

AUTOFAGIA PARA A SOBREVIVÊNCIA

A manipulação da autodigestão celular inspira novas estratégias para combater doenças

CARLOS FIORAVANTI

Somos todos autofágicos – e isso é bom. A todo momento nossas células se digerem e se renovam, desfazendo e reaproveitando proteínas, por meio de um mecanismo biológico chamado autofagia. Vista antes apenas como um processo de morte celular, essa forma de autodestruição seletiva de componentes celulares mostra-se agora como um artifício de sobrevivência dos organismos – só quando não há mais conserto possível é que as células se apagam. Como aparentemente pode ser acelerada ou retardada, a autofagia tornou-se uma estratégia nova para combater doenças e prolongar a vida das células, cujo interior deve guardar tanto movimento quanto os quadros do artista plástico Jackson Pollock.

De imediato, a autofagia está abrindo perspectivas de aplicações novas para velhos medicamentos. Por exemplo, o lítio, usado para tratar pessoas com transtorno bipolar de humor, marcado por saltos repentinos da euforia à depressão profunda, pode ser útil para deter o mal de Alzheimer, uma forma de degeneração dos neurônios que tende a se agravar com o envelhecimento. A cloroquina, além de aplacar a malária, pode ajudar a combater tumores. A rapamicina, antibiótico usado para evitar a rejeição de órgãos transplantados, prolongou a longevidade de um grupo de camundongos, em comparação com outro grupo, que seguiu o curso normal do envelhecimento.

“Estabelecer a segurança de usos e acertar as dosagens de novas aplicações de medicamentos já aprovados é bem mais fácil do que começar tudo do zero”, argumenta Soraya Soubhi Smaili, professora da Universidade Federal de São Paulo

Jackson
Pollock,
Number 3,
1949: *Tiger*



A AUTOFAGIA TEM UM PAPEL DUPLO: AJUDA A SOBREVIVER E A ELIMINAR CÉLULAS DE TODO TIPO, SAUDÁVEIS OU TUMORAIS

(Unifesp), à frente de um dos poucos grupos de pesquisa nessa área no país. Cláudia Bincchetto, também professora da Unifesp e pesquisadora da equipe de Soraya, mostrando por que essa estratégia de busca de novos remédios poderia ser conveniente para países de recursos financeiros limitados como o Brasil, acrescenta: “Drogas novas são muito mais caras que as mais antigas”.

Também há espaço para a pesquisa de remédios novos. Na Unifesp, Cláudia estuda os efeitos promissores de compostos derivados do elemento químico paládio sobre a autofagia como forma de combater tumores. Ela tem verificado que a possibilidade de regular a autofagia por meio de compostos químicos pode ser um caminho para aumentar a eficiência de compostos antitumorais, diminuindo a dosagem e os efeitos indesejados sobre outras células.

Em um estudo recém-concluído na Universidade de São Paulo (USP), Renato Massaro, orientado por Silvy Maria-Engler, testou um composto extraído de raízes e folhas de um arbusto da Mata Atlântica, a pariparoba, contra uma linhagem de células humanas de tumor de cérebro que cresciam em um meio de cultura apropriado, mantido em laboratório. Os resultados que ele colheu indicaram que esse composto, o 4-nerolidilcatecol ou 4-NC, pode estimular a autofagia nesse tipo de tumor, chamado glioma, e acionar os caminhos bioquímicos que levam não só à reciclagem, mas também à morte celular. Os gliomas se originam das chamadas células gliais, muito mais numerosas no cérebro que os neurônios.

Massaro observou que o 4-NC também reduzia a capacidade de as células tumorais invadirem o espaço das células saudáveis. Era um bom sinal. O problema é que outros grupos de

pesquisa já haviam indicado que as células tumorais podem adquirir resistência aos estímulos que induzem à morte celular. Uma das características típicas da célula tumoral é justamente a capacidade de escapar da morte celular geneticamente programada.

Como a apoptose e a autofagia se relacionam, uma estimulando ou freando a outra, Massaro adotou a estratégia inversa: acrescentou um composto que bloqueia a autofagia, o 3-metil-adenina ou 3-MA, à cultura de células tumorais humanas. O 3-MA ampliou o efeito do 4-NC e a morte dos tumores aumentou 30%, provavelmente estimulando outro mecanismo de morte celular, em comparação com o grupo de células que receberam apenas o 4-NC. Na Unifesp, com outros compostos, Cláudia Bincchetto chegou a resultados semelhantes, que indicam que a autofagia não induz à morte, mas à sobrevivência das células – portanto, quando inibida, compostos antitumorais tornam-se mais efetivos. “Essa tem sido uma estratégia defendida por muitos grupos em busca de novos tratamentos contra tumores”, comenta Soraya.

“Agora nosso desafio é encontrar a dosagem que elimine apenas as células tumorais, sem lesar as normais”, diz Silvy. Segundo ela, alterar os níveis normais de autofagia em células saudáveis poderia gerar desequilíbrios nos processos genéticos ou respostas inflamatórias indesejadas. A equipe da USP havia indicado em 2008 que o 4-NC pode estimular a apoptose de células de tumor de pele ou melanoma mantidas em cultura de células.

Na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a equipe de Guido Lenz tem estudado os efeitos do resveratrol, composto natural encontrado na casca de uva, frutas vermelhas e amendoim, sobre a vida e a

morte das células. Sob sua orientação, Eduardo Chiela comparou os efeitos de resveratrol e da temozolomida, um dos principais medicamentos usados contra gliomas que, já se sabia, pode induzir à morte por autofagia. O estudo, em fase final de redação, indicou que o ingrediente da casca de uva (principalmente as escuras) estimula os dois mecanismos de morte celular, a autofagia e a apoptose, em culturas de células humanas tumorais.

Em um estudo anterior, Lauren Zamin, Guido Lenz e outros pesquisadores da UFRGS avaliaram os efeitos do resveratrol e da quercetina, outro componente da uva e de outras frutas: a casca de uva contém cerca de 50 a 100 microgramas por grama de resveratrol e 40 de quercetina; o vinho tinto, cerca de 7 a 13 de resveratrol e 7,4 de quercetina. Uma combinação das duas substâncias fez células de glioma de ratos entrarem em senescência, processo de envelhecimento irreversível que pode culminar em autofagia e do qual as células normais se valem como forma de evitar que se tornem cancerosas. Sob o efeito dessas duas substâncias, as células tumorais se agigantaram e depois se romperam.

Os testes prosseguem em animais e reforçam o papel duplo do resveratrol, que, de modo inverso, apresenta um efeito antienvelhimento em células saudáveis. “O resveratrol parece perceber quando uma célula é saudável ou tumoral”, observa Lenz. “Não será fácil, mas temos muito interesse em prosseguir a pesquisa, à medida que os resultados em ações sejam positivos, rumo a aplicações em seres humanos.” Outros estudos já haviam descrito o resveratrol como um composto capaz de deter outros tipos de tumores, estimular a autofagia e deter o envelhecimento.

“A autofagia representa um enfoque promissor para tratar melanomas (cânceres de pele)”, comentou Damià Tormo, pesquisador do Centro Espanhol de Pesquisa sobre Câncer, em Madri, em uma apresentação em janeiro na USP.

Ele coordenou a construção de uma estrutura sintética de RNA (ácido ribonucleico) que aciona proteínas específicas e promove autofagia, como descrito em um artigo de 2009 na revista *Cancer Cell*. Tormo trabalha também em sua empresa nascente, a BiOnco Tech, para levar adiante o desenvolvimento dessa molécula, que se mostrou eficaz para deter o crescimento de tumores de pele, que com frequência se tornam resistentes a medicamentos, nos primeiros experimentos realizados em cultura de células e em camundongos geneticamente modificados.

Mesmo com novas substâncias com efeitos promissores e aparentemente de baixa toxicidade, não será fácil prosseguir. Em primeiro lugar, por causa das dificuldades para desenvolver novos medicamentos no Brasil. Em segundo lugar, por conta do próprio papel – igualmente duplo – da autofagia, que ajuda a sobreviver ou a eliminar tanto as células normais quanto as tumorais. Em vários estudos, observa Guido Kroemer, pesquisador do Instituto Gustaf Rouassy de Paris, mostrou-se que a autofagia pode ter funções diferentes, de acordo com o tipo de célula. Em neurônios, células do coração e outros tipos de células que se reproduzem normalmente, esse mecanismo poderia ajudar na limpeza, eliminando resíduos, além de preparar a célula para a morte por apoptose. Em células que se multiplicam de modo descontrolado – ou seja, com potencial para formar tumores –, a autofagia poderia favorecer a sobrevivência e, portanto, a eventual resistência a compostos ou estímulos externos usados contra elas.

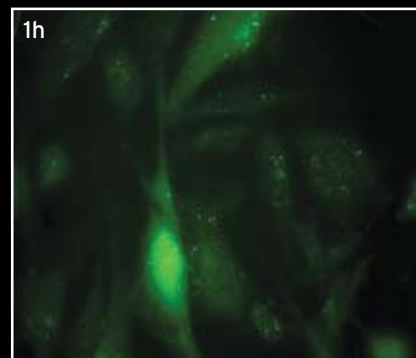
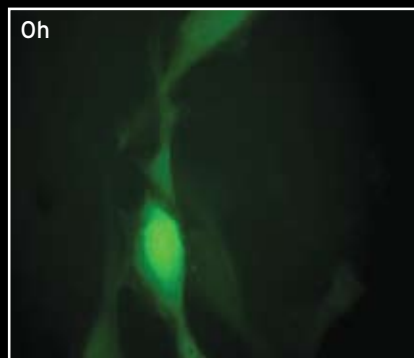
Reconhecida nos anos 1970 por Daniel Klionsky, pesquisador da Universidade de Michigan, Estados Unidos, a autofagia passou quase três décadas vista apenas como uma forma, inicialmente sem muita importância, de a célula se livrar de si mesma. Por essa razão, foi chamada de morte celular programada tipo 2 para diferenciar da apoptose, ou morte tipo 1,

Antitumorais à mão: a casca de uva contém resveratrol e quercetina

MIGUEL BOYATAN



Faxina no interior das células



muito mais estudada. “Pode-se dizer que a autofagia antecede a morte celular ou que é cruzada à morte celular, mas hoje não é mais correto afirmarmos que a autofagia seja um tipo de morte celular”, comenta Soraya.

Os genes que controlam a autofagia começaram a ser identificados em 1997, inicialmente em leveduras, organismos unicelulares, empregados na fabricação de pão, vinho, cerveja e álcool combustível. A partir dos genes, os especialistas conheceram quais são e como interagem as proteínas que levam adiante esse mecanismo flexível de reciclagem de componentes celulares. Além de desmontar o que não está funcionando direito, a autofagia tem outras funções ao longo do desenvolvimento das células, nem sempre levando à morte. É necessária, por exemplo, para as leveduras se reproduzirem e para as larvas de insetos se transformarem em pupas.

“Hoje vemos que a autofagia está mais para sobrevivência e resistência do que morte celular”, observa Soraya. “Diante de um estímulo agressor ou de um defeito celular, a célula pode entrar em autofagia como uma tentativa de reparo e só quando não há mais conserto é que entra em processo de morte celular.” Vários estudos sugerem que os genes e as proteínas que estimulam a autofagia podem bloquear a apoptose, ou o contrário, a partir de estímulos muito bem definidos, estabelecendo assim uma conversa cruzada entre esses dois fenômenos.

Quando recebem estímulos internos ou externos, as duas dezenas de genes já identificados que controlam a autofa-

gia acionam a produção de proteínas, que aos poucos se encaixam formando membranas que cercam os componentes celulares a serem desmontados antes de causarem problemas. Em seguida, movida por outras proteínas específicas, a membrana se funde com os lisossomos, compartimentos da célula ricos em enzimas que rotineiramente fragmentam proteínas.

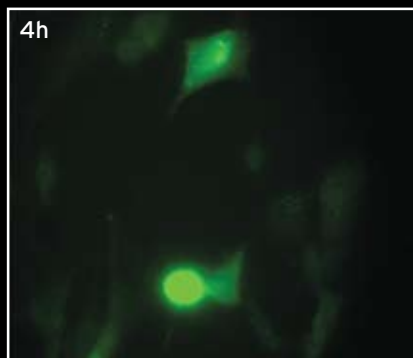
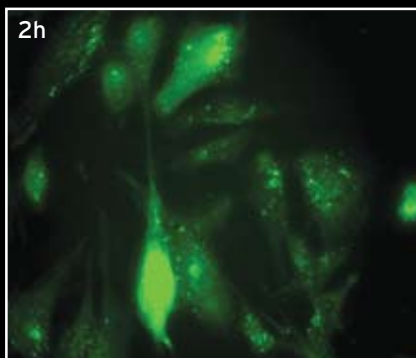
Os lisossomos digerem proteínas defeituosas celulares mais lentamente que outro mecanismo de limpeza celular chamado proteossomo. Embora mais lentos, os lisossomos podem eliminar estruturas celulares maiores, quando danificadas ou deficientes, principalmente as mitocôndrias, compartimentos celulares que convertem a energia obtida dos alimentos em moléculas de ATP, fundamentais para a manutenção das células. Na Unifesp, sob orientação de Soraya, Juliana Terashima irrigou células com um composto conhecido pela sigla FCCF, extremamente tóxico para as mitocôndrias. Em resposta, as células entraram em autofagia, que, uma vez acionada, ajudou a remover as mitocôndrias que haviam sido danificadas pelo composto.

Ao participar da linha de desmontagem celular, os lisossomos permitem às células construir novas moléculas mesmo quando não são abastecidas por matéria-prima habitual, vinda dos alimentos. A fusão das membranas com os lisossomos leva à formação

de grandes bolsas, chamadas vacúolos autossômicos, que levam adiante a transformação de resíduos em matéria-prima para moléculas novas. Segundo Lenz, aparentemente é o número de mitocôndrias eliminadas por esses vacúolos que marca o momento em que a célula sai da fase da reciclagem para a destruição completa. O problema é encontrar esse limite. Ou, em termos práticos, descobrir quantas mitocôndrias uma célula precisa perder – uma célula possui em média 200 mitocôndrias – para entrar no caminho irreversível da morte celular.

O conhecimento sobre essa linha de desmontagem celular, à medida que encorpava, levantou as primeiras possibilidades, hoje mais concretas, de intervir nessa cadeia de reações bioquímicas para prolongar a vida das células sadias e reduzir a das tumorais. Em um estudo publicado em fevereiro de 2008 na revista *PNAS*, pesquisadores italianos mostraram que o lítio, aplicado durante 15 meses em um grupo de 44 pessoas, poderia adiar a progressão da esclerose lateral amiotrófica, uma doença neurodegenerativa.

Um mês antes uma equipe da Universidade de Cambridge havia mostrado na *Human Molecular Genetics* as possibilidades de uso do lítio e da rapamicina, combinados, para tratar a doença de Huntington, outra enfermidade com perda contínua da funcionalidade dos neurônios. “A autofagia parece remover os agregados de proteínas malformadas, que atrapalham o funcionamento das células nervosas e estão presentes em doenças neurodegenerativas como a de



Células do cérebro (astrócitos) recebem um marcador de autofagia fluorescente, que no início (0h) se distribui de modo homogêneo. A aplicação de um composto tóxico para mitocôndrias provoca autofagia, marcada pela concentração de pontos fluorescentes. A concentração de pontos indica que as células, por autofagia, estão removendo as mitocôndrias danificadas.

JULIANA TERASHIMA E SORAYA SMALLY/ UNIFESP

Huntington, Parkinson e Alzheimer”, observa Soraya. Segundo ela, estudos realizados em seu laboratório com células de pacientes com Huntington mostraram que estimular a autofagia pode retardar o aparecimento da morte celular por apoptose.

Uma célula que se limpou por meio da autofagia pode viver mais, de acordo com um estudo realizado nos Estados Unidos e publicado na *Nature* em julho de 2009. Para chegar a essa conclusão, os pesquisadores cuidaram de cerca de 3 mil ratos idosos, com uma idade equivalente a 60 anos em seres humanos. Administraram rapamicina, composto que estimula a autofagia, a uma parte dos animais e esperaram todos morrer naturalmente, de cinco a sete meses depois. Os camundongos que receberam rapamicina apresentaram um tempo de vida de 28% a 38% maior que os do grupo que não recebeu nada.

Esse experimento impressionou pela grandiosidade, já que o número de animais raramente é tão elevado, mas sua aceitação não foi consensual – e muitos pesquisadores argumentaram que os camundongos podem ter vivido mais por outras razões ou que esse resultado não é o bastante para associar o controle da autofagia ao prolongamento da vida celular. De todo modo, os mecanismos de funcionamento da autofagia tornam-se mais claros. Outros experimentos sugeriram que a simples privação de nutrientes pode

estimular esse tipo de limpeza celular. “Recebendo menos glicose”, comenta Soraya, “a célula vai produzir menos energia pelas vias metabólicas habituais, mas também produzirá menos resíduos que aceleram o envelhecimento, além de estimular a autofagia, que pode remover mitocôndrias e proteínas malformadas”.

Em um artigo publicado em 2006 na *Cancer Cell*, Melanie Hippert, Patrick O’Toole e Andrew Thorburn, da Universidade de Colorado, em Denver, Estados Unidos, reconhecem que a manipulação da autofagia deve ser útil para deter a evolução de tumores e aumentar a eficiência dos tratamentos contra câncer. O problema é que a autofagia tem um papel duplo: pode inibir ou favorecer o crescimento de tumores, dependendo das circunstâncias. Por essa razão, a autofagia poderia ser estimulada para evitar a formação de tumores em pessoas com risco de câncer, mas reduzida se um tumor já tiver se estabelecido no organismo.

Depois de encontrar um composto adequado, o desafio seguinte será definir a melhor dosagem, para que apenas as células tumorais morram. Chi Dang, da Universidade John Hopkins, Estados Unidos, relatou em janeiro de 2008 na *Journal of Clinical Investigation* que a cloroquina, um antimalárico, pode ajudar a prevenir a evolução de tumores. Ele advertiu, porém, que o uso prolongado desse composto, que inibe a autofagia e estimula a apoptose, pode ter efeitos colaterais ainda não previstos, já que o conhecimento sobre o equilíbrio celular ainda é rudimentar.

“Não acredito que os novos antitumorais apenas estimulem a autofagia”, comenta Lenz. “Seria arriscado. A saída talvez seja algo, como o resveratrol, que possa ter múltiplos alvos e ativar mais de um processo bioquímico que leve à morte dos tumores, inclusive por autofagia.” Mesmo que novos compostos não cheguem logo, a capacidade de induzir ou bloquear a morte celular deve tornar-se uma característica dos medicamentos em geral, ajudando a explicar como atuam no organismo – muitos medicamentos antitumorais já em uso, por sinal, podem induzir à autofagia. Pode ajudar também a retomar muitas pesquisas interrompidas. “Fármacos que falharam em testes clínicos talvez precisem ser revisitados”, cogita Silvy Stuchi Maria-Engler, da USP, “porque podem se tornar excelentes se usados com outros, capazes de induzir ou inibir a autofagia.” ■

➤ Artigos científicos

1. ZAMIN, L.L. *et al.* Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. **Cancer Science**. v. 100, n. 9, p. 1.655-62. 2009.
2. HIPPERT, M.M. *et al.* Autophagy in cancer: good, bad, or both? **Cancer Research**. v. 66, n. 19, p. 9.349-51. 2006.
3. HARRISON, D.E. *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. **Nature**. v. 460, p. 392-5. 2009.
4. TORMO, D. *et al.* Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. **Cancer Cell**. v. 16, n. 2, p. 103-14. 2009.