

## LESÃO E MORTE CELULAR

As células e os tecidos estão organizados e capacitados a desempenhar funções necessárias à manutenção da vida do indivíduo. Dependendo do estímulo pode ocorrer a adaptação necessária, como nas células musculares do halterofilista ou na hiperqueratose das mãos do lavrador. Como exemplo de adaptações fisiológicas temos a mobilização de cálcio da matriz óssea pelos osteoclastos sob a ação do paratormônio. O mesmo paratormônio, se em excesso, pode causar a chamada lesão de células gigantes na mandíbula ou maxila, que é caracterizada pela presença de áreas de reabsorção óssea (radiolúcidas). Entretanto não há mobilização de  $\text{Ca}^{++}$  dos dentes. Se o estímulo for excessivo ou tóxico para a célula, lesões irreversíveis levam a morte celular. O limite entre estímulo fisiológico e lesivo não é exato. Radiação UV pode causar estímulo para produção de melanina, formação de bolha, descamação da pele ou câncer.

O termo **degeneração** (alteração sub-letal) refere-se a alterações celulares que não matam a célula, deixando-as com as funções diminuídas. Estas alterações podem ser reversíveis ou evoluir para a morte celular. Pode ocorrer ou não acúmulo de substâncias no citoplasma. Uma causa comum de degeneração celular é a anóxia.

A célula tem quatro sistemas interdependentes que quando alterados podem levar a morte celular:

- 1- membranas - que mantém a homeostasia iônica e osmótica da célula e das organelas.
- 2- respiração aeróbica - fosforilação oxidativa com produção de ATP (mitocôndrias).
- 3- síntese de proteínas e manutenção do citoesqueleto.
- 4- DNA.

As alterações moleculares levam posteriormente às alterações morfológicas, que são observadas quando a lesão já é bastante acentuada. Assim, as células cardíacas, que sofrem lesão irreversível em 20-60 min. após a isquemia, apresentarão alterações microscópicas de morte celular somente após 12 horas.

As principais causas das alterações celulares e das doenças são: alterações genéticas, deficiências nutricionais, distúrbios endócrinos, doenças imunológicas, agentes físicos e químicos, infecções, anóxia.

### Ações específicas

É difícil determinar o local exato de ação das substâncias que causam lesão celular, mas estas devem interferir em sistemas básicos da célula, como na manutenção da integridade do DNA e das membranas, na síntese de proteínas e no funcionamento das mitocôndrias. Algumas substâncias reagem diretamente com moléculas das células, outras indiretamente pela formação de substâncias tóxicas ou radicais livres. Como exemplo de ação direta temos:

- Cianeto: inativa a citocromo-oxidase das mitocôndrias.
- Cloreto de mercúrio: o Hg liga-se a grupos sulfidrila da membrana celular, causando aumento de permeabilidade, principalmente nas células do trato gastrointestinal (absorvem) e rins (excretam).
- Clostridium perfringens: bactéria anaeróbia que produz fosfolipases, as quais atacam as membranas celulares.
- $\text{CCl}_4$  e o acetaminofeno: atuam indiretamente pela formação de radicais livres.

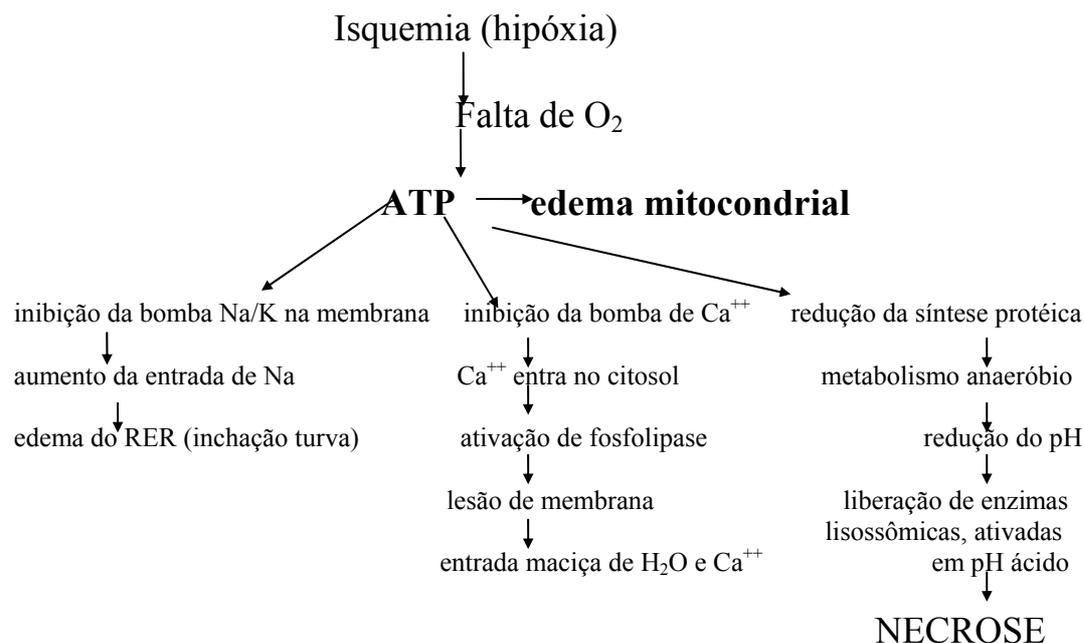
### Lesão por isquemia

A hipóxia, causada por obstrução vascular ou outros mecanismos, causa alterações celulares bem estudadas e que ilustram como ocorrem lesões reversíveis ou irreversíveis. A sensibilidade de cada célula depende da capacidade em resistir a falta de oxigênio, ATP, entrada de cálcio e

neutralização de radicais livres. Os neurônios são muito sensíveis, mas fibroblastos são extremamente resistentes. São exemplos de viabilidade celular frente a hipóxia:

- Neurônio - 3-5 min.
- Miocárdio, hepatócitos - 10 min - 2horas
- Fibroblastos, músculo esquelético, epiderme - muitas horas.

O esquema abaixo ilustra as alterações celulares devido à isquemia.



-A falta de  $O_2$  diminui a fosforilação oxidativa e ativa a glicólise. Na respiração aeróbica formam-se 38 ATPs (304.000 cal.) e na glicólise apenas 2 ATPs por glicose. Há acúmulo de ácido láctico, com diminuição do pH.

-A concentração de  $Na^+$  intracelular é menor do que extracelular, enquanto que a de  $K^+$  é maior. Esta diferença de concentração é devido a bomba de  $Na^+$ , que é um complexo de proteínas dependentes de energia (ATP). Na falta de ATP, entra mais  $Na^+$  na célula, principalmente no R.E. e mitocôndrias, dando à célula o aspecto de inchação turva (ver tumefação celular abaixo). Os ribossomos se desprendem do RE.

-A concentração de  $Ca^{++}$  no citosol é muito baixa, sendo este removido por bombas dependentes de ATP. Normalmente o  $Ca^{++}$  celular está ligado a proteínas no RER e mitocôndrias. A quantidade de  $Ca^{++}$  aumenta no citosol devido ao aumento de permeabilidade dos canais de íons cálcio, alteração das membranas, diminuição de ATP e lesão mitocondrial. A entrada de  $Ca^{++}$  na célula é o ponto em comum de muitas causas de morte celular.

-A maior concentração de  $Ca^{++}$  ativa enzimas destrutivas como fosfolipases, proteases (membranas e citoesqueleto), ATPases (ATP), com desorganização de membranas das organelas e dos componentes do citoesqueleto.

-O  $Ca^{++}$  desnatura proteínas, causando alterações características da necrose por coagulação.

-Os efeitos da maior concentração de  $Ca^{++}$  parecem ser mediados por radicais livres.

-A ruptura dos lisossomos libera enzimas hidrolíticas, ativas em pH ácido. As células lesadas liberam enzimas no plasma, como ocorre nas hepatites e no infarto do miocárdio. No infarto há liberação de TGO (transaminase glutâmico oxaloacética), transaminases pirúvicas, LDH (desidrogenase láctica), CK (creatinina quinase).

-Cerca de 60 segundos após o início da isquemia, a célula cardíaca para de se contrair, começa a usar glicogênio (glicólise) com conseqüente produção de ácido láctico e diminuição do pH. Posteriormente sofre as alterações acima descritas, sendo estas reversíveis até 1 hora após a hipóxia. As alterações morfológicas serão observadas em microscopia de luz depois de 12h da morte celular.

#### **Tumefação celular** (degeneração hidrópica ou vacuolar, edema celular, inchaço turva)

É conseqüência da entrada de água na célula devido a alteração da permeabilidade da membrana celular. O edema celular ocorre quando há alteração no equilíbrio iônico, com entrada de  $\text{Na}^+$ , devido a diminuição na produção de energia (ATP). Fragmentos de fígado incubados com cianeto ou 2-4 dinitrofenol sofrem edema celular devido a insuficiência de ATP. As células tornam-se levemente granuladas e vacuolizadas. Em seguida, pelo menos *in vitro*, se for diminuída a concentração de  $\text{Na}^+$  (sal), a célula perde água e pode voltar ao normal. *In vivo* é mais provável que a entrada de  $\text{Na}^+$  seja resultante de lesões celulares, e não simplesmente devido a maior concentração de sal no meio extracelular.

Ocorre principalmente nos rins, fígado e miocárdio. Nos rins os túbulos têm a luz diminuída e irregular, às vezes com o citoplasma arrebentado. A célula fica com volume aumentado, organelas espaçadas e núcleo intacto, sem deslocamento. As células com núcleos pálidos ou fragmentados já estão sofrendo necrose. Macroscopicamente o rim fica com peso aumentado, e o parênquima torna-se saliente quando a cápsula é cortada. Em microscopia eletrônica observa-se dilatação do RE e mitocôndrias.

#### **Proteínas de Estresse**

Foi observado que as células quando submetidas a choques térmicos produzem proteínas que protegem outras proteínas de alterações devidas aos estímulos injuriosos. Como foram inicialmente estudadas após choque térmico (são sintetizadas em quantidades muito aumentadas após breve exposição a temperaturas elevadas - 42°C por exemplo), foram chamadas de proteínas de choque térmico ou "Heat Shock Proteins" (HSP). São também produzidas por outros estímulos físicos (radiação), químicos ou biológicos (isquemia, vírus).

Existem vários tipos de HSP. As HSP 60 e 70 são chamadas de chaperonas, porque atuam se ligando a outras proteínas, evitando que estas se alterem. As HSP foram descritas inicialmente em bactérias *E.coli* mutantes que não permitiam a replicação do bacteriófago lambda (bacteriófago é um vírus capaz de infectar e se replicar em bactérias). Estas bactérias mutantes produziam versões alteradas de HSP 60 e 70, defeito este que impossibilitava a construção do vírus. Acreditava-se que as chaperonas atuassem somente prevenindo agregação de proteínas ainda não terminadas ou "enroladas" ("unfolded"). Provavelmente elas também interagem com seus "clientes", produzindo efeitos semelhantes a uma "massagem" nas proteínas, ligando-se a regiões incorretamente "enroladas" dando uma nova chance para que ocorra o "enrolamento" correto (estruturas secundária e terciária). A HSP 70 parece atuar cedo na vida das proteínas, ligando-se a estas antes do término da síntese protéica. Em contraste, a HSP 60 forma uma estrutura em barril (como uma câmara de isolamento) dentro da qual existe um meio adequado para ocorra a reorganização da estrutura secundária e terciária das proteínas incorretamente "enroladas".

Na fisiologia normal da célula, as HSP participam do transporte intracelular das proteínas, como colágeno. As HSP parecem reduzir a necrose no coração isquêmico, assim como proteger o cérebro. As HSP são essenciais para a sobrevivência das células. Seria a resposta celular semelhante ao que ocorre no organismo em situações de estresse, quando há liberação de adrenalina.

Na impossibilidade de reparação das proteínas defeituosas, estas são marcadas com uma “etiqueta” de ubiquitina. A ubiquitina é uma pequena proteína composta por 76 amino ácidos (massa molecular de 8.564,8 Da) expressa em todos os organismos eucariotos. Entretanto, a ubiquitina por si só não degrada proteínas, servindo somente como um sinal que marca a proteína-alvo para a destruição, a qual ocorre através do sistema ubiquitina-proteossomo de degradação protéica (complexo enzimático macromolecular que degrada proteínas citoplasmáticas e nucleares, também conhecido como proteossomo 26s). A marcação das proteínas-alvo com ubiquitina ocorre através de uma reação complexa dependente de ATP. As células possuem ainda um sistema para retirar moléculas de ubiquitina das proteínas já marcadas, processo chamado de desubiquitinação, o qual protege da degradação proteínas erroneamente ubiquitinadas. O sistema ubiquitina-proteossomo não degrada somente proteínas defeituosas, mas também proteínas que possuem um “turnover” rápido, como aquelas que controlam a progressão do ciclo celular (ex: p53, p21, p27), receptores de superfície (EGFR, c-erb B2), enzimas metabólicas, dentre outras.

### **Corpúsculos de Inclusão**

Células que sofrem estresse crônico podem formar agregados de proteínas no citoplasma, chamados de corpúsculos de inclusão. Hepatócitos expostos ao álcool formam massas de filamentos intermediários, de coloração rósea nos cortes corados em H&E, chamado de corpúsculo hialino de Mallory. Na doença de Parkinson formam-se inclusões esféricas de aspecto hialino como halo claro nos neurônios, chamados de corpos de Lewy. Na doença de Alzheimer, os neurônios apresentam um novelo neurofibrilar de microtúbulos e neurofilamentos.

As inclusões virais indicam replicação viral, mas os vírus podem já ter deixado as inclusões.

-Vírus herpes (HSV 1,2, V-Zoster, CMV, EBV) - inclusões nucleares.

-Papovavirus- Papiloma vírus e vírus JC (“human polyoma vírus”, causador de uma doença desmielinizante rara, chamada leucoencefalopatia progressiva multifocal) - inclusões nucleares.

-Poxvirus- molusco contagioso- no citoplasma.

### **Atrofia Celular e Autofagia**

Quando o estímulo é nocivo a célula pode atrofiar. Proteínas e organelas são envolvidas por membranas derivadas do RER, que se fundem com lisossomos, causando degradação das organelas. Células em atrofia podem mostrar vacúolos autofágicos em microscopia eletrônica, como corpos densos, lamelares (figuras de mielina), devido as membranas ricas em fosfolípidios não digeridos (corpos residuais), chamados de lipofuscina. A lipofuscina é facilmente observada em células cardíacas de idosos em microscopia de luz, como grânulos amarelos. Macroscopicamente o coração tem coloração marrom, chamado de atrofia parda.

### **Radicais livres**

**Radicais livres** são espécies químicas bastante reativas, conseqüentemente instáveis, que têm um elétron não pareado na órbita mais externa. Nas células, a principal fonte de radicais livres é a mitocôndria, oriundos dos processos oxidativos da respiração. Também são formados no citosol, lisossomos, RE e membranas, pela ação de enzimas como citocromo P-450 e xantina

oxidase. Os principais radicais livres no organismo são derivados do oxigênio: Ânion Superóxido  $O_2^{\bullet-}$  e íon hidroxila  $OH^{\bullet-}$ .  $H_2O_2$  é oxidante e fonte importante de radicais livres. O radical hidroxila parece ser o mais importante na célula. O óxido nítrico também pode agir como radical livre.

#### **Formação dos radicais livres:**

-reações de óxido-redução- o oxigênio respirado é usado na mitocôndria para formação de água,  $CO_2$  e ATP. Os elétrons liberados no ciclo de Krebs formam ânions superóxidos. Na presença de Fe, pela reação de Fenton formam ânion hidroxila, que é extremamente reativo, reagindo imediatamente com proteínas, lipídios e DNA. O radical hidroxila pode ser formado pela reação de Fenton, por radiação UV ou pela reação de Haber-Weiss



-Ferro livre- O Fe livre pode catalisar reações que formam radicais livres, na chamada reação de Fenton.  $Fe^{++} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+++} + OH^{\bullet} + OH^-$



-Xantina oxidase- a xantina é um metabólito do ATP, que se acumula em células com hipóxia. Quando oxidada pela xantina oxidase gera oxigênio reativo. Durante a isquemia não há formação de radicais reativos de oxigênio. Quando a oxigenação é restabelecida, grandes quantidades de radicais se formam nas mitocôndrias através da xantina oxidase, podendo ocorrer a necrose por re-perfusão. Allopurinol, inibidor da xantina oxidase, tem sido usado clinicamente para limitar a necrose cardíaca após infarto do miocárdio.

-Neutrófilos- a destruição de bactérias pelos neutrófilos envolve radicais livres derivados do oxigênio.

Tetracloro de carbono- radicais livres são produzidos como produtos intermediários no metabolismo de substâncias tóxicas como o tetracloro de carbono ( $CCl_3^{\bullet} + Cl^-$ ). O  $CCl_4$  é metabolizado no REL dos hepatócitos, iniciando a peroxidação lipídica, com degradação das membranas celulares e edema do RE visível em microscopia eletrônica após 2 h.

#### **Efeitos dos radicais livres:**

-Mitocôndrias - podem causar liberação de  $Ca^{++}$  para o citosol.

-DNA- estima-se que o DNA da célula humana está exposto a 10.000 “hits” oxidativos por dia. A oxidação do DNA mitocondrial é maior porque está próximo de onde o radical livre é formado em grandes quantidades. Além do mais, o DNA mitocondrial não tem histonas, que se ligam e protegem o DNA nuclear. O DNA mitocondrial transcreve cerca de 10 proteínas, necessárias às funções da própria mitocôndria. Sugere-se que a alteração do DNA mitocondrial leva a diminuição de produção de energia, e isto seria uma das causas do envelhecimento.

-Altera proteínas das bombas iônicas.

-Peroxidação de lipídios- desorganização de membranas (a reação é autocatalítica, com a molécula atacada tornando-se ativa, formando uma cadeia de reações).

-Admite-se que radicais livres participam da aterosclerose, câncer e envelhecimento.

### Inativação dos radicais livres:

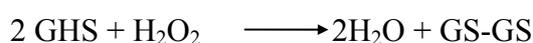
Antioxidantes: vitamina E e  $\beta$ -caroteno. São lipossolúveis e protegem membranas.

Enzimas:

-Superóxido desmutase- transforma superóxido em peróxido de hidrogênio.

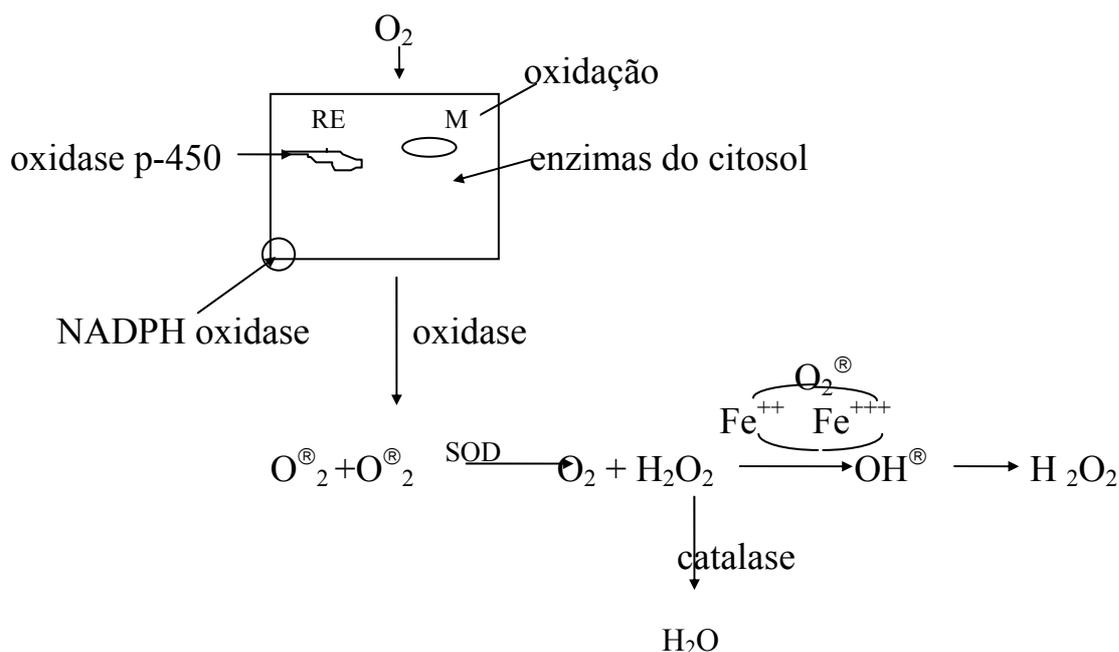
-Catalase, glutatona peroxidase - transformam o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

A glutatona peroxidase catalisa a liberação de H do grupo SH da glutatona reduzida (GSH), que reage com OH ou  $H_2O_2$ .



-Transferrina - se liga a Fe livre, inibindo a reação de Fenton.

Esquema da formação dos principais radicais livres na célula.



Em resumo, o radical livre oxida moléculas de DNA, proteínas e lipídios, num processo comparável ao da ferrugem. Que tal o ditado “estou enferrujado”?

Lesão sub-letal - (inchação turva)

-edema mitocondrial

-edema do RE

-perda de ribossomos

-resposta de estresse

-autofagia de organelas e proteínas alteradas

Morte celular

- perda de nucléolo
- perda de ribossomos
- edema mitocondrial e RE mais intensos
- ruptura de lisossomos
- fragmentação de membranas
- alteração nuclear- picnose, cariólise, cariorrexe

Obs. edema mitocondrial é a alteração inicial, sendo parâmetro de fixação em microscopia eletrônica de transmissão.

#### **Lesão celular por vírus-**

Quanto a forma de causar alterações celulares, os vírus são classificados em citopáticos e oncogênicos. Os citopáticos se multiplicam dentro da célula, usando toda a maquinaria genética desta para sua própria replicação. Neste caso, a célula hospedeira é destruída pelo vírus ou por mecanismos imunológicos, como ocorre na hepatite, AIDS, herpes. Os oncogênicos modificam o genoma celular, integrando-se a este e replicando-se juntamente com todo o genoma da célula hospedeira, podendo facilitar a formação de uma célula neoplásica, dependendo do lugar onde se insere.

**Objetivos - Lesão Celular.**

1. Comente as diferentes respostas da pele pela ação da radiação UV.
2. Cite os quatro sistemas principais da célula, que quando alterados podem levar à morte celular.
3. Comente porque as células cardíacas observadas em microscopia de luz, não mostram alterações morfológicas, num indivíduo que morreu de infarto fulminante.
4. Explique como o cloreto de mercúrio lesa as células, e cite que células são alteradas *in vivo*.
5. Esquematize e explique os efeitos da hipóxia na célula.
6. Explique a participação do Ca na lesão celular.
7. Comente a liberação de enzimas no plasma em casos de hepatite e infarto do miocárdio.
8. Explique que são bombas de Na e Ca?
9. Descreva os aspectos morfológicos da tumefação turva, em microscopia de luz e eletrônica. Pode usar o exemplo dos efeitos do dinitrofenol no rim ou fígado.
10. Conceitue proteínas de choque térmico (“heat shock proteins”) e como atuam nas células que sofreram estímulo lesivo.
11. Conceitue e exemplifique corpúsculos de inclusão.
12. Que são inclusões virais.
13. Que é lipofuscina, como se forma e qual o aspecto em microscopia de luz e eletrônica?
14. Quais as consequências do acúmulo de lipofuscina nas células cardíacas?
15. Conceitue radical livre.
16. Quais são os radicais livres derivados do oxigênio?
17. Justifique porque após um infarto do miocárdio o uso de um inibidor da xantina oxidase por limitar a necrose celular.
18. Explique como o tetracloreto de carbono pode causar lesões nos hepatócitos.
19. Por que DNA mitocondrial é mais vulnerável a ação de radicais livres, do que o DNA nuclear?
20. Que são antioxidantes?
21. Por que a transferrina é considerada antioxidante?
22. Faça uma analogia entre a ação dos radicais livres nas células e o processo de ferrugem.
23. Cite as alterações celulares após um estímulo sub-letal (o aspecto microscópico é de inchação turva).
24. Cite as alterações observadas na morte celular.
25. Comente como os vírus citopáticos e oncogênicos atuam nas células.