

LIBERTAÇÃO DE CITOCROMO *c* POR INTERACÇÃO DA BILIRRUBINA, DO β -AMILÓIDE E DO GLICOQUENODESOXICOLATO COM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS¹

SUSANA SOLÁ, MARIA JOSÉ DIÓGENES, DORA BRITES, CECÍLIA M.P. RODRIGUES
Centro de Patogénese Molecular, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

RESUMO/SUMMARY

A acumulação de compostos citotóxicos pode estar envolvida na patogénese de algumas afecções, como sejam a encefalopatia bilirrubínica, a doença neurodegenerativa de Alzheimer ou a colestase, onde parece provocar morte celular por apoptose. Sabe-se, também, que a mitocôndria é responsável pela execução de etapas fulcrais no mecanismo de apoptose, nomeadamente, a libertação de factores activadores das capases. Este estudo pretende: (a) investigar o envolvimento da mitocôndria durante o processo apoptótico iniciado pela bilirrubina (Bb) não conjugada, pelo péptido β -amilóide (β A) ou pelo glicoquenodesoxicolato (GQDC); (b) caracterizar as alterações estruturais induzidas pelos mesmos tóxicos em mitocôndrias isoladas e determinar se as mesmas são acompanhadas de redistribuição do citocromo *c*. Isolaram-se mitocôndrias do fígado e do cérebro de rato e avaliou-se, quer o volume mitochondrial, quer a libertação de citocromo *c*, recorrendo a técnicas de

BILIRUBIN, AMYLOID β -PEPTIDE, AND GLYCOCHENODEOXYCHOLATE DIRECTLY INDUCE CYTOCHROME C RELEASE FROM ISOLATED MITOCHONDRIA

The pathogenesis of cholestasis, bilirubin encephalopathy, and Alzheimer's disease appears to result from accumulation of diverse cytotoxic agents, which in turn may cause apoptotic cell death. In addition, mitochondria has lately been considered as a central executioner of programmed cell death, through the release of caspase activating factors. The aims of this study were to: (a) investigate mitochondrial perturbation during incubation of isolated mitochondria with unconjugated bilirubin (Bb), amyloid β -peptide (A β), and glycochenodeoxycholate (GCDC); (b) characterize membrane perturbation in isolated mitochondria induced by each toxic agent, and

¹ Parte deste artigo foi publicado sob a forma de resumo no *Journal of Hepatology* [J Hepatol 2000; 32: 40A] e apresentado oralmente no 35º Congresso Anual da *European Association for the Study of the Liver*, realizado em Roterdão, em Abril de 2000.

Este trabalho foi financiado pelo projecto de investigação PRAXIS/C/SAU/14311/1998, da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

espectrofotometria e de *western blot*, respectivamente. Os resultados demonstraram que tanto a Bb como o β A e o GQDC actuavam directamente sobre a mitocôndria, provocando, para além de um aumento marcado do seu volume ($P < 0,01$) devido a permeabilização membranar, a libertação de citocromo *c* do espaço intermembranar ($P < 0,01$), por um processo que depende da intensidade do estímulo aplicado. É, ainda, de referir que a ciclosporina A inibiu a permeabilidade mitocondrial, sendo tal protecção mais marcada na presença de Bb e de GQDC ($P < 0,01$). A libertação de citocromo *c* foi sempre impedida pelo uso de ciclosporina A ($P < 0,05$). Em conclusão, os resultados indicam que a toxicidade da Bb, do β A e do GQDC na indução da apoptose, pode resultar de uma elevação da permeabilidade mitocondrial, seguida de libertação do citocromo *c*, efeito que aparenta depender da abertura do mega-poro de transição da permeabilidade mitocondrial.

Palavras-chave: apoptose, bilirrubina não conjugada, citocromo c, glicoenodesoxicolato, péptido β -amilóide, permeabilidade mitocondrial

determine whether the mitochondrial permeabilization is required for cytochrome *c* redistribution. Mitochondria were isolated from rat liver and brain. Swelling and cytochrome *c* release were evaluated by spectrophotometry and western blot, respectively. The results showed that Bb as well as A β and GQDC act directly at the mitochondrial level causing increased organelle volume, permeabilization, as well as cytochrome *c* release from the intermembrane space in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Moreover, cyclosporine A inhibited mitochondrial permeability, particularly after Bb- and GQDC-induced swelling ($P < 0.01$). Cytochrome *c* efflux was invariably prevented by cyclosporine A ($P < 0.05$). In conclusion, the results indicate that Bb-, A β -, and GQDC-induced toxicity, culminating in apoptosis, may result from enhanced mitochondrial permeability, followed by cytochrome *c* efflux, which can be explained at least in part by the megapore opening.

Key words: amyloid β -peptide, apoptosis, cytochrome c, glicochenodesoxicolate, mitochondrial permeability, unconjugated bilirubin

INTRODUÇÃO

A morte celular por apoptose é importante tanto na remoção de células lesadas, como durante o processo de envelhecimento. É, ainda, necessária durante o desenvolvimento embrionário, como seja o do sistema nervoso central, contribuindo para a formação apropriada de vários órgãos e estruturas, bem como na manutenção do sistema imunológico¹⁻⁵. Quando esta forma de morte celular não funciona na perfeição, uma diminuta apoptose pode originar algumas situações patológicas, como o cancro e as doenças auto-imunes. Pelo contrário, a apoptose aumenta durante a colestase, as doenças neurodegenerativas, o enfarte do miocárdio e o envelhecimento precoce.

A acumulação de compostos citotóxicos, como a bilirrubina (Bb) não conjugada, o péptido β -amilóide (β A) e os ácidos biliares hidrófobos pode, de acordo com estudos anteriores, estar envolvida na patogénese de algumas afecções, como é o caso da encefalopatia bilirrubínica, da doença neurodegenerativa de Alzheimer e da colestase, respectivamente. Concentrações elevadas daqueles compostos no cérebro ou no fígado originam a morte celular por apoptose sendo, portanto, lesivas para estes órgãos⁶⁻⁹.

A apoptose, por vezes também designada de *morte celular programada*, caracteriza-se pelo aparecimento de várias alterações morfológicas nas células afectadas, sobretudo ao nível da simetria dos folhetos fosfolipídicos da membrana, condensação e agregação da cromatina e fragmentação nuclear, terminando com a formação de corpos apoptóticos. Estas alterações morfológicas resultam de uma sucessão de acontecimentos que culmina na activação de uma família de proteases de cisteína, conhecidas como caspases, as quais ao degradarem os substratos respectivos originam a morte da célula¹⁰.

A mitocôndria é um organito que parece desempenhar um papel central durante a morte celular em vários sistemas e segundo numerosas vias, como por exemplo através da libertação do citocromo *c* para o citoplasma, alteração do transporte de electrões, perda do potencial transmembranar e alteração do potencial de oxi-redução celular. De facto, pensa-se hoje que a mitocôndria seja responsável por uma grande variedade de eventos chave, tanto na indução como na supressão da apoptose^{11,12}.

A mitocôndria, sob a acção de estímulos diversos, como sejam a proteína pro-apoptótica Bax, os agentes oxidantes, os iões cálcio, as caspases activas e outros compostos tóxicos, como os ácidos biliares hidrófobos, origina a

libertação de factores proteicos activadores das caspases, nomeadamente o citocromo *c* e o factor indutor da apoptose. Até hoje, propuseram-se dois mecanismos gerais para explicar o efluxo daqueles factores. O primeiro, pressupõe a ocorrência de um desequilíbrio osmótico na mitocôndria, por abertura de mega-poros, levando a uma expansão da matriz, aumento do volume e conseqüente ruptura da membrana externa. O segundo, prevê a abertura de pequenos canais na membrana externa, sem que ocorra aumento do volume do organito. Qualquer que seja o mecanismo envolvido na saída de citocromo *c*, acontece que este ao ser libertado activa as caspases que normalmente existem como pro-enzimas, as quais iniciam uma sucessão de acontecimentos que culminam na fragmentação nuclear¹². Por outro lado, as caspases podem ainda diminuir o potencial transmembranar e aumentar o volume mitocondrial, criando um *loop* de amplificação. As células que sofreram ruptura da membrana plasmática ficam, também, em risco de morte por um mecanismo lento, não apoptótico, que conduz à necrose celular por perda do gradiente electroquímico da membrana interna mitocondrial, produção de radicais de oxigénio e diminuição da produção de ATP.

O modelo que sugere a ruptura da membrana externa da mitocôndria propõe a abertura de um mega-canal, designado por poro de transição da permeabilidade mitocondrial, que leva ao colapso do potencial transmembranar da mitocôndria. Alguns estudos indicam que, quer a libertação do citocromo *c*, quer a activação das caspases possa ocorrer independentemente e antes de que alguma despolarização seja detectável. No entanto, os inibidores da abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, como a ciclosporina A, parecem ser capazes de bloquear a apoptose em certos sistemas^{13,14}.

Neste estudo pretendeu-se: (a) investigar o envolvimento da mitocôndria durante o processo apoptótico iniciado pela Bb não conjugada, pelo péptido β A ou pelo glicoquenodesoxicolato (GCDC), um ácido biliar com características hidrófobas; (b) caracterizar as alterações estruturais induzidas pelos mesmos tóxicos em mitocôndrias isoladas e averiguar se são acompanhadas de redistribuição do citocromo *c*.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e purificação das mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas a partir de fígado ou de cérebro de ratos Wistar (200-300 g), de acordo com o descrito anteriormente^{15,16}. Os ratos foram sacrificados após anestesia com éter, sendo o fígado e o cérebro

removidos e imediatamente colocados em tampão de homogeneização (sacarose a 70 mM, manitol a 220 mM, EGTA a 1mM e HEPES a 10 mM, pH 7,4). Procedeu-se, então, à sua fragmentação e homogeneização sendo o homogeneizado colocado em tubos cónicos de 50 mL e centrifugado a 600 g, durante dez minutos, à temperatura de 4°C, usando uma centrífuga Sigma 3K 30 (B. Braun-Biotech, Inc., Allentown, Pennsylvania, USA). O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 7 000 g, durante dez minutos, a 4°C. O precipitado constituído pelas mitocôndrias foi ressuscitado em 2 mL de tampão de homogeneização e cuidadosamente colocado no topo de um gradiente contendo sacarose a 0,25 M e EGTA a 1 mM, para além de Percoll (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, USA), na proporção de 75:25 (v/v). As mitocôndrias foram purificadas por centrifugação a 43 000 g, durante dez minutos, a 4°C, usando a mesma centrífuga. A camada inferior foi ressuscitada em 20 mL de tampão de lavagem (KCl a 0,1 M, ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfónico (MOPS) a 5 mM e EGTA a 1 mM, pH 7,4) e a suspensão centrifugada a 7 000 g, durante dez minutos, a 4°C. O precipitado resultante foi lavado por ressuspensão em tampão de lavagem, repetindo-se este procedimento mais duas vezes. O sedimento foi retomado em tampão de lavagem sem EGTA, tratado previamente com resina Chelex-100 (100-200 mesh, forma sódica; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), na proporção de 1 g de Chelex para 100 mL de tampão. O precipitado final foi, então, ressuscitado em 1,5 mL de tampão de suspensão (sacarose a 125 mM, KCl a 50 mM, HEPES a 5 mM e KH_2PO_4 a 2 mM), igualmente tratado com resina Chelex-100, na proporção já antes mencionada. Os ensaios com as mitocôndrias decorreram sempre durante as três horas que se sucederam ao seu isolamento e purificação. O trabalho foi realizado segundo as normas em vigor em Portugal, quanto à utilização experimental de animais de laboratório.

Avaliação do volume da mitocôndria

O volume mitocondrial foi determinado espectrofotometricamente, por leitura da absorvência da suspensão de mitocôndrias em 540 nm, partindo do pressuposto de que um aumento do volume do organito se traduz num decréscimo da densidade óptica. As mitocôndrias isoladas (0,1 g de proteína/mL) foram ressuscitadas em tampão de respiração (HEPES a 10 mM, succinato a 10 mM, manitol a 215 mM e sacarose a 71 mM, pH 7,4) tratado com Chelex-100. Os valores basais da absorvência da suspensão mitocondrial foram medidos a 25°C, durante cinco minutos. Procedeu-se, de seguida, à incubação com Bb não conjugada (0,9, 2,1, 4,3, 8,6 e 17,1

μM), com péptido βA (62 e 125 μM) e com GQDC (50, 100, 200, 500 e 1000 μM), medindo a absorvência da suspensão durante mais cinco minutos. Em estudos paralelos, as mitocôndrias foram pré-incubadas com ciclosporina A a 5 μM (Sigma Chemical, Co.), durante cinco minutos, antes do início dos ensaios com os agentes tóxicos. A adição de ciclosporina A teve por objectivo determinar se o eventual aumento de volume da mitocôndria seria resultante da abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, uma vez que a ciclosporina A é conhecida como um inibidor da abertura daquele mega-poro específico.

Determinação de citocromo *c*

As proteínas presentes nas mitocôndrias e libertadas para o meio no final da incubação com os diversos agentes tóxicos, foram separadas por electroforese levada a efeito em gel de SDS-poliacrilamida a 15%. Seguidamente, procedeu-se à transferência electroforética de tais proteínas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada, sucessivamente, com um anticorpo primário monoclonal para o citocromo *c* (PharMingen, San Diego, CA, USA) e com um anticorpo secundário conjugado com a peroxidase (Bio-Rad Laboratories). A detecção da banda correspondente ao citocromo *c* foi feita através do sistema ECL[®] da Amersham Life Science, Inc. (Arlington Heights, IL, USA).

Análise estatística

Para cada parâmetro estudado foram calculados a média e o erro padrão da média (SEM). O tratamento estatístico dos dados foi feito recorrendo ao teste *t* de Student, sendo o resultado estatisticamente significativo quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bilirrubina, o péptido β -amilóide e o glicoenodesoxicolato aumentam a permeabilidade membranar em mitocôndrias isoladas

A mitocôndria parece estar envolvida na apoptose resultante de diversos estímulos, como sejam a proteína pro-apoptótica Bax, os agentes oxidantes, os íons cálcio e as caspases activas, entre outros^{11,12,17,18}. Para esclarecer o papel da mitocôndria no processo apoptótico induzido pelos compostos em estudo neste trabalho procedeu-se à avaliação da integridade da membrana deste organito, após seu isolamento e purificação. A permeabilidade da membrana mitocondrial foi avaliada por espectrofotometria, após incubação das mitocôndrias isoladas com Bb, péptido βA e GQDC. Após o período inicial de 5 minutos, durante o

qual se atingiu uma certa estabilidade na absorvência da suspensão de mitocôndrias, procedeu-se à adição dos agentes tóxicos. Verificou-se, para todos os indutores de apoptose utilizados, uma diminuição significativa das densidades ópticas em 540 nm, ao longo dos 5 minutos que se sucederam à adição dos agentes tóxicos (Fig. 1A, 2A e 3A). De facto, tanto a Bb, como o βA e o GQDC, provocaram uma redução marcada na absorvência das suspensões mitocondriais, mesmo para a menor concentração ensaiada, com a qual se obteve, respectivamente, diminuições da ordem dos 7,9, 15,1 e 29,8%. Quando se utilizaram concentrações crescentes de Bb observou-se que estas originavam uma redução proporcional na densidade óptica, à excepção do ensaio para a concentração de 17,1 μM , no qual se verificou um decréscimo ligeiramente inferior ao obtido com a de 8,6 μM . Esta diminuição da densidade óptica proporcional ao aumento das concentrações, foi, igualmente, verificada nos ensaios conduzidos com o βA e o GQDC.

Uma vez que se sabe existir uma relação inversa entre a densidade óptica e o volume mitocondrial determinou-se, em seguida, a percentagem de aumento do volume mitocondrial no decorrer dos 5 minutos que se sucederam à adição do agente apoptótico (Fig. 1B, 2B e 3B). Assim sendo, verificou-se não só que a incubação das mitocôndrias com todos os agentes tóxicos em estudo resultava num aumento do volume mitocondrial, mas também que a elevação das concentrações de Bb, βA e GQDC induzia um aumento de volume proporcional à concentração usada. Utilizando uma concentração de Bb de 0,9 μM obteve-se um aumento de aproximadamente 8% no volume mitocondrial, relativamente ao de 2% verificado no controlo ($P < 0,01$). Curiosamente, a concentração de 17,1 μM de Bb originou um aumento de volume da mitocôndria ligeiramente inferior ao da concentração de 8,6 μM (43% versus 48%). Para tal, poderá ter contribuído o facto de concentrações elevadas de Bb serem de difícil solubilização aquosa, o que poderá ter originado a formação de precipitados do pigmento e, conseqüentemente, sua menor interacção com a membrana. De notar que o aumento do volume mitocondrial por acção do péptido βA , quando na sua maior concentração, foi cerca de 12 vezes superior ao verificado no controlo ($P < 0,01$). Quanto ao GQDC, as alterações obtidas no volume mitocondrial foram igualmente bastante importantes, observando-se para a menor concentração ensaiada um aumento de quase 30%, enquanto que concentrações de 1000 μM originaram uma percentagem máxima de 78%.

As observações acima descritas apontam para um efeito directo da Bb, do péptido βA e do GQDC a nível da mem-

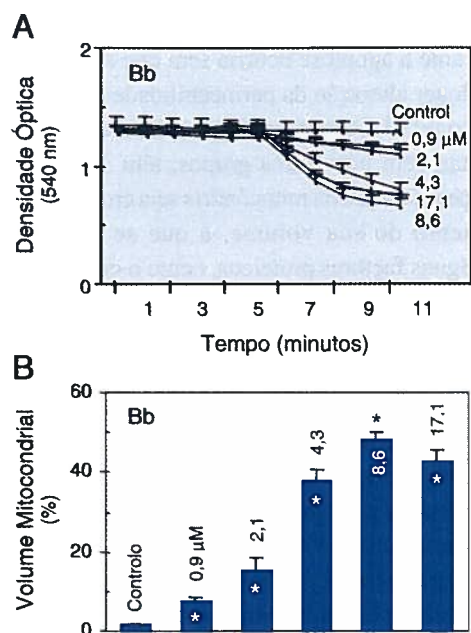


Fig - 1. Aumento da permeabilidade membranar induzido por acção directa de bilirrubina (Bb) não conjugada sobre mitocôndrias isoladas. A adição de Bb a várias concentrações (0,9, 2,1, 4,3, 8,6 e 17,1 μ M) às mitocôndrias, mantidas em tampão de respiração durante 5 minutos, decorreu de acordo com o descrito em Material e Métodos. (A) Variação da densidade óptica (em 540 nm) de uma suspensão mitocondrial, durante 10 minutos. (B) Percentagem de alteração do volume mitocondrial durante os 5 minutos seguintes à adição de Bb não conjugada. Os resultados encontram-se representados sob a forma de média \pm SEM, de pelo menos três experiências diferentes. * $P < 0,01$ vs. controlo.

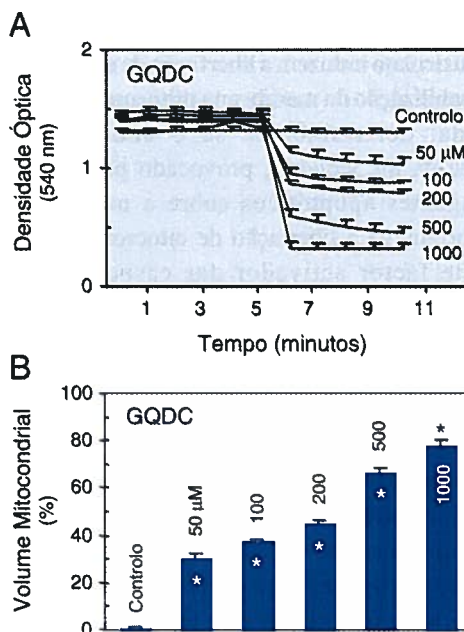


Fig - 3. Aumento da permeabilidade membranar induzida por acção directa de glicoquenodexicolato (GQDC) sobre mitocôndrias isoladas. A adição de GQDC a várias concentrações (50, 100, 200, 500 e 1000 μ M) às mitocôndrias, mantidas em tampão de respiração durante 5 minutos, decorreu de acordo com o descrito em Material e Métodos. (A) Variação da densidade óptica (em 540 nm) de uma suspensão mitocondrial, durante 10 minutos. (B) Percentagem de alteração do volume mitocondrial durante os 5 minutos seguintes à adição de GQDC. Os resultados encontram-se representados sob a forma de média \pm SEM, de pelo menos três experiências diferentes. * $P < 0,01$ vs. controlo.

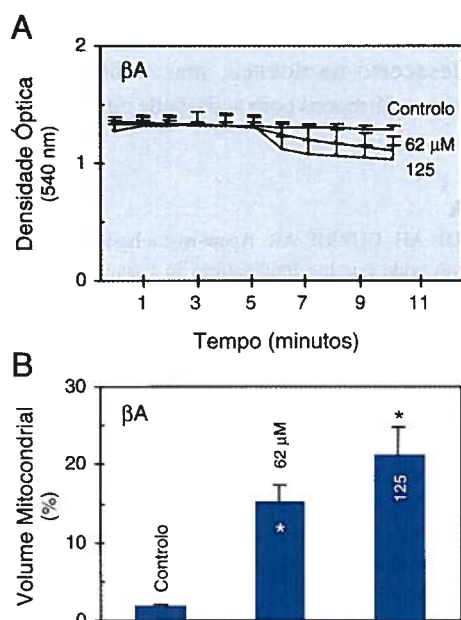


Fig - 2. Aumento da permeabilidade membranar induzida por acção directa do péptido β -amilóide (β A) sobre mitocôndrias isoladas. A adição de β A nas concentrações de 62 e 125 μ M às mitocôndrias, mantidas em tampão de respiração durante 5 minutos, decorreu de acordo com o descrito em Material e Métodos. (A) Variação da densidade óptica (em 540 nm) de uma suspensão mitocondrial, durante 10 minutos. (B) Percentagem de alteração do volume mitocondrial durante os 5 minutos seguintes à adição de péptido β A. Os resultados encontram-se representados sob a forma de média \pm SEM, de pelo menos três experiências diferentes. * $P < 0,01$ vs. controlo.

brana mitocondrial, que consiste num aumento assinalável da permeabilidade, o que só por si poderá ser suficiente para desencadear um processo apoptótico. Já anteriormente fora sugerido que o efeito tóxico daquelas substâncias resultaria em perturbações da função mitocondrial, nomeadamente através de um desequilíbrio da fosforilação oxidativa, mas só agora se estabelece uma relação causal entre o aumento da permeabilidade membranar da mitocôndria e a morte celular por apoptose.

Na tentativa de esclarecer o mecanismo responsável pelo aumento de volume da mitocôndria usou-se a ciclosporina A, conhecida como um inibidor específico da abertura do mega-poro de transição da permeabilidade mitocondrial. Verificou-se que a toxicidade da Bb e do GQDC pode, em parte, ser explicada pela abertura do mega-poro, uma vez que a ciclosporina A inibiu em quase 50% ($P < 0,01$) o aumento do volume mitocondrial induzido por aqueles agentes tóxicos. Pelo contrário, a expansão da matriz mitocondrial pelo péptido β A parece ter sido induzida por um mecanismo que, maioritariamente, não envolve o poro de transição da permeabilidade mitocondrial.

A bilirrubina, o péptido β -amilóide e o glicoquenodesoxicolato induzem a libertação de citocromo *c* após a permeabilização da membrana mitocondrial

De seguida, determinou-se se o aumento da permeabilidade da mitocôndria, provocado pela acção directa dos agentes apoptóticos sobre a membrana mitocondrial originava a libertação de citocromo *c*. A pesquisa deste factor activador das caspases, nas mitocôndrias e no meio de incubação, após adição de Bb, A β e GQDC foi efectuada por *western blot*. A análise dos resultados evidenciou que havia libertação de citocromo *c* durante a incubação de mitocôndrias com qualquer dos agentes tóxicos em estudo, sendo tal efluxo proporcionalmente dependente da concentração utilizada (Fig. 4). A diminuição da proteína de 15 kDa, correspondente ao peso molecular do citocromo *c*, a nível mitocondrial fez-se acompanhar por um aumento da mesma proteína no meio de incubação, o que comprova o seu envolvimento no mecanismo proposto. Em conformidade, nas mitocôndrias controlo não se detectou qualquer libertação de citocromo *c*, o que sugere ser a permeabilização da membrana mitocondrial um acontecimento indispensável à libertação do factor activador das caspases. Finalmente, a adição de ciclosporina A ao meio de incubação preveniu, em aproximadamente 50% ($P < 0,01$), a redistribuição de citocromo *c* induzida tanto pela Bb, como pelo GQDC, sendo ainda capaz de reduzir, em cerca de 30% ($P < 0,05$), a acção do péptido A β . Se o aumento do volume mitocondrial induzido pelo A β se demonstrou ser devia essencialmente à abertura de poros não específicos, tal não aconteceu com a libertação de citocromo *c*, a qual aparentou depender do mega-poro de transição da permeabilidade mitocondrial.

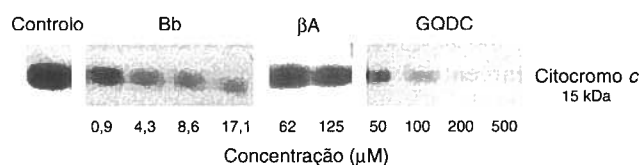


Fig - 4. Diminuição de citocromo *c* (15 kDa) na mitocôndria por permeabilização membranar induzida por acção directa da bilirrubina (Bb) não conjugada, do péptido β -amilóide (β A) e do glicoquenodesoxicolato (GQDC). O teor de citocromo *c* foi determinado por *Western blot*, de acordo com o descrito em *Material e Métodos*.

A libertação de citocromo *c*, responsável pela activação de caspases é um acontecimento comum no mecanismo de apoptose induzido por vários agentes tóxicos, tendo sido explicada por processos que, ainda hoje, são muito controversos^{19,20}. Em estudos recentes, sugeriu-se que a

redistribuição de citocromo *c* da mitocôndria para o citoplasma durante a apoptose ocorria sem que se tivesse verificado qualquer alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial^{20,21}. Pelo contrário, trabalhos realizados por nós, mas também por outros grupos, têm apontado para que a permeabilização da mitocôndria seja crucial para que haja aumento do seu volume, a que se segue a libertação de alguns factores proteicos, como o citocromo *c*^{17,23-25}. O presente estudo vem corroborar este último mecanismo.

Em suma, os resultados obtidos sugerem que a citotoxicidade da Bb não conjugada, do péptido β A e do GQDC se deve à capacidade exibida por estes agentes para causar profundas alterações estruturais em mitocôndrias isoladas, que passam pelo aumento da permeabilidade membranar. Apenas a Bb e o GQDC parecem actuar através do mega-poro de transição da permeabilidade mitocondrial, uma vez que a permeabilidade membranar é inibida pela ciclosporina A, enquanto que o β A provoca essencialmente a abertura de poros não específicos. A redistribuição de citocromo *c*, invariavelmente impedida pela ciclosporina A, antes sugere que a libertação daquele factor proteico ocorre através de um canal específico de maiores dimensões.

O conhecimento do modo como a mitocôndria se encontra envolvida na apoptose será um contributo importante, não só na compreensão dos processos fisiológicos normais de morte celular, bem como na sua regulação ou desacerto na doença, mas também na investigação de novos fármacos com actividade citotóxica, ou citoprotectora.

BIBLIOGRAFIA

1. KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57
2. WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306
3. COLUMBANO A: Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* 1995; 58: 181-90
4. JACOBSON MD, WEIL M, RAFF MC: Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-54
5. BRILL A, TORCHINSKY A, CARP H, TODER V: The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 512-9
6. BARINAGA M: Is Apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* 1998; 281: 1303-4
7. MILLER LJ, MARX J: Apoptosis. *Science* 1998; 281: 1301
8. RODRIGUES CMP, STEER CJ: Mitochondrial membrane perturbation in cholestasis. *J Hepatol* 2000; 32: 135-41
9. SILVA RF, RODRIGUES CMP, BRITES D: Bilirubin-induced apoptosis in astrocytes is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 2000; 34: 402-8

10. THORNBERRY NA, LAZEBNIC Y: Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6
11. KROEMER G, ZAMZAMI N, SUSIN SA: Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18: 44-51
12. GREEN DR, REED JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-12
13. IMBERTI R, NIEMINEN AL, HERMAN B, LEMASTERS JJ: Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by *t*-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265: 392-400
14. PASTORINO JG, SNYDER JW, SERRONI A, HOEK JB, FARBER JL: Cyclosporine and carnitine prevent the anoxic cell death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1993; 268: 13791-8
15. BOTLA R, SPIVEY JR, AGUILAR H, BRONK SF, GOES GJ: Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 930-8
16. RODRIGUES CMP, FAN G, WONG PY, KREN BT, STEER CJ: Ursodeoxycholic acid modulates mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production in bile acid-induced apoptosis. *Mol Med* 1998; 4: 165-78
17. RODRIGUES CMP, MA X, LINEHAN-STIEERS C, FAN G, KREN BT, STEER CJ: Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome *c* release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ* 1999; 6: 842-54
18. RODRIGUES CMP, FAN G, MA X, KREN BT, STEER CJ: A novel role of ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998; 101: 2790-9.
19. KIM CN, WANG X, HUANG Y et al: Overexpression of Bcl-X_L inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome *c* and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 1997; 57: 3115-20
20. KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMYER DD: The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-6
21. YANG J, LIU X, BHALLA K et al: Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-32
22. BOSSY-WETZEL E, NEWMYER DD, GREEN DR: Mitochondrial cytochrome *c* release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998; 17: 37-49
23. ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M et al: Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 1996; 384: 53-7
24. KROEMER G: The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3: 614-20
25. SUSIN AS, LORENZO HK, ZAMZAMI N et al: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-6.