

Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular

Maristella Conte Anazetti¹
Patrícia Silva Melo²

Resumo

O termo "apoptose" descreve um processo ativo de colapso celular que difere morfológicamente da morte por necrose. É um tipo de morte celular que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e, de renovação celular e tecidual. A morte celular por apoptose é um fenômeno complexo caracterizado por condensação cromatínica, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos, sendo que a morte e proliferação celular estão intimamente conectadas. Alguns reguladores do ciclo celular podem influenciar tanto a divisão quanto a morte celular programada. A correlação entre ciclo celular e apoptose está comprovada devido às funções de c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, ciclinas e CK1. A fosforilação e desfosforilação de proteínas controlada por proteínas quinases e proteínas fosfatases constitui um dos principais mecanismos que regulam uma variedade de processos celulares incluindo a morte celular. Várias proteases participam dos processos de indução da morte celular, as mais conhecidas são as caspases. Caspases são proteases aspartato específicas contendo cisteína, as quais estão presentes entre as membranas mitocondriais e na matriz nuclear na forma de zimogênios. O interesse na elucidação da morte celular por apoptose é devido a susceptibilidade das células tumorais, incluindo as linhagens leucêmicas, em serem induzidas a este tipo de morte por compostos antitumorais. Esta revisão sumariza as diferentes funções de proteínas e enzimas que participam no controle do ciclo celular e da apoptose.

Palavras-chave: Apoptose. Morte Celular. Estresse oxidativo.

¹ Doutora em Biologia Funcional e Molecular e Professora da METROCAMP. Contato: pmelo@unicamp.br

² Mestre em Biologia Funcional e Molecular. Docente na METROCAMP. Contato: anazetti@unicamp.br

Apoptosis Cell Death: biochemistry and molecular aspects

Abstract

The term "apoptosis" describes an active process of cellular deconstruction originally contrasted morphologically with necrosis. It is a form of cell death that occurs during several physiological and pathological situations in multicellular organisms and constitutes a common mechanism of cell replacement, tissue remodelling, and removal of damaged cells. Apoptosis is a complex process characterized by cell shrinkage, chromatin condensation, internucleosomal DNA fragmentation, and formation of "apoptotic bodies" since proliferation and apoptosis are intimately linked. Some cell cycle regulators can influence both cell division and programmed cell death. The linkage of cell cycle and apoptosis has been recognized for c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, cyclins and CK1. The reversible phosphorylation of proteins controlled by protein kinases and protein phosphatases is a major mechanism that regulates a wide variety of cellular process including cell death. Several protease families are also implicated in apoptosis, the most prominent being caspasis. Caspasis are cysteine-containing, aspartic acid-specific proteases which exist as zymogen in the soluble cytoplasm, mitochondrial intermembrane space, and nuclear matrix of virtually all cells. Apoptosis is subject of intense research due to the susceptibility of tumor cells, including leukemia and lymphoma cell lines that have been found to undergo this kind of cell death in response to anti-tumoral agents. This review summarizes the different functions of the proteins and enzymes presently known to control both apoptosis and cell cycle progression.

Key words: Apoptosis. Cellular death. Oxidative stress.

Introdução

Apoptose é um fenômeno de morte celular programada, reconhecida morfológicamente como um fenômeno distinto de morte há mais de 30 anos por Kerr, Wyllie e Durrie (1972), que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células. A morte celular por apoptose participa de várias situações fisiológicas tais como o colapso endometrial durante a menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese. Assim, é um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação

célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfologicamente por condensação e fragmentação cromatínica e formação de protuberâncias na superfície celular (ISRAELS; ISRAELS, 1999).

Este processo de morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas, incluindo o câncer. Após o reconhecimento do processo apoptótico como um mecanismo celular fundamental, a biologia da apoptose continuou a ser investigada avaliando-se as alterações morfológicas e bioquímicas características (WYLLIE, 1985), a natureza das vias intracelulares (HALE et al., 1996), a complexa biologia molecular de genes e elementos efetores (BAKER; REDDY, 1996; FRASER; EVAN, 1996), a sua relação no desenvolvimento embrionário (BRILL et al., 1999), o seu papel na homeostase celular e o seu envolvimento na patogênese de várias doenças (THOMPSON, 1995), tais como doenças auto imunes, infecções parasitárias, doenças neurodegenerativas, lesões isquêmicas e o câncer (MARTIN; GREEN, 1995; GREEN; MARTIN, 1995; LEE; BERNSTEIN, 1995; RAFFRAY; COHEN, 1997; JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002; MAKIN, 2002; REED, 2003). Com o surgimento de novos conhecimentos na biologia do câncer e, conseqüentemente, na indução química da apoptose, os tratamentos tornam-se mais eficazes, pois terapias utilizando drogas anti-tumorais convencionais são pouco seletivas e efetivas (HICKMAN, 1996).

Alterações Morfológicas e Bioquímicas

O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e certos processos patológicos *in vivo* inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; MCCONKEY, 1998; MELO et al., 2000), despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolípidos de membrana plasmática (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças ambientais (MARIA, 1998; KERR, 1995; KERR, 2002).

Por outro lado, a morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas (Figura 1), ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002).

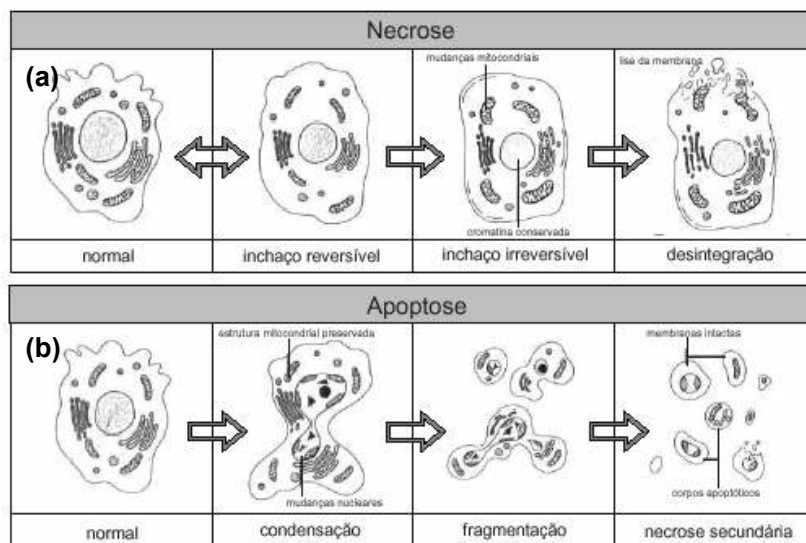


Figura 1. Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose *versus* necrose. A necrose **(a)** é caracterizada pela perda de integridade de membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas. O processo apoptótico **(b)** envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.

A Figura 1 também demonstra que no processo de morte celular por necrose ocorrem alterações da função mitocondrial, diminuindo drasticamente a produção de ATP interferindo na função da bomba Na^+/K^+ , levando a tumefação celular devido ao aumento de Na^+ citosólico. O aumento do Ca^{2+} citosólico provoca ativação de fosfolipases e de proteases, que juntamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem ruptura da membrana plasmática, ativação de proteases com conseqüente indução do extravasamento do conteúdo celular, sinalizando a migração de macrófagos ativando uma resposta inflamatória do sistema imune. Ao contrário da retração celular observada em células apoptóticas, na necrose observa-se um intumescimento celular

devido às lesões no citoesqueleto e inibição da bomba de Na^+/K^+ , ocasionando a perda da permeabilidade seletiva da membrana (MCCONKEY, 1998).

Em contraste, o processo apoptótico envolve a participação ativa das células afetadas na cascata de autodestruição que culmina em degradação do DNA via ativação de endonucleases, desintegração nuclear e formação de "corpos apoptóticos" (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; WYLLIE, 1985; ARENDS; MORRIS; WYLLIE, 1990). Estes corpos apoptóticos são rapidamente retirados do tecido por macrófagos, esta sinalização ocorre devido a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana "marcando" as células que deverão ser fagocitadas (WYLLIE, 1985; COMPTON, 1992).

A maioria das alterações morfológicas observadas por Kerr, Wyllie e Durrie (1972), é causada por uma série de cisteíno proteases, chamadas caspases, que são ativadas especificamente em células em apoptose (COHEN, 1997; MINKO; KOPECKOVÁ; KOPECEK, 2001). Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em sequências específicas. A especificidade pelos seus respectivos substratos é determinada por quatro resíduos amino-terminal no sítio de clivagem (JACOBSON; EVAN, 1994; STENNICKE; SALVESEN, 1998; THORBERRY; LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 2000). A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose, como desmontagem da membrana nuclear e do arcabouço de lâminas, hipercondensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas. Estas alterações são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação destas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer (THORBERRY; LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 2000).

Sinalização da Morte Celular por Apoptose

Evidências atuais sugerem que há várias rotas distintas para a ativação de caspases, dependendo do estímulo que desencadeia a maquinaria de morte (Figura 2) (SLEE; ADRAIN; MARTIN, 1999; SLEE et al., 1999; HENGARTNER, 2000), sendo que, em geral, duas vias distintas podem estar ativas. A apoptose iniciada via receptores de morte (Figura 2 **(A)**) tais como Fas, também chamado de CD95 ou Apo-1 e TNF-R1 (receptor fator de necrose tumoral), requerem pró-caspase-8 ou -10 no complexo.

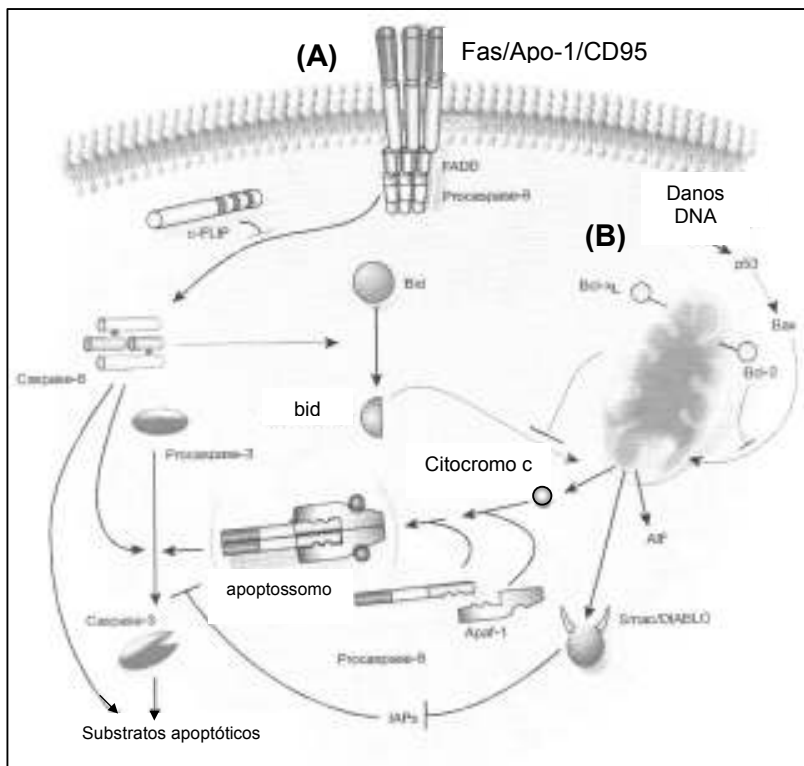


Figura 2. A via receptor **(A)** é desencadeada por membros da super-família de receptores de morte celular (tal como CD95/Fas/Apo-1). Ligantes específicos sinalizam agregação e formação de um complexo indutor de morte, que recruta pró-caspases através de proteínas de domínio de morte associada ao receptor. A via mitocondrial **(B)** é frequentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros pró- e anti-apoptótico da família Bcl-2 regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Este associa-se com Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, formando apoptossomo. Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose.

Porém, estímulos apoptóticos induzidos por agentes quimioterapêuticos em várias linhagens de leucemia parecem ser independentes desta via (Figura 3) (EISCHEN et al., 1997; DEBATIN, 2000).

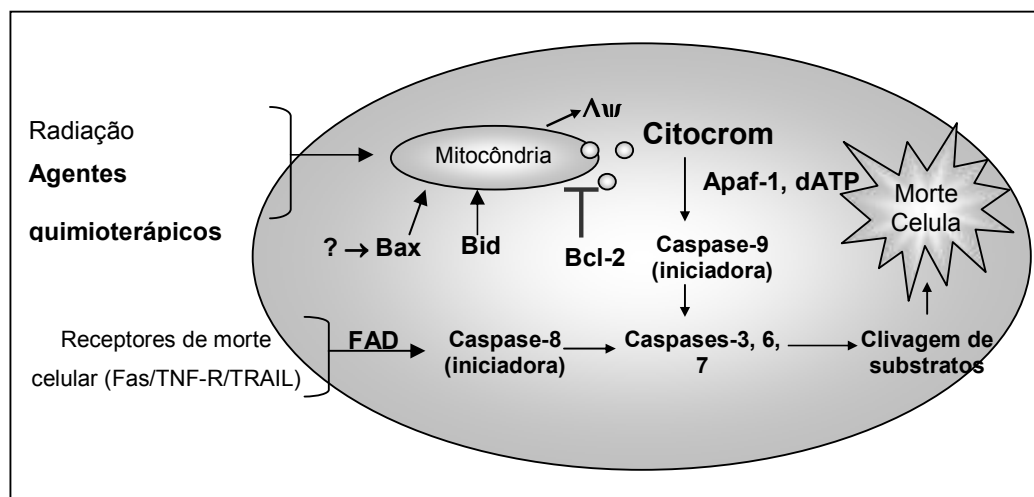


Figura 3. Estímulos apoptóticos induzidos por agentes quimioterápicos podem ser independentes da via receptor de morte celular. Neste caso, a via mitocondrial é ativada com envolvimento de alterações de permeabilidade de membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol, que se liga a dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa (iniciadora) pode então clivar as caspases efetoras subsequentes.

Neste caso, a via mitocondrial (Figuras 2 **(B)** e 3) é ativada predominantemente, com envolvimento de alterações de permeabilidade de membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol, que se liga a dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa (iniciadora) pode então clivar as caspases efetoras subsequentes (-2, -3, -6, -7, -8, -9, e -10). Portanto, a ativação da caspase-9 mediada pelo citocromo c serve como um mecanismo de amplificação de sinais durante o processo apoptótico (LI et al., 1997; GREEN; REED, 1998; SLEE; ADRAIN; MARTIN, 1999; SLEE et al., 1999; DESAGHER; MARTINOU, 2000; KUIDA, 2000; HERR; DEBATIN, 2001; ANAZETTI et al., 2003 a,b). A via mitocondrial **(B)** é freqüentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros pró- e anti-apoptótico da família Bcl-2 regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 inibem a morte celular por apoptose impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial, conseqüentemente, inibem o extravasamento do citocromo c para o citosol (GOTTLIEB, 2000). Este associa-se com Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, formando o apoptossomo. Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose (ANURADHA; KANNO; HIRANO, 2001).

Reguladores do Processo Apoptótico

A homeostase tecidual é dependente do perfeito balanço entre proliferação e morte celular, que são eventos intimamente acoplados. Alguns reguladores do ciclo celular participam em ambos os processos, morte celular programada e divisão celular. A relação entre ciclo celular e apoptose é reconhecida pelos genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, NF- κ B, CDK, ciclinas e CKI. Após estimulação, estas proteínas podem induzir proliferação celular, parada do ciclo ou morte celular. O "background" genético e o micro-ambiente celular são importantes, assim como a extensão de danos ao DNA e o nível de diferentes proteínas (VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). Como discutido anteriormente, as proteínas da família Bcl-2 apresentam uma importante função anti-apoptótica, que é regulada por multi-sítios de fosforilação envolvendo interações entre

várias proteínas da família (HALDAR; JENA; CROW, 1995; YAMAMOTO; ICHIJO; KORSMEYER, 1999). Níveis elevados de proteínas dessa família de genes bloqueiam a apoptose (Bcl-2 e Bcl-x) e outras promovem-na (Bax, Bad e Bak). Os genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 são promotores da sobrevivência celular por inibirem a ocorrência da apoptose (VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). A proteína Bcl-2 está localizada na membrana mitocondrial externa de diferentes tipos celulares, como epitélios capazes de proliferação e morfogênese. Dentre suas atuações está o bloqueio da liberação de citocromo c pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo portanto, a ativação de caspases (YAMAMOTO; ICHIJO; KORSMEYER, 1999). A proteína Bax pode produzir heterodímeros com a Bcl-2 (Bax/Bcl-2) ou homodímeros (Bax/Bax), desta forma, Bcl-2 suprime a morte celular quando heterodimerizada com Bax; por outro lado, o homodímero Bax/Bax promove apoptose. O mecanismo de controle da apoptose pelos genes da família Bcl-2 envolve a formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da morte celular (GOTTLIEB, 2000; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003).

A proteína c-Myc é uma fosfoproteína nuclear que funciona como um fator de transcrição estimulando a progressão do ciclo celular e a apoptose. A expressão de c-Myc é regulada por fosforilação e interação com outras proteínas celulares. É um gene de resposta inicial, ou seja, responde diretamente a sinais mitogênicos estimulando a passagem das células da fase G1 do ciclo celular. Pode exercer seu efeito na progressão do ciclo celular pela transcrição de genes importantes no controle do ciclo celular, tais como ciclinas, quinases e outros fatores de transcrição. Ao mesmo tempo atua como regulador negativo da parada do ciclo celular, suprimindo a transcrição de alguns genes envolvidos. Além do seu papel no ciclo celular, c-myc também apresenta um papel chave na regulação do processo apoptótico. Trabalhos anteriores mostraram que tanto a superexpressão quanto a diminuição da expressão de c-Myc pode levar a morte celular (THOMPSON, 1998; CONZEN et al., 2000).

Os eventos moleculares envolvidos no processo de apoptose induzida por c-Myc não estão bem compreendidos. Em geral a indução de apoptose por c-Myc parece ocorrer quando há privação de fatores de sobrevivência celular. c-Myc pode envolver vias independente ou dependente de p53, transativando o gene promotor da proteína p53 e aumentando sua meia vida. A indução de apoptose por c-Myc pode também estar relacionada com a liberação de citocromo c envolvendo proteínas Bax (pró-apoptóticas) funcionalmente ativas e com a expressão de Fas ligante e de receptor Fas (REYNOLDS et al., 1994).

Um outro importante gene envolvido no processo de morte e proliferação celular é o supressor tumoral p53. Este gene é o mais frequentemente mutado em todos os tipos de câncer humano e é um sensor universal de estresse genotóxico. A frequência de mutações do gene p53 varia dependendo do tipo de tumor, mas em média, 50% dos tumores apresentam uma lesão no locus p53 (COLMAN; AFSHARI; BARRET, 2000). A proteína p53, cujo nome refere-se a massa molecular, é amplamente conhecida como indutora de parada do ciclo celular e de apoptose. Esses processos são regulados por transativação de genes envolvidos em diferentes funções celulares, mas p53 também ativa mecanismos independentes de transcrição gênica (HAUPT et al., 1995; AGARWAL et al., 1998; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003).

Normalmente, a proteína p53 é encontrada na célula em níveis basais, sugerindo que seja uma proteína requerida pelas células ocasionalmente em circunstâncias especiais. A indução de aumento nos níveis da proteína p53 em cultura inibe a proliferação celular. Assim, a célula permanece na fase G1 do ciclo celular, o chamado ponto de checagem da integridade do material genético, impedindo sua passagem para a fase S. Células expostas a irradiação e que não codificam a proteína p53 continuam dividindo-se e replicando o DNA sem pausa para o reparo de lesões no DNA (VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003; HAUPT et al., 2003).

Este gene envolvido na apoptose foi detectado inicialmente em estudo de tumores. O câncer surge quando células recém-fomadas apresentam mutações simultâneas em genes que controlam o crescimento e a sobrevivência. Estes defeitos, se pouco extensos, podem ser corrigidos por enzimas especializadas. Em geral, se a mutação é irreparável, ocorre o desencadeamento do processo de morte celular por apoptose. Ao contrário do gene Bcl-2, o p53 pára o ciclo celular desencadeando a apoptose. Células mutantes, que não codificam este gene, não sofrem apoptose. Estas células sobrevivem por mais tempo, acumulam mais mutações e multiplicam-se sem controle, gerando tumores. Por impedir a proliferação de células mutadas, protegendo o organismo do câncer, o p53 é denominado de gene supressor de tumores (BENNETT, 1999).

A proteína retinoblastoma (Rb) inibe a progressão do ciclo celular pela interação com fatores de transcrição tais como E2F. Quando a pRb torna-se fosforilada, o fator E2F é liberado estimulando a proliferação. Além do papel da pRb no ciclo celular, essa proteína também atua na regulação negativa do processo apoptótico. O fator E2F induz a expressão do fator pró-apoptótico Apaf-1 e evidências sugerem um papel para o fator E2F em apoptose em seguida ao dano no DNA (HARBOUR; DEAN, 2000).

Portanto, p53 e pRb/E2F podem estar diretamente ligados a proliferação celular e apoptose. A proteína p53 ativada causa parada do ciclo celular na fase G1. Nestas condições, a proteína Rb não está fosforilada e as células não podem progredir através do ciclo celular. Por outro lado, pRb fosforilada libera o fator E2F, que induz diretamente a transcrição do gene que codifica a p53. Portanto, a via apoptótica dependente de p53 está conectada com o par pRb/E2F (HIEBERT et al., 1995). Cada um dos supressores tumorais (p53 e pRb) podem ser capazes de compensar a perda do outro (KING; CIDLOWSKI, 1998, VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003).

Apoptose versus Estresse Oxidativo

Uma grande variedade de estímulos pode induzir apoptose, dentre esses o estresse oxidativo provocado pela geração de intermediários oxidativos através da ação de alguns agentes anti-neoplásicos (MATES; SANCHEZ-JIMENEZ, 2000; HENSLEY et al., 2000; PIWOCKA et al., 2001). O mecanismo de indução pode ser via exposição a peróxido de hidrogênio (IKEDA et al., 1999; MATSURA et al., 1999), ciclização-redox de quinonas ou agentes tiol-alquilantes (SLATER et al., 1995). Uma enorme quantidade de dados suporta o papel do estresse oxidativo no desencadeamento de apoptose (MCCONKEY, 1998), sendo que as vias apoptóticas clássicas envolvem um acúmulo moderado de espécies reativas de oxigênio. Assim como o cálcio, o estresse oxidativo pode inibir ou promover apoptose e até necrose, dependendo da intensidade do estímulo (FERNANDEZ; COTTER, 1994).

O estado redox das células é uma consequência do balanço entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), oxidantes e redutores equivalentes. Elevação nos níveis de EROs acima da capacidade de tamponamento e atividade enzimática designada para modular os níveis dessas espécies resulta em estresse oxidativo potencialmente citotóxico. Sob esta condição pró-oxidante, radicais altamente reativos podem danificar o DNA, RNA, proteínas e componentes lipídicos, que podem levar a morte celular. Apesar de várias macromoléculas estarem sujeitas ao ataque de EROs, o ataque a nucleotídeos livres ou ao DNA pode ocasionar danos permanentes devido aos efeitos deletérios destas espécies (ALLEN; TRESINI, 2000).

Muitos tipos celulares normais e malignos podem gerar e liberar espécies reativas de oxigênio *in vitro* em resposta a um estímulo específico desencadeado via fator de crescimento/citocina ou constitutivamente no caso de células tumorais (CERUTTI, 1994; ZWART et al., 1999). Células

cancerígenas podem gerar peróxido de hidrogênio e, se isso ocorrer *in vivo*, pode contribuir para a mutação das células normais em cancerígenas e provocar danos em tecidos normais e, assim, facilitar o crescimento e invasão do tumor (ZWART et al., 1999; NAVARRO et al., 1999). Tem sido sugerido que a persistência de uma situação de estresse oxidativo em células tumorais poderia explicar parcialmente algumas características do câncer, tais como proto-oncogenes ativados, fatores de transcrição, instabilidade genômica, resistência a radioterapia ou a quimioterapia, invasão tecidual e metástase (TOYOKUMI et al., 1995; ALLEN; TRESINI, 2000). Contudo, a ocorrência de uma situação de estresse oxidativo *in vivo* e suas conseqüências para o hospedeiro permanecem uma questão em aberto. Um dos mais importantes fatores a ser considerado em relação a essa situação de estresse oxidativo é o balanço entre radicais livres e sistemas antioxidantes, comumente utilizados como marcadores do estado redox.

A Figura 4 mostra as maiores fontes produtoras de EROs. Incluem a mitocôndria, o retículo endoplasmático, a membrana plasmática e o citosol. A mitocôndria gera $O_2^{\bullet-}$ durante a respiração, que é convertido a H_2O_2 pela Mn-SOD. No citosol, $O_2^{\bullet-}$ é convertido a H_2O_2 pela Cu, Zn-SOD. As duas maiores defesas contra H_2O_2 são o ciclo redox GSH presente em ambos, citosol e mitocôndria e, catalase presente na fração peroxissomal. Outras fontes de $O_2^{\bullet-}$ incluem as enzimas xantina oxidase no citosol, NADPH oxidase na membrana plasmática e citocromo P450 no retículo endoplasmático. Bcl-2 pode funcionar como um antioxidante em alguns sistemas apoptóticos induzindo a realocização de GSH no núcleo. O óxido nítrico (NO) pode ser produzido no citosol ou na mitocôndria pela óxido nítrico sintase (NOS). Adicionalmente, $TNF\alpha$ pode induzir ativação de NOS, resultando na geração de óxido nítrico. O NO pode reagir com lipídeos de membrana e podem causar mutações no DNA. Além disso, $ONOO^-$ pode induzir peroxidação lipídica e sinalizar a morte celular por apoptose.

GSH e Apoptose

Em uma situação de estresse oxidativo as células apresentam dois mecanismos de defesa importantes: um tampão redutor tiol consistindo de pequenos peptídeos com moléculas sulfidríla redox-ativas: glutathiona (GSH) e tioredoxina (TRX) e, um sistema enzimático (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX)) (Figura 4) (YU, 1994; GABBITA et al., 2000; MATÉS, 2000; DAVIS JÚNIOR; RONAI; TEW, 2001; CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002).

A GSH é o mais abundante composto tiol de baixo peso molecular encontrado em plantas e animais (MEISTER; ANDERSON, 1984; SIES, 1999), em concentrações variando entre 0,1 – 10 mM (SCHROEDER et al., 1996; DAVIS JÚNIOR; RONAI; TEW, 2001). Este tripeptídeo apresenta diversas funções celulares em adição à suas propriedades antioxidantes participando na transdução de sinal, na expressão gênica e na apoptose (LARSSON et al., 1983; VINA, 1990; COTGREAVE; GERDES, 1998; ARRIGO, 1999; SIES, 1999; VOEHRINGER, 1999; DAVIS JÚNIOR; RONAI; TEW, 2001). Estes processos estão interrelacionados com o estado redox tiol, interações proteína-glutationa e proliferação celular (COTGREAVE; GERDES, 1998; SIES, 1999).

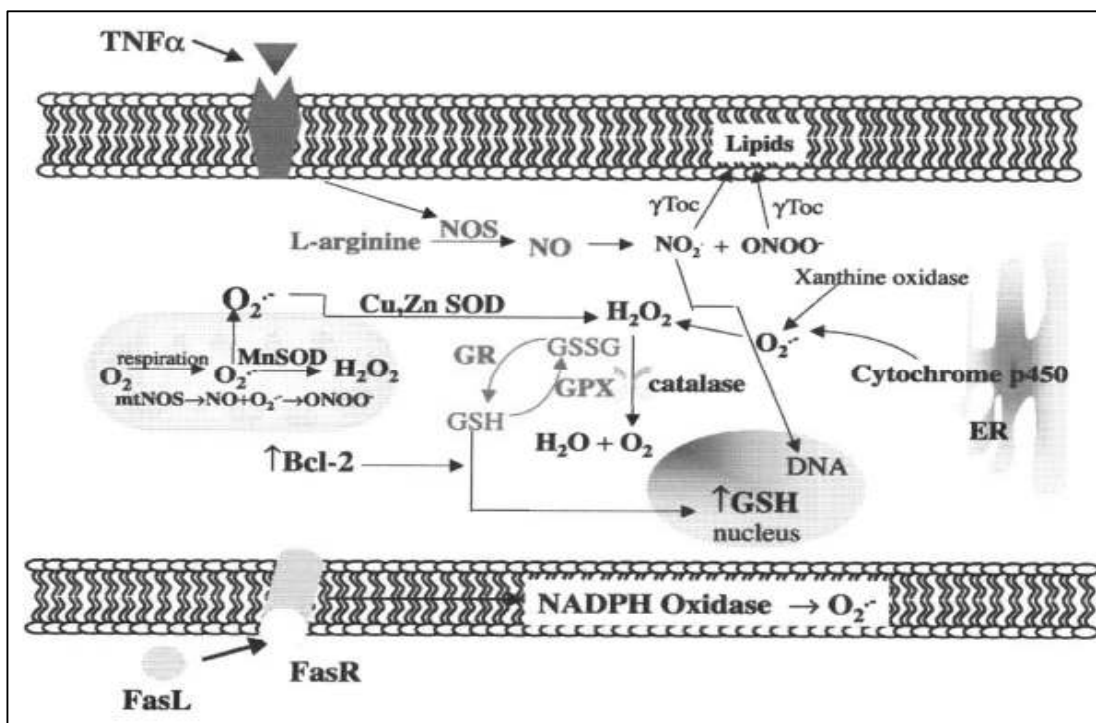


Figura 4. Fontes intracelulares de EROs e principais mecanismos de defesa antioxidante. As maiores fontes produtoras de EROs incluem a mitocôndria, retículo endoplasmático, membrana plasmática e citosol. A mitocôndria gera $O_2^{\bullet-}$ durante a respiração, que é convertida a H_2O_2 pela Mn-SOD. No citosol, $O_2^{\bullet-}$ é convertido a H_2O_2 pela Cu, Zn-SOD. As duas maiores defesas contra H_2O_2 são o ciclo redox GSH presente em ambos, citosol e mitocôndria e catalase presente na fração peroxissomal. Outras fontes de $O_2^{\bullet-}$ incluem as enzimas xantina oxidase no citosol, NADPH oxidase na membrana plasmática e citocromo P450 no retículo endoplasmático. Bcl-2 pode funcionar como um antioxidante em alguns sistemas apoptóticos induzindo a realocação de GSH no núcleo. NO pode ser produzido no citosol ou na mitocôndria por NOS. Adicionalmente, $TNF\alpha$ pode induzir ativação de NOS, resultando na geração de óxido nítrico (NO). NO pode reagir com lipídeos de membrana e podem causar mutações no DNA. Além disso, $ONOO^-$ pode induzir peroxidação lipídica.

Em condições normais, mais de 95% da GSH nas células está reduzida; portanto o ambiente intracelular é, normalmente, altamente redutor. Investigações sobre o papel da GSH na modulação da sinalização

apoptótica sugerem que alterações redox no ambiente intracelular induzido por agentes citotóxicos também são modulados pela geração de EROs e pela extrusão de GSH das células (GHIBELLI et al., 1995). Vários estudos demonstram uma diminuição de GSH intracelular concomitante a um aumento em EROs no processo de morte celular por apoptose (ODA et al., 1999; XU; THORNALLEY, 2001).

A esse respeito, Slater et al. (1995) postularam que a perda de GSH citoplasmático seria um dos eventos característicos de morte celular por apoptose, através da influência na capacidade redox tamponante da célula, tornando-a intolerante à presença de agentes oxidantes. Quando há uma diminuição também nos níveis de GSH mitocondrial, a produção de energia é afetada e a célula incha e sofre "necrose secundária" (apoptose tardia). Estudos demonstraram que a morte celular apoptótica pode sofrer uma transição para a necrótica durante uma situação de estresse oxidativo através de dois mecanismos principais. O primeiro é desencadeado pela inativação de caspases devido à oxidação do grupo tiol de seus sítios ativos por agentes oxidantes ou S-nitrosilação. No segundo mecanismo ocorre uma redução nos níveis de ATP, portanto, na produção de energia, devido à diminuição de função mitocondrial causada pela ação de agentes oxidantes, levando à liberação de citocromo c e alteração de permeabilidade de membrana mitocondrial (MCCONKEY, 1998; CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000). Outros agentes antioxidantes possuem atividades semelhantes ao GSH, protegendo as células do processo apoptótico.

Apoptose e Doenças

A morte celular programada participa de vários processos fisiológicos vitais, como o desenvolvimento embrionário, a involução da glândula mamária após o período de amamentação, o controle da proliferação de tumores e a regulação de populações do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pelo desencadeamento do processo apoptótico podem ocasionar diversas patologias. Por ser indispensável à vida, a morte das células deve seguir um programa metuculoso. Qualquer distúrbio em sua regulação, ou seja, tanto o excesso quanto à deficiência, podem provocar uma variedade de doenças.

A apoptose excessiva pode causar doenças neurodegenerativas (como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson), lesões secundárias após isquemia, osteoporose, entre outras patologias (KUSIAK; IZZO; ZHAO, 1996; DEIGNER; HABERKOM; KINSCHERF, 2000; FOSSLIEN, 2001; SHELTON; KRISHNAMURTHY; JOHNSON, 2004). Em relação ao mal de

Alzheimer, os neurônios entram em processo de morte celular por apoptose precocemente, o que resulta em demência progressiva, perda da cognição e da memória (KUSIAK; IZZO; ZHAO, 1996; SHELTON; KRISHNAMURTHY; JOHNSON, 2004).

Em lesões cardíacas ocasionadas por isquemia, o bloqueio sanguíneo leva à necrose as células que dependem do vaso afetado. Porém, as células próximas da área afetada morrem mais lentamente através do desencadeamento do processo de morte celular por apoptose induzido pela geração de EROs após o restabelecimento da circulação sanguínea (ANSELMÍ et al., 2004; MARIN-GARCIA; GOLDENTHAL, 2004).

As mutações em genes que regulam o crescimento de células somáticas em vertebrados dirigem o desenvolvimento do câncer. Os processos governantes da gênese e progressão de câncer são evolucionários, nos quais a seleção natural atua sobre a diversidade adquirida e inerente de vários clones somáticos, prevalecendo as formas que apresentam vantagens propagativas. Processos de proliferação celular desregulada e morte celular por apoptose suprimida constituem suporte para a progressão neoplásica, comum a todos os tipos de câncer. Estes dois defeitos celulares devem ser explorados terapêuticamente (BERTRAM, 2001; EVAN; VOUSDEN, 2001).

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), que é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), envolve a destruição apoptótica de linfócitos e, no contexto de patologias associadas a AIDS, de neurônios e de miócitos. Várias proteínas produzidas pelo HIV-1 desencadeiam apoptose pela indução de permeabilização de membrana mitocondrial. Além disso, vários análogos de nucleosídeos utilizados clinicamente no tratamento inibem a replicação do DNA mitocondrial (DNAm_t) e/ou aumentam a frequência de mutações do DNAm_t. Portanto, parece que a patogênese de AIDS, as intervenções farmacológicas e as complicações associadas com esta doença, afetam a regulação mitocondrial da apoptose, que determina amplamente o resultado da infecção causada pelo HIV-1 (BADLEY et al., 2003).

Conclusões

Muito ainda falta a ser pesquisado 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. A descoberta de novos genes, relacionados à

morte celular, e dos produtos que eles codificam elucidarão, cada vez mais, os mecanismos moleculares e genéticos deste processo e, no futuro, terão grande importância prática no campo da Medicina e da Farmacologia. Estas pesquisas básicas são muito importantes principalmente na aplicação prática das descobertas às doenças relacionadas à perda do equilíbrio homeostático das células de um tecido, tais como, câncer e doenças neuro-degenerativas. O conhecimento sobre os aspectos morfológicos, bem como bioquímicos da morte celular por apoptose deverá ser aprimorado. Contudo, o maior desafio é integrar o conhecimento atual sobre a indução e controle da morte celular por apoptose com novas terapias para patologias diversas. Se o processo de apoptose puder ser controlado, poderá trazer implicações terapêuticas para afecções tão diversas quanto o câncer, Alzheimer, síndromes ateroscleróticas e isquêmicas, miocardiopatias, entre muitas outras. Finalmente, é possível que a pesquisa básica sobre a regulação da ativação de caspases, o conhecimento sobre as proteínas e vias bioquímicas envolvidas no processo apoptogênico podem revelar estratégias lógicas para a descoberta de novos fármacos utilizados no tratamento tanto do câncer quanto de doenças neurodegenerativas.

Referências

AGARWAL, M. L. et al. A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, n. 95, p. 1475-1480, 1998.

ALLEN R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med*, n. 28, p. 463-499, 2000.

ANAZETTI, M. C. et al. Comparative Cytotoxicity of Dimethylamide-Crotonin in the Pomyelocytic Leukemia Cell Line (HL60) and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Toxicology*, n. 188, p. 261-274, 2003a.

_____. Dimethylamide-Crotonin induces Apoptosis with lipidic peroxidation involvement and dependence of Caspases -9, -2 and -6 activation on Leukemic Cells. *Toxicology*. (submetido). 2003b.

ANSELMINI, A. et al. Myocardial ischemia, stunning, inflammation and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* n. 25, p. 304-311, 2004.

ANURADHA, C. D.; KANNO, S.; HIRANO, S. Oxidative damage to mitochondrial is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL60 cells. *Free Rad. Biol. & Med.*, n. 31, p. 367-373, 2001.

Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
Disponível em: <www.metrocamp.com.br/pesquisa>

ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, n. 136, p. 593-608, 1990.

ARRIGO, A. P. Gene expression and thiol redox state. *Free Radica. Biol. Med.*, n. 27, p. 936-944, 1999.

BADLEY, A. D. et al. Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol. Sci.*, n. 24, p. 298-305, 2003.

BAKER, S. J.; REDDY, E. P. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, n. 12, p. 1-9, 1996.

BENNETT, M. R. Mechanisms of p53-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, n. 58, p. 1089-1095, 1999.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol. Asp. Med.*, n. 21, p. 167-223, 2001.

BRILL, A. et al. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J. Assist. Reprod. Genet.*, n. 16, p. 512-519, 1999.

CERUTTI P. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, n. 344, p. 862-863, 1994.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Rad. Biol & Méd.*, n. 29, p. 323-333, 2000.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, n. 326, p. 1-16, 1997.

COLMAN, M. S.; AFSHARI, C. A.; BARRET, J. C. Regulation of p53 and activity in response to genotoxic stress. *Mutat. Res.*, n. 462, p. 179-188, 2000.

COMPTON, M. M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev.*, n. 11, p. 105-119, 1992.

CONZEN, S. D. et al. Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc transrepression correlates with acceleration of apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, n. 20, p. 6008-6018, 2000.

COTGREAVE, I. A.; GERDES, R. G. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, n. 242, p. 1-9, 1998.

Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
Disponível em: <www.metrocamp.com.br/pesquisa>

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods.*, n. 265, p. 49-72, 2002.

DAVIS JÚNIOR, W.; RONAI, Z.; TEW, K. D. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *Perspectives in Pharmacol.*, n. 296, p. 1-6, 2001.

DEBATIN, K. M. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol. Lett.*, n. 113, p. 41-48, 2000.

DEIGNER, H. P.; HABERKOM, V.; KINSCHERF, R. Apoptosis modulation in the therapy of neurodegenerative diseases. *Expert. Opin. Investing. Drugs*, n. 9, p. 747-764, 2000.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondria as central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biol.*, n. 10, p. 369-377, 2000.

EISCHEN, C. M. et al. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood.*, n. 90, p. 935-943, 1997.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, n. 411, p. 342-348, 2001.

FERNANDEZ, R. S.; COTTER, T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochem. Pharmacol.*, n. 48, p. 675-681, 1994.

FOSSLIEN, E. Review: Mitochondrial medicine - Molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, n. 31, p. 25-67, 2001.

FRASER, A.; EVAN, G. A license to kill. *Cell*, n. 85, p. 781-784, 1996.

GABBITA, S. P. et al. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Free Radical Biology and Aging Program.*, n. 376, p. 1-13, 2000.

GHIBELLI, L. et al. Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Commun.*, n. 216, p. 313-320, 1995.

GOTTLIEB, R. A. Role of mitochondria in apoptosis. *Crit. Rev. Eukaryot Gen Expr.*, n. 10, p. 231-239, 2000.

GREEN, D. R.; MARTIN, S. J. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol.*, n. 7, p. 694-703, 1995.

Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
Disponível em: <www.metrocamp.com.br/pesquisa>

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, n. 281, p. 1309-1312, 1998.

HALDAR, S.; JENA, N.; CROW, C. M. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, n. 92, p. 4507-4511, 1995.

HALE, A. J. et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem.*, n. 236, p. 1-26, 1996.

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat. Cell. Biol.*, n. 2, p. E65-E67, 2000.

HAUPT, Y. et al. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 9: 2170-2183, 1995.

HAUPT, S. et al. Apoptosis – the p53 network. *J. Cell Sci.*, n. 116, p. 4077-4085, 2003.

HIEBERT, S. W. et al. E2F-1: DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, n. 15, p. 6864-6874, 1995.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, n. 407, p. 770-776, 2000.

HENSLEY, K. et al. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. *Free Radical Biol. Med.*, n. 28, p. 1456-1462, 2000.

HERR, I.; DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, n. 98, p. 2603-2614, 2001.

HICKMAN, J. A. Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur. J. Cancer.*, n. 324, p. 921-926, 1996.

IKEDA, K. et al. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL60 cells. *Biochem. Pharm.*, n. 57, p. 1361-1365, 1999.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. *Stem Cells*, n. 17, p. 306-313, 1999.

JACOBSON, M. D; EVAN, G. I. Apoptosis. Breaking the ICE. *Curr Biol.*, n. 4, p. 337-340, 1994.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, n. 108, p. 153-164, 2002.

Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
Disponível em: <www.metrocamp.com.br/pesquisa>

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, n. 26, p. 239-257, 1972.

KERR, J. F. R. Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends Cell Biol.*, n. 5, p. 55-57, 1995.

_____. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, n. 182, p. 471-474, 2002.

KING, K. L.; CIDLOWSKI, J. A. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, n. 60, p. 601-617, 1998.

KUIDA, K. Caspase-9. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.*, n. 32, p. 121-124, 2000.

KUSIAK, J.W., IZZO, J.A., ZHAO, B. Neurodegeneration in Alzheimer disease. Is apoptosis involved? *Mol. Chem. Neuropathol.*, n. 28, p. 153-162, 1996.

LARSSON, A. et al. (Ed.). *Functions of glutathione*. Biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects. New York: Raven, 1983.

LEE, J. M.; BERNSTEIN, A. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev.*, n. 14, p. 149-161, 1995.

LI, P. et al. Cytochrome c and ATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, n. 91, p. 479-489, 1997.

MAKIN, G. Targeting apoptosis in cancer chemotherapy. *Expert Opin Ther Targets*, n. 6, p. 73-84, 2002.

MARIA, S. S. *Estudo citoquímico, imunocitoquímico e de análise de imagem de células fibroblásticas em proliferação e apoptose na ausência e presença de colágeno tipo I hiperpolimerizado*. 1998. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

MARIN-GARCIA, J.; GOLDENTHAL, M. J. Mitochondria play a critical role in cardioprotection. *J. Card. Fail.*, n. 10, p. 55-66, 2004.

MARTIN, S. J.; GREEN, D. R. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, n. 18, p. 137-153, 1995.

MATÉS, M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol.*, n. 153, p. 83-104, 2000.

Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
Disponível em: <www.metrocamp.com.br/pesquisa>

- MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMENEZ, F. M. Role of active oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.*, n. 32, p. 157-170, 2000.
- MATSURA, T. et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL60 cells requires caspase-3 activation. *Free Rad. Res.*, n. 30, p. 73-83, 1999.
- MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters*, n. 99, p. 157-168, 1998.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Ann Rev. Biochem.*, n. 52, p. 711-760, 1984.
- MELO, P. S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Animal*, n. 36, p. 539-543, 2000.
- MINKO, T.; KOPECKOVÁ, P.; KOPECEK, J. Primary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. *J. Control. Release*, n. 71, p. 227-237, 2001.
- NAVARRO, J. et al. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associated with tumor growth *in vivo*. *Free Rad. Biol. Med.*, n. 26, p. 410-18, 1999.
- ODA, T. et al. Specific efflux of glutathione from the basolateral membrane domain in polarized MDCK cells during ricin-induced apoptosis. *J. Biochem.*, n. 126, p. 715-721, 1999.
- PIWOCKA, K. et al. Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in jurkat cells. *Free Rad. Biol. Med.*, n. 31, p. 670-678, 2001.
- RAFFRAY, M.; COHEN, G. M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct models of cell death. *Pharmacol. Ther.*, n. 75, p. 153-177, 1997.
- REED, J. C. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer cell*, n. 3, p. 17-22, 2003
- REYNOLD, J. E. et al. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.*, n. 54, p. 6348-6352, 1994.
- Schroeder, C. P. et al. Glutathione and drug resistance. *Cancer Invest.*, n. 14, p. 158-168, 1996.
- Metrocamp Pesquisa*, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
Disponível em: <www.metrocamp.com.br/pesquisa>

SHELTON, S. B.; KRISHNAMURTHY, P.; JOHNSON, G. V. W. Effects of cyclin-dependent kinase-5 activity on apoptosis and tau phosphorylation in immortalized mouse brain cortical cells. *J. Neurosci. Res.*, v. 76, n. 1, p. 110-120, 2004.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, n. 27, p. 916-921, 1999.

SLATER, A. F. G. et al. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol. Letters*, n. 82/83, p. 149-153, 1995.

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.*, n. 6, p. 1067-1074, 1999.

SLEE, E. A. et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.*, n. 144, p. 281-292, 1999.

STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*, n. 1387, p. 17-31, 1998.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, n. 267, p. 1456-1462, 1995.

THOMPSON, E. B. The many roles of c-Myc apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, n. 60, p. 575-600, 1998.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*, n. 281, p. 1312-1316, 1998.

TOYOKUMI, S. et al. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.*, n. 358, p. 1-3, 1995.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.*, n. 36, p. 165-175, 2003.

VINA, J. (Ed.). *Glutathione: metabolism and physiological functions*. Boca Raton: CRC Press, 1990.

VOEHRINGER, D. W. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radical Biology & Medicine*, n. 27, p. 945-950, 1999.

XU, K.; THORNALLEY, P. J. Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, n. 61, p. 165-177, 2001.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. K.; CURRIE, A. R. Cell Death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, n. 68, p. 251-305, 1980.

WYLLIE, A. H. The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res.*, n. 5, p. 131-142, 1985.

YAMAMOTO, K.; ICHIJO, H.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell. Biol.*, n. 19, p. 8469-8478, 1999.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, n. 74, p. 139-162, 1994.

ZWART, L. L et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.*, n. 26, p. 202-226, 1999.