1-15.

- ✚ **Landecker, Hannah and Brodwin, Paul E. (2000).** Immortality, In Vitro. A History of the HeLa Cell Line., ed.: Biotechnology and Culture. Bodies, Anxieties, Ethics. Bloomington/Indianapolis, 53-72, ISBN 0-253-21428-9.

- ✚ **Lee H-C. & Wei Y-H. (2000).** Mitochondrial role in life and death of the cell. J. Biomed. Sci. 7, 2-15.

- ✚ **Li H. L. & Yuan j. Y. (1999).** Deciphering the pathways of life and death, Curr. Opin. Cell. Biol. 11, 261 – 266.

- ✚ **Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S. & Wang X. (1997).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, Cell. 91, 479 – 489.

- ✚ **Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemmerson R. & Wang X. (1996).** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c, Cell. 86, 147 – 157.

- ✚ **Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jurgensmeier J. M., Susin S. A., Vieira H. L. A., Prevost M. C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J. C. & Kroemer G. (1998b).** Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis, Science 281, 2027 – 2031.

- ✚ **Miura Y., Koyanagi Y. (2005).** Death ligand – mediated apoptosis in HIV infection. Rev. Med. Virol. Março 11; 15(3): 169 – 178.

- ✚ **Olivero O. A.; Beland F. A.; Fullerton N. F.; Poirier N. C. (1994).** Vaginal epithelial DNA damage and expression of preneoplastic markers in mice during chronic dosing with tumorigenic levels of 3' – azido – 2', 3' – dideoxythymidine. Cancer Res. Dec. 1; 54(23): 6235 - 42.

- ✚ **Park, T.H. and M.L. Shuler. (2003).** Integration of cell culture and microfabrication technology. Biotechnol. Prog. 19:243-253.

- ✚ **Patel T., et al. (2000).** Apoptosis in pathophysiology. Clin. Liver Dis.; 4: 295 – 317.

- ✚ **Petit P. X., Gourben M., Diolez P., Susin A. S., Zamzami N. & Kroemer G. (1998).** Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition, *FEBS Lett.* 426, 111 – 116.

- ✚ **Petit P. X., Zamzami N., Vayssiere J. L., Mignotte B., Kroemer G. & Castedo M. (1997).** Implication of mitochondria in apoptosis, *Mol.Cell. Biochem.* 174, 185 – 188.

- ✚ **Prokop, A., Z. Prokop, D. Schaffer, E. Kozlov, J. Wikswo, D. Cliffl, and F. Baudenbacher (2004).** NanoLiterBioReactor: long-term mammalian cell culture at nanofabricated scale. *Biomed. Microdevices* 6:325-339.

- ✚ **Rang H. P., M. B. BSMA, D. Phil F. MedSCI FRS, M. M. Dale M. B. Bch PhD, J. M. Ritter M. A. D. Phil FRCP F. MedSci and P. K. Moore BSC PhD (2004).** *Farmacologia Tradução da 5ª Edição Americana.* Elsevier Editora Lda., ISBN 85 – 352 – 1368 – 6.

- ✚ **Rao J., et al. (2007).** Neurochemistry of Parkinson's disease. *Handb. Clin. Neurol.*; 83: 153 – 204.

- ✚ **Ravagnan L., Roumier T. & Kroemer G. (2002).** Mitochondria, the killer organelles and their weapons, *J. Cell. Physiol.* 192, 131 – 137.

- ✚ **Renatus M., Stennicke h. R., Scott F. L., Liddington R. C. and Salvesen G. S. (2001).** Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (25): 14250 – 5.

- ✚ **Riedl S. J. and Salvesen G. S. (2007).** The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8 (5): 405 – 13.

- ✚ **Samali A., Zhivotovsky B., Jones D. P. & Orrenius S. (1998).** Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues, *FEBS Lett.* 431, 167 – 169.

- ✚ **Sarunas Petronis, Michael Stangegaard, Claus Bo Voge Christensen, and Martin Dufva (2006).** Transparent polymeric cell culture chip with integrated temperature control and uniform media perfusion. *Biotechniques* 40:368-376 (March 2006).

- ✚ **Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K. J., Debatin K. M., Krammer P. H. and Peter M. E. (1998).** Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *Embo. J.* 17 (6): 1675 – 87.

- ✚ **Scarlett J.L. & Murphy M.P. (1997).** Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition, *FEBS Lett.* 418, 282 – 286.

- ✚ **Schmitz I., Walczak H., Krammer P. H. and Peter M. E. (1999).** Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell. Death Differ* 6 (9): 821 – 2.

- ✚ **Shimohama S., et al. (2000);** Apoptosis in Alzheimer's disease – an update; Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan Feb; 5(1): 9-16.

- ✚ **Simões, C. M. O.; Amoros, M.; Girre, L. (1999a).** Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 317-325.

- ✚ **Simons KT, Ruczinski I, Kooperberg C, Fox BA, Bystroff C, Baker D. (1999).** Improved Recognition of Native-Like Protein Structures Using a Combination of Sequence-Dependent and Sequence-Independent Features of Proteins. Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle 98195, USA. *Proteins.* 1999 Jan 1; 34(1):82-95.

- ✚ **Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M. C., Alzari P. M. & Kroemer G. (1999a).** Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptosis process, *J. Exp. Med* 189, 381 – 394.

- ✚ **Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion j., Jacotot E., Constantini P., Loffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M. & Kroemer G. (1999b).** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* 397, 441 – 446.

- ✚ **Susin S. A., Zamzami N. & Kroemer G. (1998).** Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more, *Biochem. Biophys Acta* 1366, 151 – 165.

- ✚ **Szewczyk A. & Wojtczak L. (2002).** Mitochondria as a pharmacological target, *Pharmacol. Ver.* 54, 101-127.

- ✚ **Tamura T., Sadakat N., Oda T., Muramatsu T. (2002).** Role of zinc ions in ricin induced apoptosis in U937cells. *Toxicol Lett.* 2002 Jun 14; 132(2): 141-51.

- ✚ **Toivola DM, Eriksson JE (1999).** Toxins affecting cell signaling and alteration of cytoskeletal structure. *Toxicology in Vitro*, 13: 521 – 530.

- ✚ **Van Loo G., Schotte P., Van gorp M., Demol H., Hoorelbeke B., Gevaert K., Rodriguez I., Ruiz-Carrillo A., Vandekerckhove J., Declercq W., Beyaert R. & Vandenabeele P. (2001).** Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation, *Cell Death Differ.* Dec; 8(12): 1136-42.

- ✚ **Van Loo G., Van gorp M., Depuydt B., Srinivasula S. M., Rodriguez I., Alnemri E. S., Gevaert K., Vandekerckhove J., Declercq W. & Vandenabeele P. (2002).** The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity, *Cell. Death Differ* 9, 20 – 26.

- ✚ **Vander Heiden M. G., Chandel N. S., Williamson E. K., Schumacker P. T. & Thompson C. B. (1997).** Bcl-xl regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria, *Cell.* 91, 627 – 637.

- ✚ **Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakush M., Silke j., Connoly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J. & Vaux D. L. (2000).** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins, *Cell.* 102, 43 – 53.

- ✚ **Wakamoto, Y., I. Inoue, H. Moriguchi, and K. Yasuda. (2001).** Analysis of single-cell differences by use of an on-chip microculture system and optical trapping. *Fresenius J. Anal. Chem.* 371:276-281.

- ✚ **Wyllie A. H., Bellamy C. O., Bubb V. J., Clarke A. R., Corbert S., Curtis L. (1999).** Apoptosis and Carcinogenesis. *Br. J. Cancer*; 80: 34 – 37.