

APOPTOSE E REPRODUÇÃO HUMANA

PEDRO A. F. XAVIER

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Hospital de São João/Faculdade de Medicina do Porto. Porto

RESUMO/SUMMARY

A apoptose, um mecanismo fisiológico de morte celular susceptível de regulação, assume uma importância fundamental na homeostasia da generalidade dos tecidos orgânicos, bem como, quando desregulada, na fisiopatologia da maior parte das doenças. Tal acontece no ovário e no útero, dois órgãos fulcrais no fenómeno de reprodução humana. Uma adequada compreensão do papel exercido pela apoptose na regulação da população celular destes dois órgãos e consequentemente na fisiologia da reprodução, poderá permitir no futuro o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da infertilidade. Neste artigo pretende-se fazer uma revisão dos conhecimentos mais recentes relativamente ao fenómeno de apoptose, nomeadamente quanto ao seu envolvimento na fisiologia da reprodução humana.

Palavras-chave: Apoptose, Reprodução Humana, Infertilidade.

APOPTOSIS AND HUMAN REPRODUCTION

Apoptosis is a common form of physiological cell death that is essential to maintain homeostasis in human tissues and when deregulated, explains the physiopathological events in most diseases. This is true both in the ovary and uterus, two essential organs for human reproduction.

The correct understanding of the role that this phenomenon carry out to regulate ovarian and uterine cellular populations and consequently to regulate reproductive physiology, might allow in the future the development of new strategies to treat infertility.

This paper is a review of the current understandings about apoptosis and its involvement in human reproductive physiology.

Key words: Apoptosis, Human Reproduction, Infertility.

INTRODUÇÃO

A importância dos fenómenos de morte celular programada para a homeostasia dos tecidos orgânicos já há muito foi reconhecida, datando de 1885 os primeiros relatos sobre a presença de duas formas diferentes de morte celular¹: o *suicídio celular* ao qual Kerr et al, em 1972, atribuíram o termo *apoptose* e o *homicídio celular* que Majno e Joris, em 1995, chamaram *oncose*^{2-4*}. Em ambos

os casos, as alterações morfológicas resultantes nas células vítimas de qualquer um desses processos representariam os eventos iniciais do mecanismo de morte celular, cujo estágio final seria comum aos dois e designado por *necrose*⁴. Majno e Joris (1995) propuseram assim novos conceito para os termos apoptose, oncose e necrose, não totalmente concordantes com os da generalidade dos autores que continuam a considerar apenas a existência da

apoptose como contraposição à necrose sem contemplar a existência da oncose. Por admitir que a definição de Majno e Joris reflecte, de uma forma mais compreensível, os fenómenos que ocorrem a nível celular, optou-se neste artigo por considerar a existência dos conceitos de apoptose, oncose e necrose.

APOPTOSE VERSUS ONCOSE

A apoptose pode ser distinguida da oncose por critérios morfológicos e bioquímicos bem definidos. Uma diferença importante entre ambas reside no facto de a apoptose atingir, caracteristicamente, células isoladas, ao passo que a oncose afecta grupos celulares. Do ponto de vista morfológico, a oncose é caracterizada pelo aparecimento de entumescimento citoplasmático e dos organelos, vacuolização, vesiculação e aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, com desnaturação e hidrólise proteica. É tipicamente acompanhada de lise nuclear ou *cariólise*, ocorrendo fragmentação do DNA com um padrão não específico⁴. Pelo contrário, na apoptose ocorre uma condensação citoplasmática e nuclear. A cromatina torna-se picnótica e é *empurrada* contra a membrana nuclear originando o típico aspecto navicular ou em “meia-lua” do núcleo. Este sofre fragmentação ou *cariorréxis*, ao mesmo tempo que a célula emite protuberâncias onde, frequentemente, são encontrados os fragmentos nucleares picnóticos. Dessas protuberâncias resultam os *corpos apoptóticos*, totalmente destacados da célula original e com membrana bem definida, em cujo interior se identificam organelos condensados mas intactos, quer química quer estruturalmente, possuindo ainda actividade metabólica². Posteriormente, ocorre a fagocitose desses corpos apoptóticos por outras células. Da fusão entre esses fagossomas assim formados e os lisossomas resultam os corpos residuais lisossómicos já sem actividade metabólica. Este é o estágio terminal de todo o processo, correspondendo à presença de necrose celular, estágio que certos autores designam por *necrose apoptótica*. Do ponto de vista bioquímico, a apoptose caracteriza-se por uma fragmentação do DNA em segmentos específicos^{2, 4}.

A fragmentação nuclear que ocorre durante este processo, é do ponto de vista citológico, o melhor marcador da apoptose, facto que assume importância prática quando se pretende identificar esta forma de morte celular nos diferentes tecidos⁴.

APOPTOSE E SISTEMA IMUNOLÓGICO

Nos tecidos afectados pela ocorrência de morte celular por apoptose pode verificar-se uma significativa redução do número de células com quase nenhuma distorção

arquitectural uma vez que, como atrás foi referido, atinge células isoladas e não grupos celulares. Esta característica de grande selectividade celular resulta na libertação de pequenas quantidades de factores mediadores da inflamação, insuficientes para provocar uma chamada de neutrófilos e linfócitos aos locais da apoptose, mas capazes de promover a fagocitose dos corpos apoptóticos por células vizinhas, tais como os macrófagos tecidulares ou mesmo células epiteliais que, não sendo fagócitos de primeira linha, permitem todavia a *limpeza tecidular* sem recurso aos clássicos mecanismos da inflamação^{2,4}. No entanto, se do ponto de vista quantitativo a participação dos factores mediadores da inflamação nos mecanismos de apoptose é na realidade algo discreta, qualitativamente observa-se um envolvimento de diversos desses factores de que são exemplo as caspases, diferentes citocinas (TNF- α e as interleucinas 1 e 6), vários factores de crescimento celular, e os radicais livres do oxigénio e do óxido nítrico que, como veremos adiante, acabarão por desempenhar um papel importante, não tanto na execução mas fundamentalmente na regulação da apoptose⁵.

APOPTOSE E REGULAÇÃO GENÉTICA

A apoptose como fenómeno regulador da população celular tem um papel complementar do das mitoses, embora com sentido oposto, tal como reconhecido por Gräper em 1914⁶. É um evento para o qual a regulação genética assume importância fulcral, mas que está também sujeito a influências ambientais^{3,4}. Essa regulação genética manifesta-se por mecanismos diferentes de actuação. Dentro de um contexto de desenvolvimento ontogenético, certas células seriam induzidas a cometer suicídio (apoptose) por determinação genética previamente estabelecida, num processo de *morte celular programável*. Por outro lado, no que diz respeito à regulação homeostática, a ausência de factores inibidores da apoptose e como tal favorecedores da sobrevivência celular, ou a presença de factores indutores desse mecanismo de *suicídio celular*, seria a responsável pelo aparecimento de um ímpeto celular para a apoptose⁷⁻⁹. Em ambos os casos, a morte celular ocorre por um mecanismo de suicídio (apoptose) sujeito a um controlo genético, mas apenas no contexto de desenvolvimento ontogenético haveria uma programação pré-estabelecida⁷. Daí que a apoptose se enquadre melhor num conceito de *suicídio celular* ou de *morte celular programável* do que num conceito de *morte celular programada*, uma vez que a sua ocorrência não é inevitável pois necessita de determinadas condições ambientais que se instalam apenas no decurso da vida da célula em questão.

IMPORTÂNCIA DA APOPTOSE NO ORGANISMO HUMANO

O fenómeno da apoptose tem vindo a ganhar um protagonismo crescente na literatura científica mercê da demonstração, cada vez mais evidente, do seu envolvimento na fisiologia de praticamente todos, senão mesmo todos, os sistemas do organismo. O tamanho de uma determinada população celular depende do balanço entre a sua produção e a sua eliminação. A apoptose está envolvida na remodelação fisiológica de muitos tecidos, sendo exemplo disso a renovação celular que ocorre ao nível do fígado e da mucosa gastroduodenal.

É igualmente responsável pela eliminação celular espontânea que ocorre nas neoplasias. Estas, caracterizam-se geralmente pela presença de um grande número de mitoses e de corpos apoptóticos, sendo o balanço entre ambos que determina a taxa de crescimento da lesão. Após tratamento médico de uma neoplasia verifica-se um aumento dos fenómenos de apoptose, podendo esse *índice apoptótico* ser utilizado como uma medida da resposta do tumor ao tratamento².

No desenvolvimento embrionário, a apoptose desempenha um papel vital na eliminação celular necessária ao aparecimento do lúmen das estruturas tubulares, formação das pregas interdigitais e involução dos vestígios filogenéticos². Exerce ainda um papel importante na involução e atrofia de muitos tecidos orgânicos, tal como acontece com o corpo amarelo humano em involução que, caracteristicamente, apresenta numerosos corpos apoptóticos².

Pelo contrário, a desregulação da apoptose está envolvida no aparecimento de numerosos processos patológicos, nomeadamente de certos tumores, infecções víricas, doenças autoimunes e neurodegenerativas, imunodeficiência e infertilidade¹⁰.

IMPORTÂNCIA DA APOPTOSE E DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NA HOMEOSTASIA E PATOLOGIA DO OVÁRIO E DO ENDOMÉTRIO

Os actuais conhecimentos acerca do papel desempenhado pela apoptose e pelo sistema imunológico no aparelho genital feminino, tanto na homeostasia como no aparecimento de fenómenos patológicos, nomeadamente ao nível do ovário e do endométrio, conferem a este campo da investigação uma importância crescente. No futuro, uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na reprodução humana, passará inevitavelmente por um maior investimento científico nesta área.

A maior parte das células germinativas do ovário sofre degenerescência tanto na vida pré-natal como na pós-natal

por um processo de apoptose¹¹. A apoptose parece ser igualmente o mecanismo envolvido na regressão do corpo amarelo e na atresia dos folículos não recrutados para a ovulação em cada ciclo ovário^{12, 13}. O desenvolvimento ou a regressão da população celular no ovário está assim dependente da interacção entre factores favorecedores da sobrevivência celular ou anti-apoptóticos e factores pró-apoptóticos favorecedores da morte celular. Como exemplo do primeiro grupo citam-se determinadas hormonas (estrogéneos, progesterona, gonadotrofinas e hormona de crescimento), citocinas (IL-1) e factores de crescimento (EGF, TGF- α , ILGF-1), ao passo que do segundo grupo fazem parte os androgéneos, as hormonas libertadoras das gonadotrofinas e os seus análogos, certas citocinas (IL-6) e os radicais livres do oxigénio e do óxido nítrico^{5, 8, 9, 14-17}. Tal como já atrás foi referido, é hoje aceite pela generalidade dos autores que a acção destes factores é geneticamente controlada, através da maior ou menor expressão celular de determinados proto-oncogenes.

O envolvimento do sistema imunológico na homeostasia do ovário tem igualmente implicações muito importantes na fisiologia do sistema reprodutor feminino, não se limitando apenas a um mero papel regulador da apoptose e, dessa forma, da população celular gonádica. Ao longo do ciclo ovário, é possível identificar um aumento de células inflamatórias neste órgão¹⁶. Também já foi demonstrado um aumento dos produtos da peroxidação, radicais livres e compostos anti-oxidantes, não só durante a ovulação, mas também na fase implantatária¹⁸. A rotura do folículo na ovulação é considerada uma reacção inflamatória, na qual estão envolvidos os radicais livres produzidos pelo próprio folículo e determinadas citocinas, tal como a IL-1 e o TNF- α que desempenham igualmente um papel fundamental na neovascularização que ocorre durante o desenvolvimento do corpo amarelo¹⁶⁻¹⁸. Na ausência de gravidez, a regressão do corpo amarelo resulta do aparecimento de fenómenos de apoptose das células endoteliais e luteínicas que apresentam, nestas circunstâncias, uma maior expressão de proto-oncogenes favorecedores da morte celular¹⁶. Na presença de gravidez, a luteólise seria evitada por um aumento da expressão, nessas células, de proto-oncogenes com efeito inibidor da apoptose^{19, 20}.

A desregulação deste mecanismo homeostático que tem como fulcro principal a apoptose, conduz inevitavelmente ao aparecimento de disfunção ovária. Tal como sugerido por Homburg e Amsterdam (1998) o síndrome do ovário policístico, principal causa de infertilidade de causa ovulatória, caracteriza-se por uma excessiva expressão de determinados factores de crescimento, tal como o EGF ou

o TGF- α que, como já atrás foi apontado, exercem um papel favorecedor da sobrevivência celular, ou seja inibidor da apoptose. Esta constatação levantou a hipótese do seu envolvimento no bloqueio da atresia folicular, resultando em última instância na acumulação de múltiplos pequenos folículos antrais na periferia do ovário, conferindo-lhe o aspecto característico deste síndrome⁸.

Mas as células ováricas não são as únicas do sistema reprodutor feminino sob influência deste controlo imunológico e genético. O endométrio humano está também sujeito ao mecanismo regulador da sua população celular através da apoptose. Vários estudos têm demonstrado uma maior incidência deste processo de morte celular nas células endometriais durante a fase secretora intermédia e tardia do ciclo menstrual, relacionando-o com o início da descamação menstrual^{17,19-23}. Os proto-oncogenes da família Bcl-2/Bax são responsáveis pelo controlo da apoptose que ocorre no endométrio humano, sendo o proto-oncogene Bax favorecedor da ocorrência de apoptose e o Bcl-2 inibidor desta forma de morte celular. O endométrio normal apresenta uma população de células epiteliais glandulares com imunorreactividade equilibrada para os dois proto-oncogenes durante a fase proliferativa e secretora inicial do ciclo, mas verifica-se uma diminuição da expressão de Bcl-2 na fase secretora tardia e durante o período menstrual, passando então a haver um predomínio da população Bax-positiva. Ficam assim criadas as condições para que ocorra um aumento dos fenómenos de apoptose nestas últimas fases do ciclo¹⁹⁻²³. O óxido nítrico, como factor agonista da apoptose, tem igualmente sido implicado nesse mecanismo, através da demonstração do aumento da sua síntese pelas células endometriais na fase secretora tardia e durante a menstruação, tendo sido identificada uma correlação positiva entre os níveis de óxido nítrico e a apoptose ao longo do ciclo endometrial^{17, 24}.

Tal como ocorre no ovário, também no endométrio a falência destes mecanismos homeostáticos está na origem do aparecimento de doença. Na endometriose, a sobrevivência e proliferação do tecido endometrial ectópico parece estar associada a esta desregulação. No endométrio ectópico, ao contrário do que acontece no endométrio normal, há um predomínio constante da população celular que expressa o proto-oncogene Bcl-2 responsável pela supressão da apoptose. Da mesma forma, a proporção de macrófagos peritoneais Bcl-2 positivos em mulheres com endometriose é significativamente superior à encontrada nas mulheres sem esta doença, nas quais predominam os macrófagos Bax-positivos favorecedores da apoptose. Este mecanismo pode explicar a maior capacidade de sobrevivência quer dos macrófagos peritoneais quer do

tecido endometrial ectópico nas mulheres com endometriose, relativamente ao que acontece nas mulheres sem esta doença²¹.

POSSÍVEIS APLICAÇÕES CLÍNICAS EM INFERTILIDADE DOS CONHECIMENTOS ACTUAIS SOBRE APOPTOSE E IMUNOLOGIA

Uma adequada compreensão do papel exercido pelos mediadores da inflamação, tais como as citocinas e os radicais livres que, juntamente com determinadas hormonas e factores de crescimento, parecem ser responsáveis pela regulação da fisiologia da reprodução através da apoptose, poderá permitir no futuro o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da infertilidade¹⁶.

Também no campo da avaliação do prognóstico das doentes submetidas a técnicas de reprodução medicamente assistida, nomeadamente a FIV, a aplicação desses conhecimentos parece ser promissora. A determinação da incidência de corpos apoptóticos nas células da granulosa dos folículos aspirados durante um ciclo de FIV pode ser um meio utilizado no futuro para estabelecer esse prognóstico^{25, 26}.

A demonstração recente de um maior desenvolvimento do embrião, após adição de anti-oxidantes, tais como a cisteína ou o ácido ascórbico, aos meios de cultura embrionária utilizados nas técnicas de FIV, foi igualmente importante²⁷. Da mesma forma se verificou que a adição a esses meios de cultura da enzima superóxido-dismutase (que catalisa a reacção de dismutação dos radicais superóxido, promovendo desse modo a diminuição dos radicais livres), atenua a reacção de bloqueio do desenvolvimento embrionário que frequentemente se verifica *in vitro*²⁷. Estas constatações sugerem que um deficiente desenvolvimento embrionário *in vitro* pode dever-se ao *stress* oxidativo, ou seja, ao aumento da concentração intracelular das formas activas do oxigénio. O doseamento destas no líquido folicular poderá ser, no futuro, um marcador prognóstico do sucesso da FIV e a adição de anti-oxidantes aos meios de cultura utilizados nessa técnica, uma forma de melhorar os resultados da mesma.

Está actualmente estabelecido um padrão de distribuição da apoptose no endométrio de mulheres saudáveis e de mulheres com endometriose. Esse conhecimento pode servir para estabelecer uma correlação entre os padrões de incidência de apoptose encontrados no endométrio de mulheres com infertilidade e os resultados da FIV.

A difícil tarefa de tornar possível a utilização prática destes conhecimentos no estudo e tratamento de doentes

com problemas de infertilidade, só poderá ser uma realidade se mais estudos científicos nesta área forem levados a cabo no futuro.

BIBLIOGRAFIA

1. FLEMMING W: Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel. Arch Anat EntwGesch 1885; 221-44
2. KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR: Apoptosis - a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-57
3. KANE AB: Redefining Cell Death. Am J Pathol 1995;146:1-2
4. MANJO G, JORIS I: Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. Am J Pathol 1995; 146: 3-15
5. KARBOWSKI M, KURONO C, WOZNIAK M, OSTROWSKI M, TERNISHI M, NISHIZAWA Y et al: Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. Free Radic Biol Med 1999 Feb; 26(3-4): 396-409
6. GRÄPER L: Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung. Arch Zellforsch 1914; 12: 373-94
7. BOWEN ID: Apoptosis or programmed cell death? Cell Biol Int 1993;17:365-80
8. HOMBURG R, AMSTERDAM A: Polycystic ovary syndrome: loss of the apoptotic mechanism in the ovarian follicles? J Endocrinol Invest 1998 Oct; 21(9): 552-7
9. KIESS W, GALLAHER B: Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. Eur J Endocrinol 1998 May; 138(5):482-91
10. RINKENBERGER JL, KORSMEYER SJ: Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. Curr Opin Genet Dev 1997 Oct; 7(5): 589-96
11. DE POL A, MARZONA L, VACCINA F, NEGRO R, SENA P, FORABOSCO A: Apoptosis in different stages of human oogenesis. Anticancer Res 1998 Sep-Oct; 18(5-A): 3457-61
12. MURDOCH WJ: Inhibition by oestradiol of oxidative stress-induced apoptosis in pig ovarian tissues. J Reprod Fertil 1998 Sep; 114(1): 127-30
13. CHUN SY, HSUEH AJ: Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. J Reprod Immunol 1998 Aug; 39(1-2): 63-75
14. HSUEH AJ, EISENHAEUER K, CHUN SY, HSU SY, BILLIG H: Gonadal cell apoptosis. Recent Prog Horm Res 1996;51:433-55
15. BILLIG H, CHUN SY, EISENHAEUER K, HSUEH AJ: Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. Hum Reprod Update 1996 Mar-Apr; 2(2): 103-17
16. VIATIER D, DUFOUR P, TORDJEMAN-RIZZI, PROLONGEAU JF, DEPRET-MOSER S, MONNIER JC: Immunological aspects of ovarian function: role of the cytokines. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1995 Dec; 63(2): 155-68
17. TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C, UNFRIED G, BRAUTIGAM G, WISER F, CZERWENKA K et al: The role of nitric oxide in reproduction. Gynakol Geburtshilfliche Rundsch 1998; 38(1): 44-6
18. REYES DG, MELENDEZ GMR, GOMEZ HJJ: Importance of free radicals during the reproduction cycle. Ginecol Obstet Mex 1998 Sep; 66: 371-6
19. SHIKONE T, KOKAWA K, YAMOTO M, NAKANO R: Apoptosis of human ovary and uterine endometrium during the menstrual cycle. Horm Res 1997;48 Suppl 3: 27-34
20. VON RANGO U, CLASSEN-LINKE I, KRUSCHE CA, BEIER HM: The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. Hum reprod 1998 Nov; 13(11): 3177-89
21. MCLAREN J, PRENTICE A, CHARNOCK-JONES DS, SHARKEY AM, SMITH SK: Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. Hum Reprod 1997 Jan; 12(1): 146-52
22. OTSUKI Y, MISAKI O, SUGIMOTO O, ITO Y, TSUJIMOTO Y, AKAO Y: Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. Lancet 1994 Jul 2; 344(8914): 28-9
23. GOMPEL A, SABOURIN JC, MARTIN A, YANEVA H, AUDOUIN J, DECROIX Y et al: Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. Am J Pathol 1994 Jun; 144(6): 1195-202
24. TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C, UNFRIED G, BRAUTIGAM G, STONEK F, WISER F et al: Elevation of inducible nitric oxide synthase activity in human endometrium during menstruation. Biol Reprod 1999 Feb; 60(2): 297-304
25. NAKAHARA K, SAITO H, SAITO T, OHTA N, ITO M, TEZUKA N et al: Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 1997; 67: 302-8
26. NAKAHARA K, SAITO H, SAITO T, ITO M, OHTA N, TAKAHASHI T et al: The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. Fertil Steril 1997; 68: 312-7
27. NODA Y: Evaluation of environmental factors affecting embryo development in vitro. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 1992 Aug; 44(8): 960-70

* O termo apoptose é utilizado na linguagem Grega para descrever a "queda das pétalas das flores ou das folhas das árvores", tendo Kerr sugerido um reforço na penúltima sílaba da palavra para acentuar o termo ptosis que tem a mesma origem semântica e o significado "queda".