

5. Morte cellulare

II edizione



(vedi singoli sottocapitoli)

5. Morte cellulare.....	117	5.4.3. Megachannels e fuoriuscita di macromolecole induttrici dell'apoptosi	135
5.1. MODALITÀ PRINCIPALI DI MORTE CELLULARE	119	5.4.4. ATP ed apoptosi	136
5.2. LA MORTE CELLULARE ACCIDENTALE SUBITA E LA NECROSI	120	5.5. CITOSCHELETRO ED APOPTOSI	137
5.2.1. La morte cellulare precede l'aspetto morfologico della stessa.....	120	5.5.1. Distacco dal substrato.....	137
5.2.2. Caratteristiche generali della necrosi.....	121	5.6. CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE E MOLECOLARI	138
5.2.3. Necrosi coagulativa.....	122	5.6.1. Le ceramidi.....	138
5.2.4. Altri tipi di necrosi.....	123	5.6.2. Il calcio.....	139
5.3. LA MORTE CELLULARE PROGRAMMATA: APOPTOSI	124	5.6.3. Lo stress ossidativo.....	139
5.3.1. Filogenesi dell'apoptosi	125	5.6.4. Le proteasi.....	140
5.3.2. Relazione tra apoptosi e mitosi nel mantenimento della stabilità della massa tissutale.....	126	5.6.5. Caspasi	142
Segnali e relative vie verso la mitosi e l'apoptosi.....	127	5.6.6. Funzioni e struttura delle caspasi.....	143
5.3.3. Eventi fisiologici in cui è implicata l'apoptosi.....	128	5.6.7. Caspasi inizianti e caspasi effettrici.....	143
5.3.4. Apoptosi e sistema immunitario.....	129	5.6.8. Attivatori ed inibitori delle caspasi.....	144
5.3.5. Confronto tra aspetti morfologici dell'apoptosi e della necrosi.....	130	5.6.9. La trans-glutaminasi.....	144
5.3.6. Alterazioni di forma e di volume della cellula.....	131	5.6.10. La frammentazione del DNA nucleare durante l'apoptosi.....	145
5.3.7. Fagocitosi.....	132	5.7. REGOLAZIONE DEL PROCESSO APOPTOTICO	146
5.3.8. L'apoptosi è un fenomeno relativamente rapido.....	132	5.7.1. I geni della famiglia bcl-2 arbitri della sopravvivenza cellulare	147
5.3.9. Schema generale degli eventi apoptotici.....	133	5.7.2. p53: mediatore chiave della risposta cellulare al danno sul DNA	148
5.4. MITOCONDRI ED APOPTOSI	134	5.7.3. Danno al DNA ed apoptosi.....	149
5.4.1. Produzione di radicali.....	134	5.8. DISREGOLAZIONE DELL'APOPTOSI	150
5.4.2. Mitochondri e calcio.....	134	5.8.1. Danno cellulare, neoplasie maligne ed apoptosi.....	151
		5.8.2. Relazioni reciproche tra le oncoproteine Ras, Myc e Bcl-2.....	151
		5.8.3. Relazione tra oncogeni e segnali death	152

5.8.4. Farmaco-resistenza, apoptosi e p53	153	5.9.4. Cornificazione.....	158
5.8.5. Attivazione delle caspasi nelle cellule cancerose farmaco-resistenti	154	5.9.5. Eccito-tossicità.....	159
5.9. MORTE CELLULARE PROGRAMMATA NON APOPTOTICA	155	5.9.6. Degenerazione walleriana.....	159
5.9.1. Anoikis.....	155	5.9.7. Frammentazione dei megacariociti.....	159
5.9.2. Piroptosi.....	156	5.10. PRINCIPALI FONTI UTILIZZATE.....	160
5.9.3. Auto-fagocitosi.....	158		



5.1. Modalità principali di morte cellulare

 Le modalità di morte cellulare possono essere ricondotte a due modelli:

- *morte subita: il cui aspetto morfologico è la **necrosi***
- *morte procurata o suicidio cellulare: la cui forma tipica (anche fisiologica) è l'**apoptosi***

 La forma meglio studiata e forse la più frequente di morte accidentale è quella dovuta a carenza di ossigeno.

Poiché nella morte ischemica la cellula presenta rigonfiamento Friedrich Daniel von Recklinghausen già nel 1910 propose per questa modalità il nome di **oncosi** (dal greco da *ὄγκος*, gonfiore)

 Le modalità principali di morte cellulare programmata sono

- apoptosi propriamente detta
- anoikis
- piroptosi
- auto-fagocitosi
- cornificazione
- eccito-tossicità
- degenerazione walleriana
- frammentazione dei megacariociti in piastrine
- eritrogenesi (formazione dei globuli rossi)

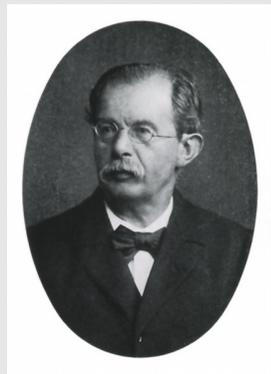


Figura 5.1.
Friedrich Daniel
von
Recklinghausen.
Immagine di public
domain da
ihm.nlm.nih.gov

5.2. La morte cellulare accidentale subita e la necrosi

5.2.1. LA MORTE CELLULARE PRECEDE L'ASPETTO MORFOLOGICO DELLA STESSA

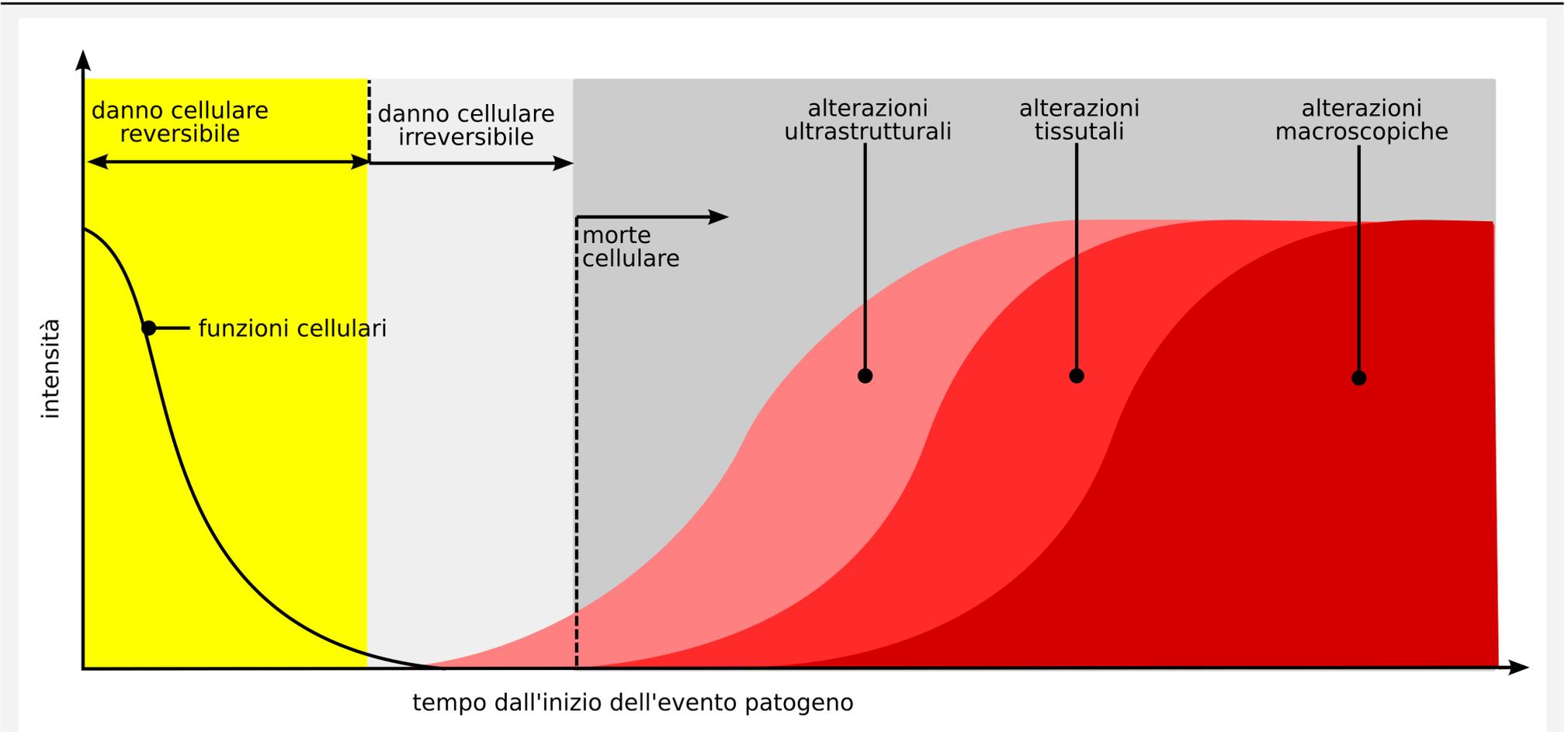


Figura 5.2. Relazione temporale tra danno irreversibile, morte cellulare (intesa come cessazione irreversibile delle funzionalità cellulari) e manifestazioni morfologiche a livello ultrastrutturale, tissutale e macroscopico

Definizione

Si definisce **necrosi** uno spettro di modificazioni morfologiche che segue la morte cellulare in organismi viventi; provoca coinvolgimento delle strutture circostanti con flogosi

5.2.2. CARATTERISTICHE GENERALI DELLA NECROSI

 La necrosi è dovuta in gran parte alla progressiva azione degradativa degli enzimi sulle strutture della cellula morta in un essere vivente

- cellule messe immediatamente in fissativo per analisi istologica sono morte ma non necrotiche

 Due sono gli eventi che concorrono contemporaneamente alla formazione della necrosi:

- digestione enzimatica della cellula
- denaturazione delle proteine

 Gli enzimi litici possono provenire:

- dai lisosomi delle cellule morte stesse (autolisi)
- dai lisosomi di leucociti che infiltrano la lesione (eterolisi)

 Due quadri di necrosi possono essere individuati a seconda che prevalga

- la denaturazione delle proteine: **necrosi coagulativa**
- la digestione enzimatica: **necrosi colliquativa**

Entrambi questi fenomeni richiedono ore per svilupparsi: Nell'infarto del miocardio ad es.:

- non si sviluppa necrosi se un infarto (necrosi ischemica) del miocardio porta a morte immediata
- l'indizio istologico più precoce della necrosi del miocardio si manifesta non prima di 8-12 ore, mentre la perdita di enzimi dal muscolo, indice di danno irreversibile si manifesta già dopo 4-6 ore

5.2.3. NECROSI COAGULATIVA

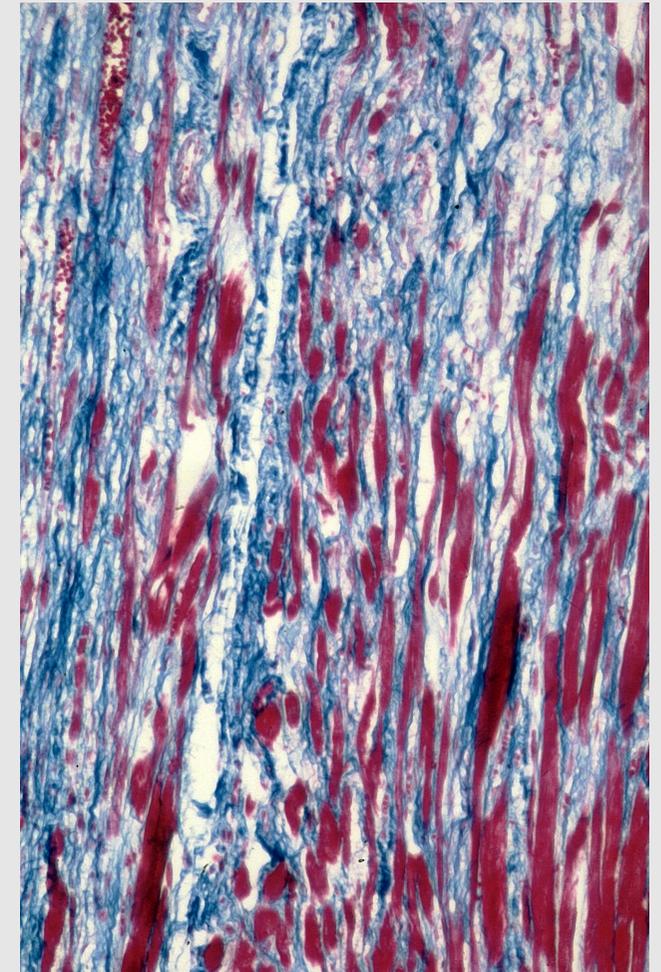
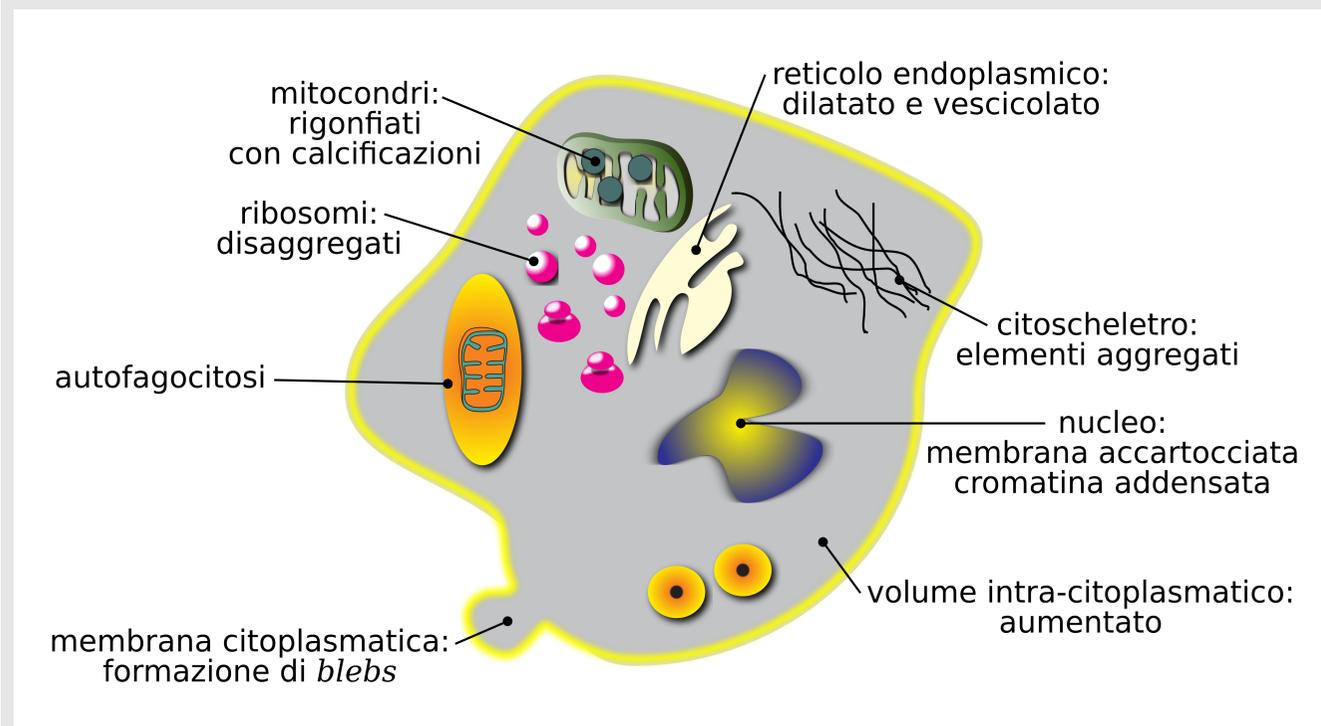
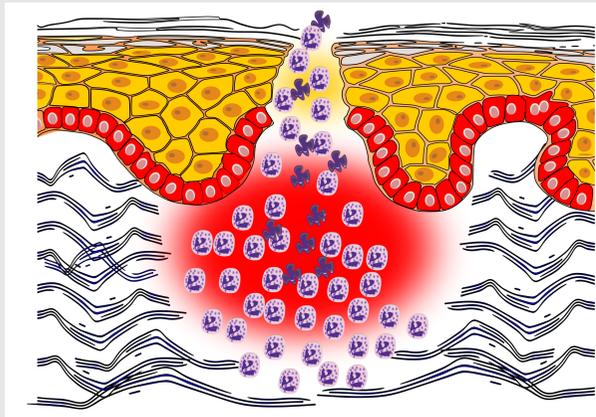


Figura 5.3. (in alto) Necrosi coagulativa. Liberamente tratto da Rubin (1994)

Figura 5.4. (a dx.) Infarto acuto del miocardio. L'ostruzione di una arteria coronarica provoca la necrosi coagulativa dell'area ischemica del miocardio. Colorazione Azan-Mallory per il connettivo. Dalla collezione Eugenio Bonetti, Istituto di Patologia generale dell'Università di Bologna

5.2.4. ALTRI TIPI DI NECROSI

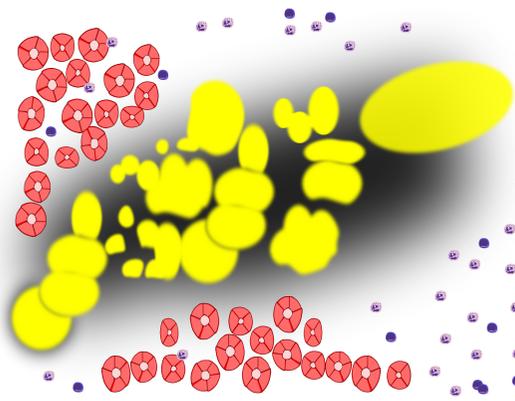


Necrosi colliquativa

Adattato da Rubin (1994)

Risulta da autolisi od eterolisi ed è caratteristica

- *delle infezioni batteriche focali in grado di richiamare grandi numeri di leucociti neutrofilo polimorfonucleati*
- *del tessuto nervoso (a causa della elevata percentuale di lipidi)*
- *della gangrena umida (a causa degli enzimi litici batterici)*

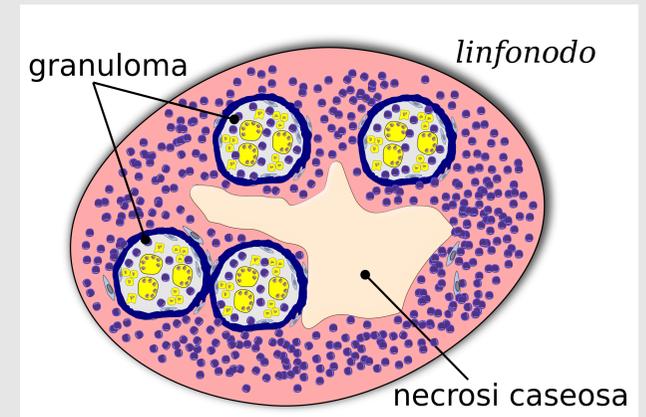


Necrosi grassa enzimatica o steatonecrosi nella pancreatite acuta

Adattato da Rubin (1994)

Il rilascio e l'attivazione di enzimi pancreatici lipolitici dà luogo alla necrosi del circostante tessuto adiposo

L'idrolisi dei trigliceridi rilascia acidi grassi liberi, che precipitano come saponi di calcio nei frammenti necrotici



Necrosi caseosa di un linfonodo tubercolare

Adattato da medic.usm.my

Tipico centro necrotico amorfo, granuloso ed eosinofilo, circondato da tessuto infiammatorio granulomatoso

Si chiama caseosa perché macroscopicamente ha l'aspetto di ricotta

Figura 5.5. Alcuni tipi di necrosi con caratteristiche particolari

5.3. La morte cellulare programmata: apoptosi

*L'**apoptosi** è una forma di morte cellulare programmata la cui funzione è nell'eliminazione di cellule durante il normale sviluppo embrionale, l'organogenesi, la funzione immunitaria, e la crescita tissutale, ma che può anche essere indotta da stimoli patogeni; non induce flogosi e contribuisce a mantenere stabile il numero delle cellule*

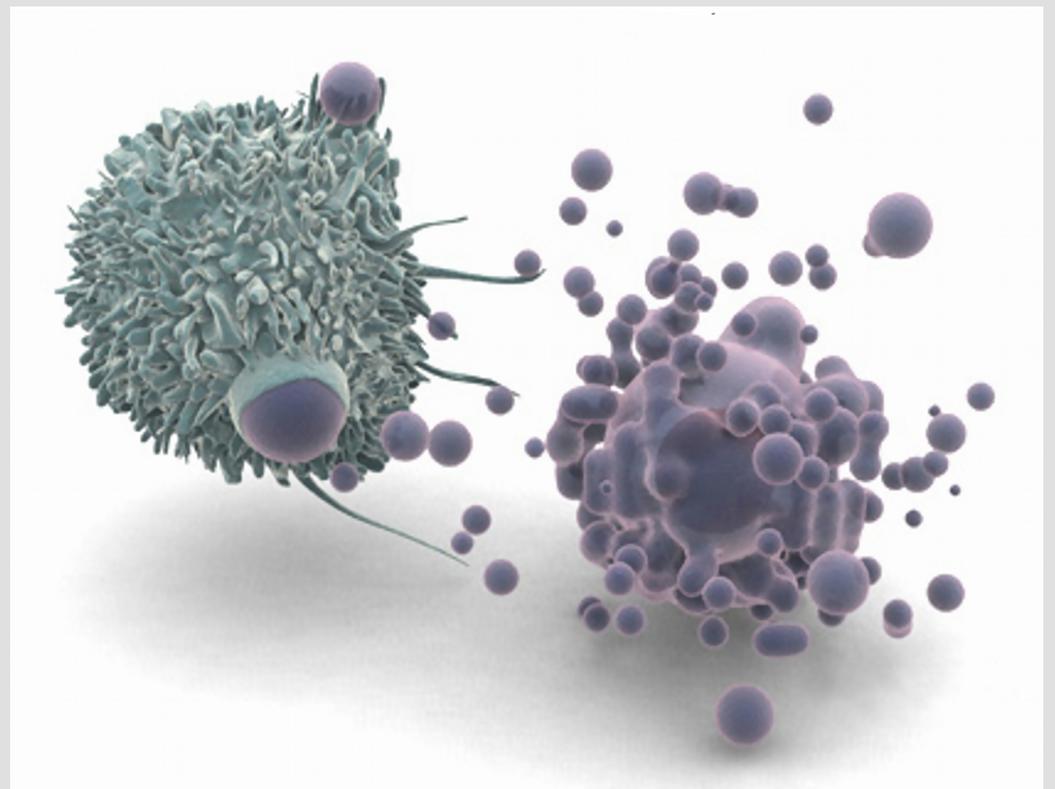


L'apoptosi (dal greco *ἀπο πτόσις*, riferito originariamente alla caduta delle foglie) è già da tempo ben conosciuta dai patologi come quadro morfologico di morte cellulare, ma solo recentemente se ne è riconosciuta l'importanza come modalità distinta di morte cellulare

L'apoptosi viene regolata con la stessa complessità con cui viene regolata la mitosi ed è uno dei due aspetti della regolazione della massa cellulare insieme alla mitosi

Figura 5.6. Leucocita che fagocita corpi apoptotici. Libera elaborazione da una immagine al microscopio elettronico a scansione. Adattato da: ocw.mit.edu/OcwWeb (da un originale da U.S. National Library of Medicine)

Il linfocita a dx è in apoptosi e si frammenta in un numero di corpi apoptotici circondati da membrana cellulare che vengono fagocitati dal leucocita sulla sn, il tutto senza rilasciare contenuto intra-cellulare, e senza attivare la flogosi



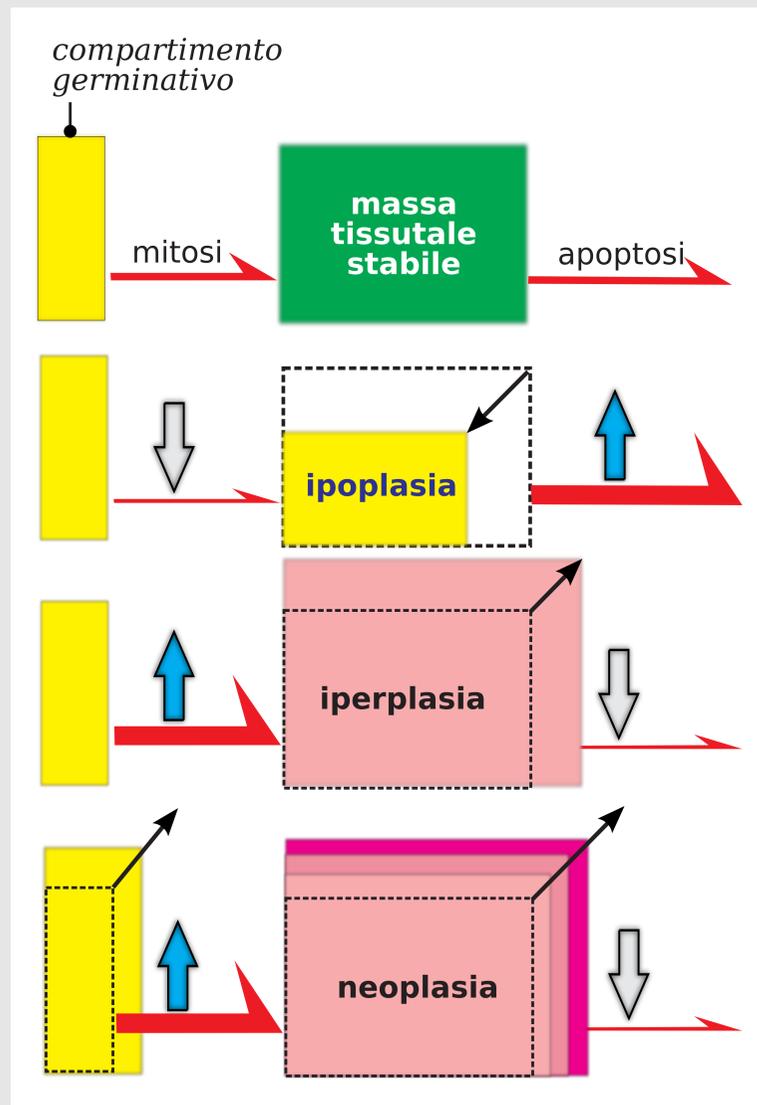
5.3.1. FILOGENESI DELL'APOPTOSI



L'apoptosi è un processo filogeneticamente molto antico: si ritrova anche in organismi unicellulari come i protozoi

- la maggior parte delle nozioni riguardanti i geni fondamentali del processo apoptotico sono state ricavate da studi compiuti nel nematode *Caenorhabditis elegans*
- i geni critici per la regolazione e l'esecuzione del processo apoptotico sono risultati essere simili a quelli di *C. elegans* anche negli organismi superiori
- i meccanismi di base del processo apoptotico sono perciò fundamentalmente conservati lungo tutta l'evoluzione pur diventando più complessi nei vertebrati superiori
- negli organismi più complessi si diversificano i meccanismi che regolano l'innesco del processo stesso: l'apoptosi è un processo sociale
- l'equilibrio tra la vita e la morte è molto delicato e la scelta tra l'una e l'altra avviene in conseguenza di una serie di interazioni e scambi di messaggi fra cellule vicine ed anche fra tipi cellulari diversi
- all'aumentare della complessità dei tessuti e degli organismi aumenta perciò anche il grado di complessità dei meccanismi che regolano l'innesco del processo apoptotico
- nei vertebrati, l'apoptosi svolge un ruolo chiave in molti processi fisiologici (es.: il rimodellamento dei tessuti durante lo sviluppo embrionale e la delezione cellulare) come pure nella fisiologia del compartimento ematopoietico dove molti fattori di crescita promuovono la sopravvivenza dei precursori midollari ed il loro differenziamento sopprimendo il processo apoptotico

5.3.2. RELAZIONE TRA APOPTOSI E MITOSI NEL MANTENIMENTO DELLA STABILITÀ DELLA MASSA TISSUTALE



☞ Mitosi ed apoptosi sono i due meccanismi regolatori della massa tissutale

L'equilibrio della massa tissutale può spostarsi sia fisiologicamente che patologicamente

☞ Variazioni nell'equilibrio della massa tissutale possono avvenire per:

- modificazioni della frequenza delle mitosi
- modificazioni della frequenza dell'apoptosi
- variazioni della numerosità del compartimento germinativo

☞ L'equilibrio tra mitosi, stato stazionario ed apoptosi è strettamente controllato attraverso meccanismi

- multipli
- ridondanti
- interlacciati tra loro

Figura 5.7. Relazione tra apoptosi e mitosi

Segnali e relative vie verso la mitosi e l'apoptosi

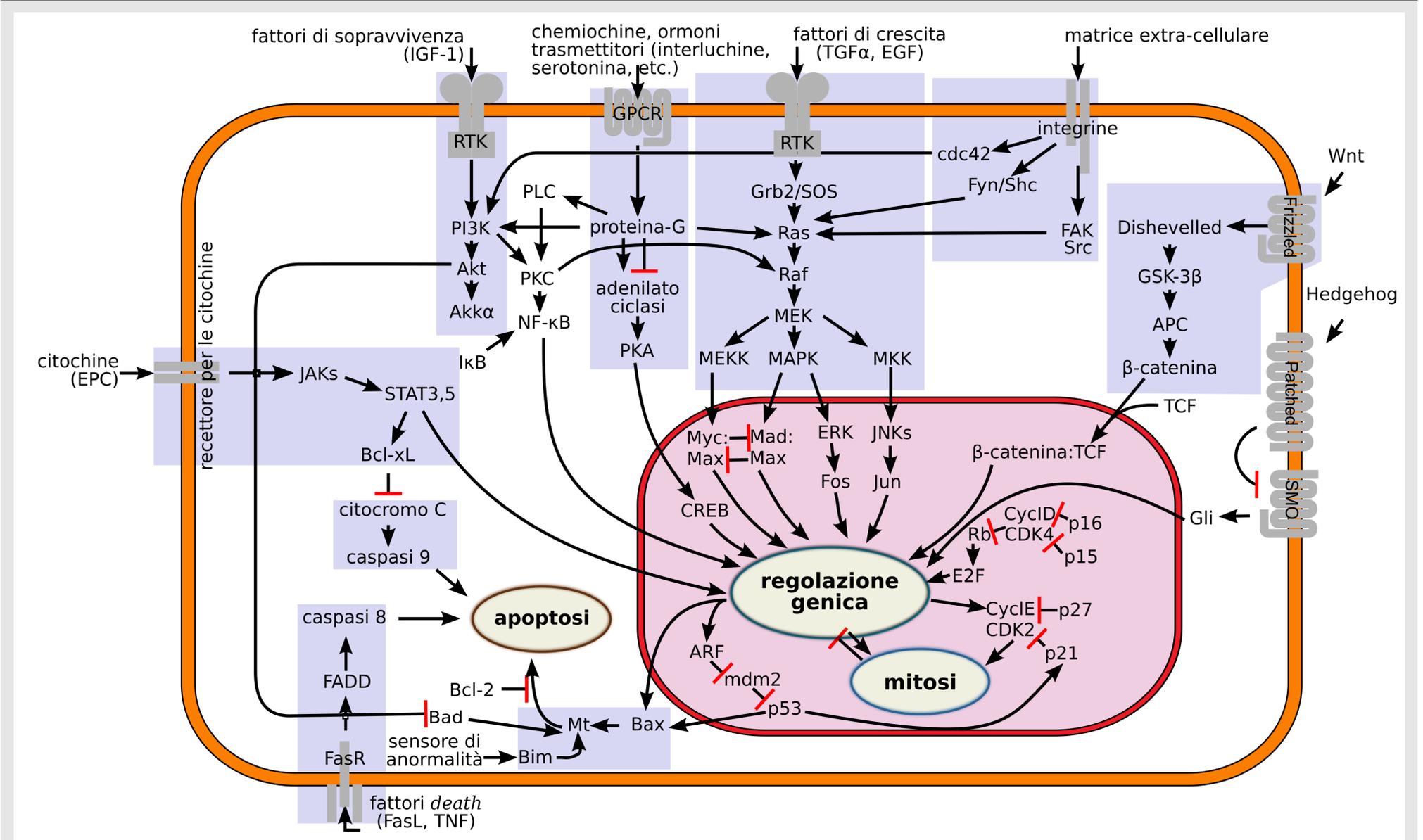


Figura 5.8. Vie di segnale verso la mitosi o l'apoptosi. Modificato da [wikipedia commons: signal transduction pathways](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Signal_transduction_pathways)

5.3.3. EVENTI FISIOLÓGICI IN CUI È IMPLICATA L' APOPTOSI



● *Embriogenesi e metamorfosi*

- durante l'organogenesi
- nell' involuzione durante lo sviluppo di alcune strutture

● *Involuzione ormono-dipendente*

- la distruzione delle cellule dell' endometrio durante il ciclo mestruale
- l' atresia follicolare ovarica nella menopausa
- la regressione della mammella dopo la fine dell' allattamento

● *Regolazione della risposta immune*

● *Fisiologia del compartimento ematopoietico: molti fattori di crescita promuovono la sopravvivenza dei precursori midollari ed il loro differenziamento sopprimendo il processo apoptotico*

● *Delezione cellulare nelle popolazioni in attiva proliferazione per mantenere la massa cellulare in equilibrio*

- gli epitelii delle cripte intestinali



Molti fattori di crescita, più che esercitare un ruolo trofico, agiscono prima di tutto inibendo il programma apoptotico

5.3.4. APOPTOSI E SISTEMA IMMUNITARIO

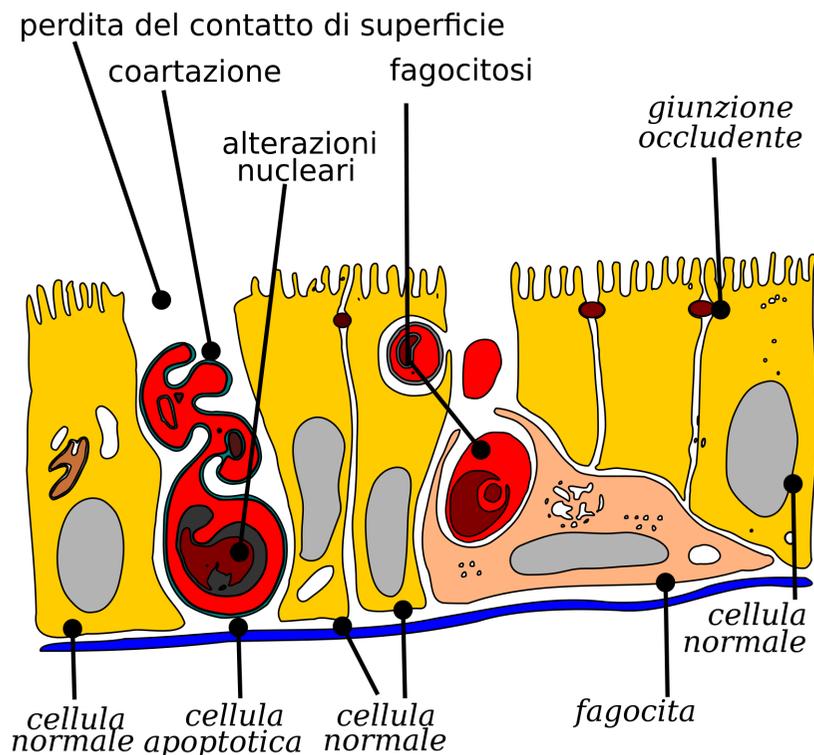


La morte di tipo apoptotico assolve un compito particolarmente importante nel sistema immunitario, dove è implicata nei processi che garantiscono una corretta risposta:

- la delezione dei timociti immaturi e dei linfociti B eccessivamente auto-reattivi (selezione negativa) durante la loro maturazione, in modo da ottenere un repertorio compatibile con la tolleranza verso il *self*
 - la delezione delle cellule auto-reattive in periferia
 - l'eliminazione delle cellule bersaglio ad opera delle cellule effettrici dell'immunità cellulo-mediata (linfociti T citotossici, o CTL e cellule *natural killer*, o NK)
 - lo spegnimento della risposta immune: le cellule effettrici della risposta immunitaria (sia linfociti T che linfociti B e plasmacellule) una volta eliminato l'antigene perdono la stimolazione dovuta all'antigene stesso e vanno in apoptosi, ad eccezione di poche cellule di memoria
-

5.3.5. CONFRONTO TRA ASPETTI MORFOLOGICI DELL' APOPTOSI E DELLA NECROSI

apoptosi



neccrosi

modificazioni reversibili:
dilatazione degli organuli;
disgregazione dei ribosomi;
formazione di vescicole

punto di non ritorno:
rigonfiamento mitocondriale di grande entità;
corpi densi nella matrice mitocondriale;
formazione di grandi vescicole

modificazioni irreversibili:
rottura della membrana;
dispersione degli organuli;
liberazione del contenuto dei lisosomi

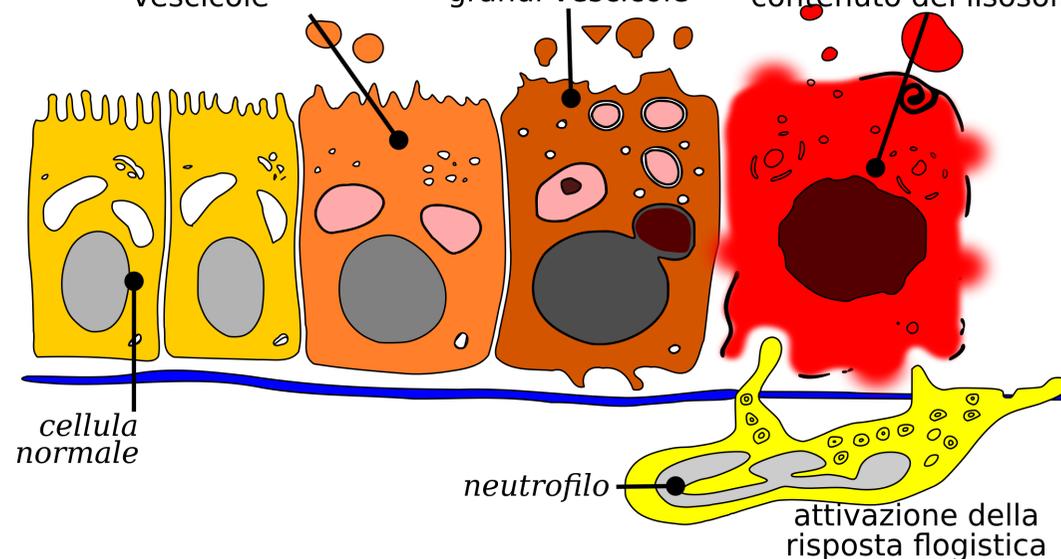


Figura 5.9. Necrosi ed apoptosi nell'epitelio intestinale. Liberamente tratto da Rubin (1994)

☞ La differenza più significativa consiste nell'assenza di flogosi nella morte cellulare per apoptosi, fatto che è coerente con la funzione fisiologica dell'apoptosi

5.3.6. ALTERAZIONI DI FORMA E DI VOLUME DELLA CELLULA

- Le alterazioni di forma e di volume della cellula sono state in parte addebitate ad attività trans-glutamminasica
- Le trans-glutamminasi causano un esteso *cross-linking* delle proteine citoplasmatiche, formando un guscio a ridosso della membrana plasmatica che ricorda quello delle cellule cheratinizzate squamose

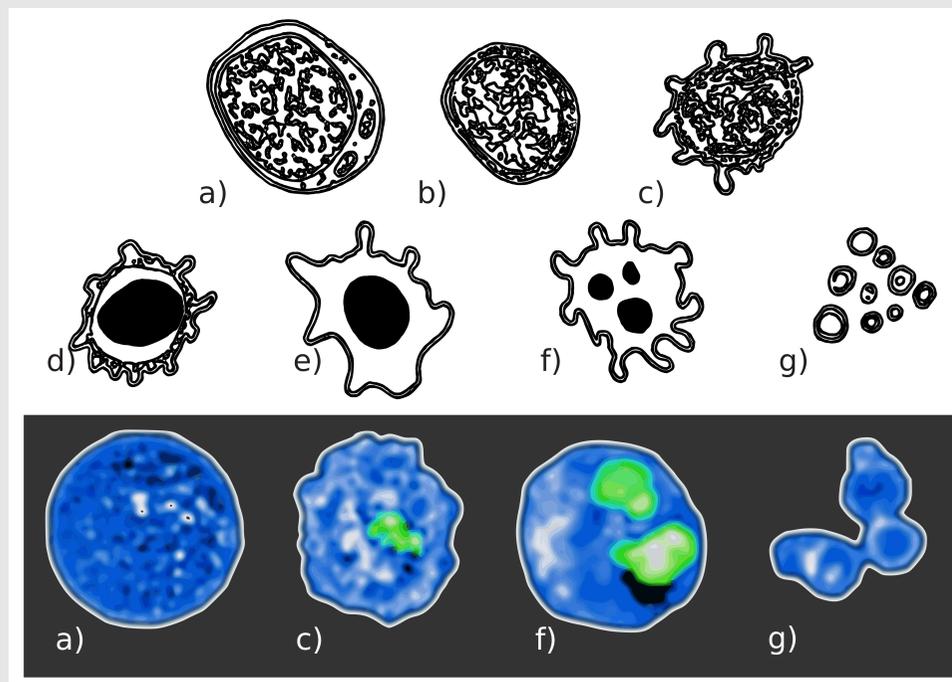


Figura 5.10. Stadi sequenziali dell'apoptosi nei linfociti. Adattato da Cohen (1993) e da bmt.tue.nl.

- a) linfocita normale con citoplasma sparso e cromatina nucleare dall'aspetto eterogeneo
- b) il volume cellulare comincia a ridursi e gli organuli si ammassano; la cromatina inizia a compattarsi
- c) continua il compattamento della cromatina in parallelo alla condensazione citoplasmatica; compaiono estroflessioni della membrana citoplasmatica
- d) la cromatina super-aggregata collassa a ridosso a della membrana nucleare
- e) il nucleo raggiunge il massimo grado di condensazione diventando picnotico
- f) il nucleo picnotico si frammenta
- g) frammenti nucleari e organuli intatti sono inglobati nelle estroflessioni della membrana plasmatica e danno origine ai corpi apoptotici, frammentando la cellula

5.3.7. FAGOCITOSI

 La fagocitosi dei corpi apoptotici da parte dei macrofagi e di altri tipi cellulari è mediata da recettori presenti sulla superficie di dette cellule per ligandi specificamente espressi sui corpi apoptotici

Nei tessuti i corpi apoptotici sono rapidamente fagocitati dalle cellule circostanti e/o dai macrofagi e vengono degradati all'interno dei lisosomi

Il riconoscimento di questi corpi apoptotici da parte dei fagociti avviene mediante diversi sistemi recettoriali. Il risultato finale è sempre quello di un'eliminazione "pulita", senza sconvolgimento dell'architettura strutturale del tessuto senza fuoriuscita del contenuto intra-cellulare e senza il conseguente innesco di un processo flogistico

5.3.8. L'APOPTOSI È UN FENOMENO RELATIVAMENTE RAPIDO

 Gli eventi cellulari caratterizzanti l'apoptosi sono piuttosto rapidi

L'intervallo di tempo che intercorre dall'inizio del processo di condensazione alla fagocitosi e digestione dei corpi apoptotici è assai più breve dei tempi di sviluppo dei processi necrotici e post-necrotici: è stato calcolato che i corpi apoptotici rimangono visibili al microscopio ottico solo per alcune ore

Di conseguenza spesso il processo apoptotico è difficile da rilevare dal punto di vista istologico se non è massiccio

5.3.9. SCHEMA GENERALE DEGLI EVENTI APOPTOTICI

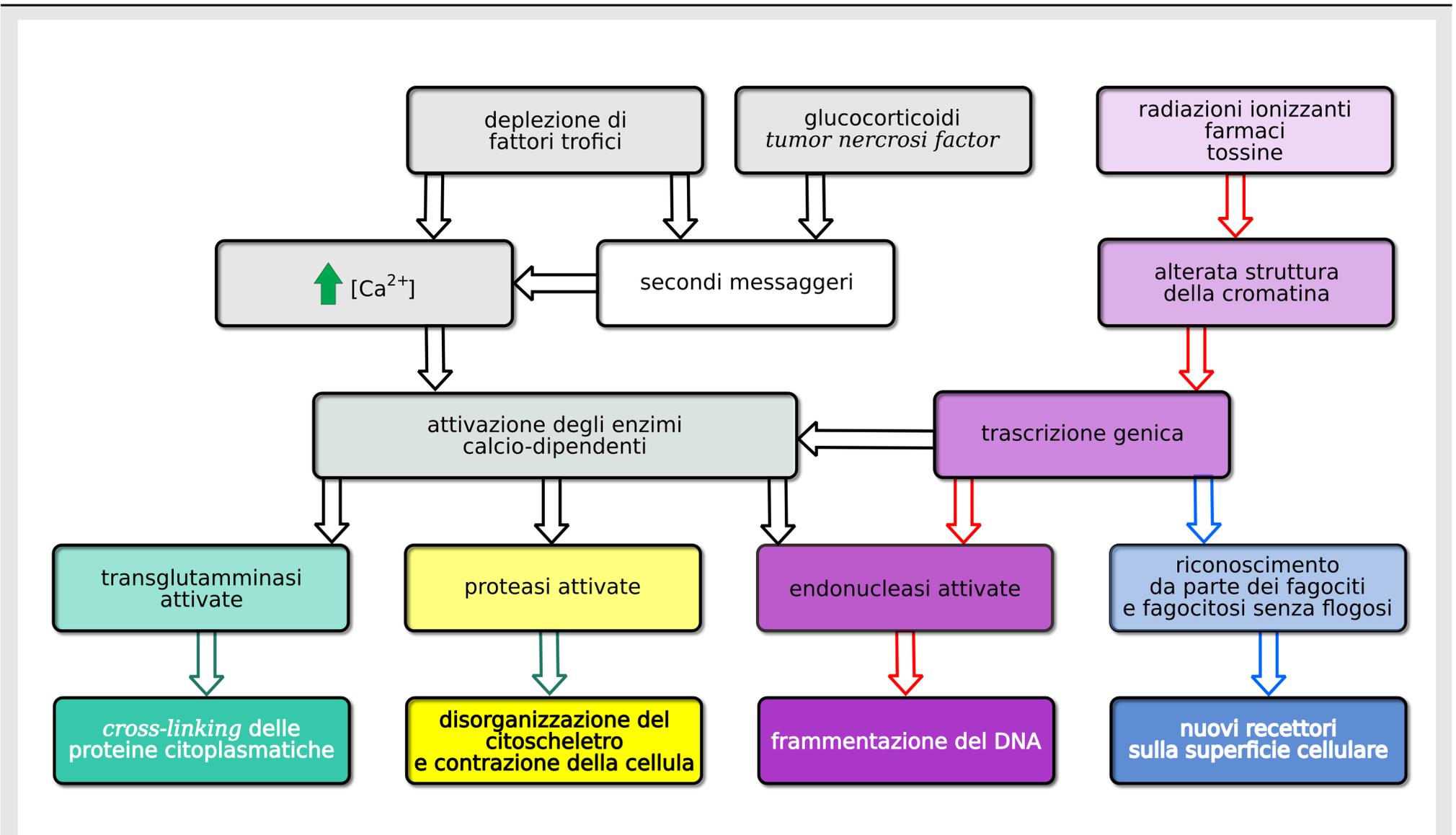


Figura 5.11. Schema generale degli eventi apoptotici

5.4. Mitocondrio ed apoptosi

 Il mitocondrio gioca un ruolo determinante in fondamentali aspetti del metabolismo legati all'apoptosi. Il mitocondrio è un punto di convergenza di molte, se non tutte, le vie d'innescamento dell'apoptosi e rappresenta il punto di passaggio tra la fase di induzione e la fase di esecuzione del processo apoptotico.

Gli eventi mitocondriali coinvolti sono:

- produzione di radicali
- regolazione del calcio intra-citoplasmatico
- formazione di *megachannels* (pori che consentono la fuoriuscita di proteine mitocondriali)

5.4.1. PRODUZIONE DI RADICALI

 Il mitocondrio è la sede ove viene prodotta la maggior quantità di radicali dell'ossigeno come sottoprodotti del metabolismo aerobio: i radicali sono alcuni fra i principali induttori di apoptosi.

5.4.2. MITOCONDRI E CALCIO

 Il mitocondrio interviene anche nella regolazione dei livelli di calcio intra-cellulare. Durante le prime fasi dell'apoptosi si ha un aumentato rilascio di calcio da parte del mitocondrio, e una sua successiva riassunzione da parte dello stesso organulo (*recycling*).

Il *recycling* del calcio determina:

- una perdita del potenziale di membrana
- un conseguente calo del contenuto cellulare di ATP

5.4.3. MEGACHANNELS E FUORIUSCITA DI MACROMOLECOLE INDUTTRICI DELL' APOPTOSI



Una diminuzione del potenziale di membrana, un'eccessiva produzione di radicali, la presenza di ioni Ca^{2+} ed altri stimoli, possono determinare l'apertura di pori della membrana mitocondriale detti **megachannels** o **mitochondrial pores**, con conseguente alterazione della sua permeabilità

Ciò provoca la fuoriuscita di fattori normalmente sequestrati, quali il **citocromo c** o l'**AIF (apoptosis inducing factor)** che sono in grado di innescare l'apoptosi se a contatto con cofattori citoplasmatici

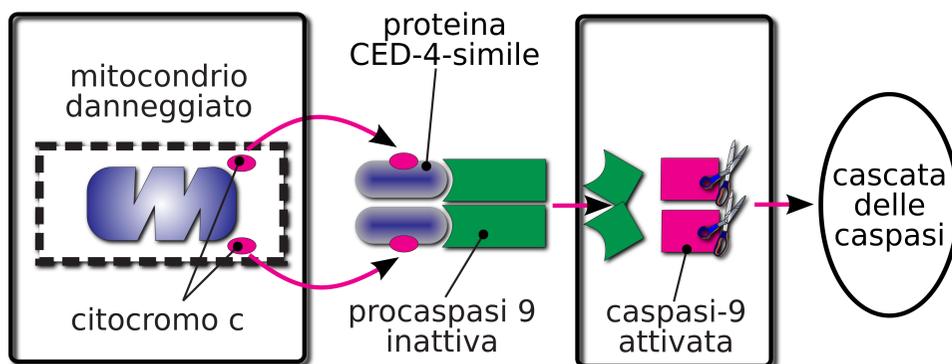


Figura 5.12. Citocromo c ed apoptosi.

Le molecole di citocromo c rilasciate si legano a proteine adaptor simili a CED-4 (analogo in *C. elegans*)

Le proteine adaptor quindi si aggregano e legano le molecole di pro-caspasi 9

Le molecole raggruppate di pro-caspasi 9 si attivano l'un l'altra

Le molecole attivate di caspasi 9 attivano le altre caspasi dando avvio alla cascata delle caspasi

5.4.4. ATP ED APOPTOSI

 I livelli di ATP sono cruciali nel determinare il tipo di morte cellulare

L'apoptosi è un processo attivo, che richiede energia

La disponibilità di ATP è fondamentale per la determinazione della strada che la cellula sceglierà per morire:

- quando l'ATP scende sotto una certa concentrazione-soglia, la cellula muore per apoptosi
- quando il calo è massiccio e rapido, la cellula va incontro a necrosi

Il processo di apoptosi può avvenire soltanto se c'è abbastanza ATP da permettere fenomeni attivi quali l'idrolisi enzimatica delle macromolecole, la condensazione nucleare e la formazione di *blebs*, fenomeni che non avvengono invece in corso di necrosi

 Considerando che il mitocondrio svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo energetico cellulare, ed in particolare nella biosintesi di ATP, l'alterazione della sua funzionalità può condizionare non solo lo svolgimento del processo apoptotico ma anche la scelta cellulare tra apoptosi e necrosi

5.5. Citoscheletro ed apoptosi

 Durante il processo apoptotico avviene un profondo rimaneggiamento dell'impalcatura del citoscheletro in parte responsabile delle alterazioni morfologiche che la cellula subisce

Eventi principali correlati al citoscheletro sono:

- Il taglio della proteina del citoscheletro caspasi ad opera di una caspasi: la proteolisi parziale di tale proteina rappresenta un evento regolatorio che induce la riorganizzazione dell'impalcatura cellulare
- la disorganizzazione della rete dei filamenti di actina con successiva degradazione della stessa
- la redistribuzione dell' α -actinina
- la perdita dei filamenti di vinculina (proteine responsabili dell'ancoraggio) a livello delle placche di adesione focale

5.5.1. DISTACCO DAL SUBSTRATO

 Il danneggiamento del citoscheletro che si innesca nell'apoptosi causa il distacco della cellula dalla membrana basale o dalle altre strutture interstiziali di sostegno

Particolarmente implicata in questi processi è una famiglia di molecole complessivamente indicate come **integrine**, che mediano l'interazione delle cellule con i vari componenti della matrice extra-cellulare

Bloccando l'interazione delle integrine con i substrati specifici, o il relativo segnale trasmesso, è possibile indurre apoptosi

5.6. Caratteristiche biochimiche e molecolari

 Sono stati individuati parecchi eventi molecolari che coinvolgono:

- ceramidi
- calcio
- *stress* ossidativo
- proteasi

5.6.1. LE CERAMIDI

 Le ceramidi sono molecole idrofobiche che possono essere sintetizzate *de novo*, oppure derivare dall'idrolisi degli sfingolipidi di membrana, in seguito all'attivazione di vari tipi di sfingomielinasi (ciclo della sfingomielina)

L'aumento della loro concentrazione intra-cellulare avvia una serie di reazioni a cascata come secondi messaggeri nella trasduzione di vari tipi di segnale (inibizione della crescita, differenziamento)

Un aumento consistente della concentrazione intra-cellulare di ceramidi è un evento precoce caratteristico di molti modelli di apoptosi

In questi casi la produzione di ceramidi avviene per attivazione di una specifica sfingomielinasi acida, associata a membrane sub-cellulari (ma non a quella plasmatica), che si attiva a pH acido

L'inibizione della produzione di ceramidi blocca l'innescò del processo apoptotico, facendo ritenere che tali molecole svolgano un ruolo centrale nella trasduzione del segnale apoptotico

5.6.2. IL CALCIO

 Un aumento del calcio citoplasmatico avviene molto precocemente, quando la cellula è ancora vitale, e può derivare dall'ingresso di Ca^{2+} proveniente

- dall'ambiente extra-cellulare
- dal suo rilascio dai siti di sequestro intra-cellulari (mitocondri, reticolo)

 L'aumento di ioni calcio è implicato nel processo apoptotico a due livelli:

- nella trasduzione del segnale durante il processo di regolazione e induzione
- in un momento più tardivo, quando è responsabile dell'attivazione di enzimi, proteasi ed endonucleasi, implicati nel meccanismo di morte cellulare

5.6.3. LO STRESS OSSIDATIVO

 Molti degli induttori di apoptosi sono intrinsecamente degli ossidanti o sono capaci di indurre uno stress ossidativo nella cellula

Viceversa, molte sostanze anti-apoptotiche sono direttamente degli anti-ossidanti, oppure sono in grado di stimolare i meccanismi anti-ossidanti cellulari

Infatti:

- uno dei mediatori comuni del segnale apoptotico è lo stress ossidativo
 - lo stato (potenziale) ossido-riduttivo della cellula e/o l'equilibrio tra la generazione di specie radicaliche e la loro detossificazione sono dei "sensori cellulari" determinanti nella fase di integrazione che porta all'innesco dell'apoptosi
-

5.6.4. LE PROTEASI



Vari enzimi ad attività proteolitica, molti dei quali specifici per i processi apoptotici chiamati caspasi, sono attivati durante lo svolgimento del processo apoptotico

L'attivazione può avvenire auto-cataliticamente oppure ad opera di una caspasi diversa; in molti modelli si verificano attivazioni a cascata in cui una caspasi diventa il substrato di quella successiva: la cellula infatti non si auto-digerisce aspecificamente

Nonostante l'attivazione di un gran numero di proteasi, durante il processo apoptotico il livello di proteolisi totale complessivo resta invariata rispetto ad altri momenti della vita cellulare

Quello che caratterizza l'apoptosi è invece l'incremento della proteolisi solo (o prevalentemente) di substrati specifici. Ciascuna proteasi agisce su gruppi di substrati diversi:

- proteine del citoscheletro fodrina, actina e gas2 (prodotto del gene *growth arrest specific 2*)
 - istone H1 (proteina chiave nella formazione della struttura cromatinica)
 - laminine nucleari
 - topoisomerasi I e II (enzimi che agiscono sulla struttura del DNA)
 - poli(ADP-riboso) polimerasi (PARP), enzima coinvolto nei sistemi di riparo del DNA: la sua inattivazione precede e si accompagna agli eventi degradativi della cromatina
-

Regolazione delle proteasi

-  Le proteasi regolano reciprocamente la propria attività
- Anche le caspasi (proteasi intra-cellulari specifiche dei processi apoptotici) si auto-regolano
- Le caspasi possono essere distinte in due gruppi funzionali:
- le caspasi inizianti, che innescano ed amplificano il processo apoptotico: agiscono su altre caspasi
 - le caspasi effettrici, che digeriscono i substrati cellulari realizzando il processo apoptotico
-  Inibitori endogeni delle caspasi (omologhi a quelli virali) sembrano essere molto conservati dal punto di vista evolutivo: sono stati isolati in *Drosophila* ed anche in cellule di mammifero (tra cui l'uomo)
- è stato dimostrato che il gene mutato nelle atrofie muscolo-spinali (malattie caratterizzate da degenerazione dei motoneuroni spinali) codifica per una proteina strettamente omologa a IAP (*inhibitor of apoptosis protein*, proteina che inibisce l'apoptosi)
 - i regolatori negativi dell'apoptosi sono quindi necessari per il corretto trofismo dei tessuti, e, in loro carenza, si possono avere patologie degenerative irreversibili
- La corretta regolazione delle caspasi è cruciale per lo svolgimento del processo apoptotico: tali proteasi svolgono infatti la funzione di effettori "chiave"
- Nella quasi totalità dei modelli sperimentali l'inibizione delle caspasi protegge le cellule dalla morte per apoptosi

5.6.5. CASPASI

Il componente centrale del meccanismo effettore della distruzione cellulare nell'apoptosi è rappresentato da un sistema proteolitico composto da un insieme di proteasi chiamate caspasi

- le caspasi formano una cascata proteolitica innescata in risposta a segnali pro-apoptotici che culmina nella frammentazione di un set di proteine strutturali, che ha come risultato finale la disgregazione della cellula
- le caspasi sono tra le proteasi più specifiche conosciute, con una specificità assoluta per un residuo di acido aspartico prima del sito di taglio che le accomuna
- comune a tutte le caspasi è anche il riconoscimento di almeno un tetrapeptide dal lato NH₂-terminale del sito di taglio necessario per una catalisi efficiente
- il *motif* di riconoscimento invece varia molto da una caspasi all'altra e da spiegazione della diversa funzione biologica di queste proteine
- La specificità delle caspasi è ancora più stringente: non tutte le proteine che contengono il *motif* di sequenza ottimale vengono idrolizzate, lasciando capire che sono importanti anche motivi strutturali tridimensionali
- l'idrolisi non è solo specifica ma anche efficiente con un numero di **turnover** molto elevato
- la stretta specificità delle caspasi va d'accordo con la mancanza di digestione proteica generalizzata che si osserva nell'apoptosi

5.6.6. FUNZIONI E STRUTTURA DELLE CASPASI

Le caspasi sono presenti in organismi della più diversa complessità dal verme *Caenorhabditis elegans* all'uomo. Le 13 caspasi identificate nell'uomo (caspasi 1-13) hanno ruoli distinti nell'apoptosi e nell'infiammazione. Nell'apoptosi, le caspasi

- sono responsabili della proteolisi che conduce alla disgregazione della cellula (**caspasi effettrici**)
- sono coinvolte negli eventi regolatori a monte (**caspasi inizianti**)

5.6.7. CASPASI INIZIANTI E CASPASI EFFETTRICI

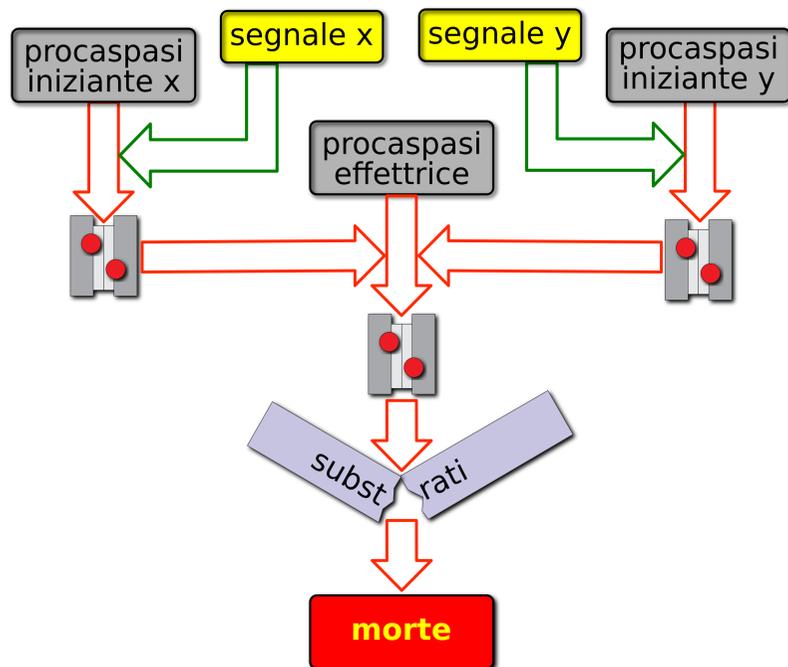


Figura 5.13. Caspasi iniziatrici e caspasi effettrici

- L'osservazione che segnali di morte distinti danno origine alle stesse manifestazioni di apoptosi si spiega con il fatto che le caspasi effettrici sono attivate da differenti caspasi inizianti, ciascuna delle quali è a sua volta attivata da segnali diversi
- La cascata delle caspasi, come tutte le cascate di proteasi, non è mai completamente ferma: infatti le caspasi hanno vita media breve
- Durante l'attivazione dell'apoptosi la velocità di attivazione delle caspasi viene accelerata al massimo

5.6.8. ATTIVATORI ED INIBITORI DELLE CASPASI

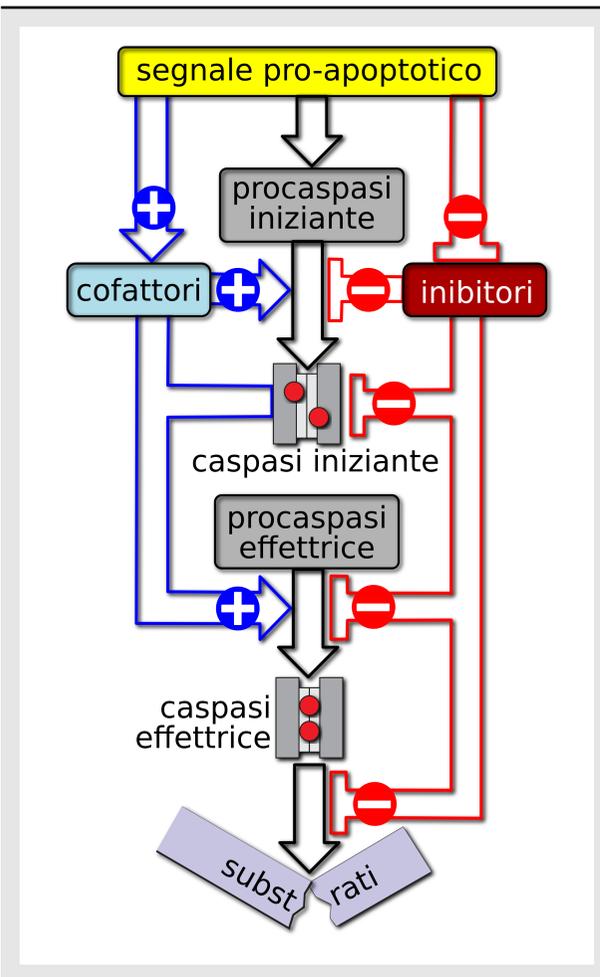


Figura 5.14. Attivatori ed inibitori delle caspasi

Le caspasi sono regolate da influenze opposte di inibitori ed attivatori
Ciascun segnale apparentemente innesca tre vie:

- *attivazione dei cofattori*

- es.: traslocazione del citocromo c dai mitocondri al citoplasma

- *modificazioni delle caspasi stesse*

- es.: traslocazione della caspasi 8 ad un complesso con un recettore

- *inattivazione di inibitori*

La regolazione è ancora più complicata e richiede, per esempio, alcuni *step* auto-catalitici

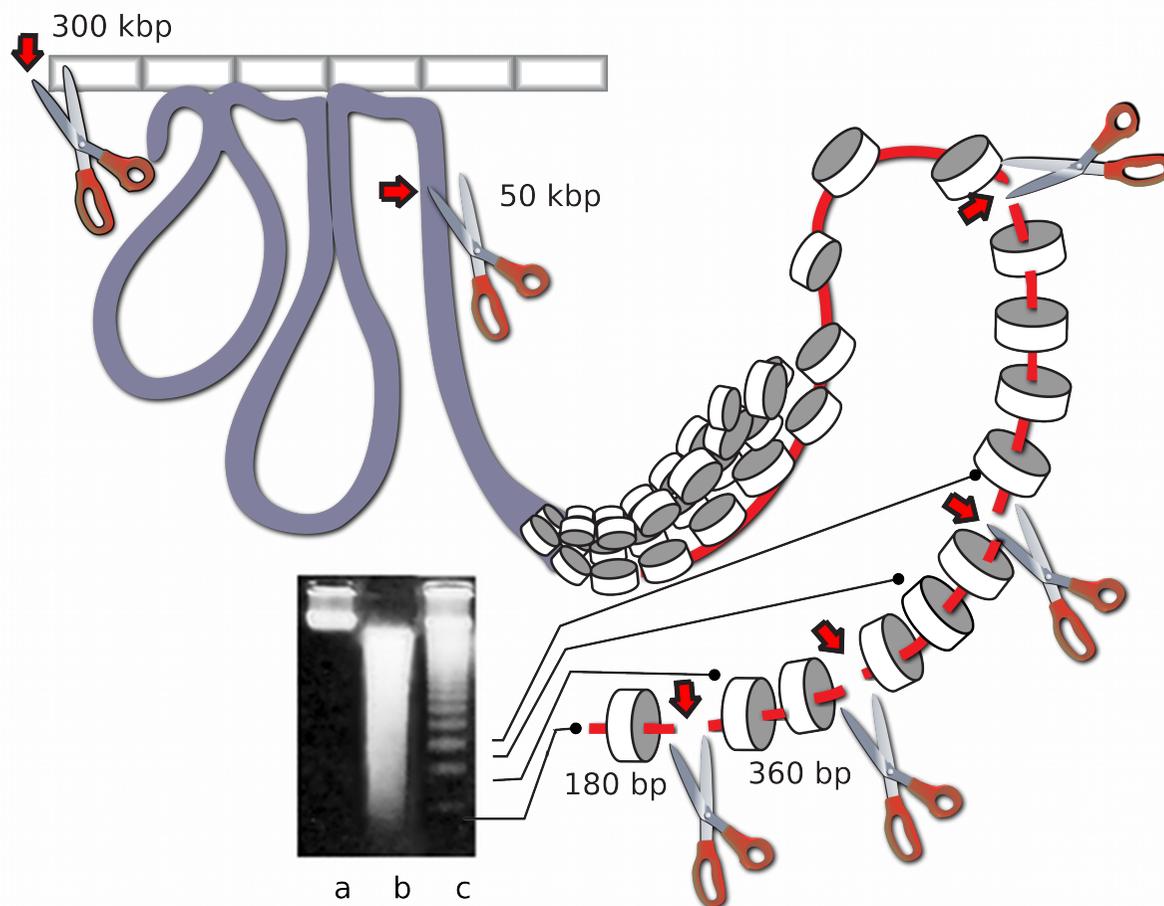
Complessivamente si può affermare che:

- *la complessità della regolazione dell'innesco dell'apoptosi è pari alla complessità della regolazione del ciclo mitotico*

5.6.9. LA TRANS-GLUTAMMINASI

☞ La trans-glutamminasi tissutale è un enzima dipendente da Ca^{2+} che durante il processo apoptotico induce la formazione di legami crociati, a carico di proteine sia citoplasmatiche che di membrana formando una impalcatura che mantiene l'integrità cellulare durante la formazione dei corpi apoptotici

5.6.10. LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA NUCLEARE DURANTE L'APOPTOSI



In corso di apoptosi il materiale genetico nucleare va incontro ad una progressiva frammentazione del DNA (misurata dalla lunghezza dei frammenti in bp (*base pairs*, paia di basi) con formazione di:

- frammenti di 300 kbp
- frammenti di 50 kbp
- frammenti di 0.18 kbp

Figura 5.15. Effetti dell'attivazione delle endonucleasi nell'apoptosi. Liberamente tratto da Kerr (1991) e Wyllie (1993).

Nell'insero elettroforesi di DNA: (a) DNA estratto da cellule sane; (b) DNA estratto da cellule in necrosi con caratteristico aspetto a smear (striscio) dovuto a frammentazione casuale del DNA con formazione di frammenti di lunghezza variabile; (c) DNA estratto da cellule in apoptosi: si noti l'aspetto a ladder (scala) dovuto alla formazione di frammenti di dimensioni precise.

bp: base pairs (paia di basi)

5.7. Regolazione del processo apoptotico

 Mentre l'induzione dell'apoptosi è un fenomeno cellulo-specifico, le vie biochimiche coinvolte nell'esecuzione e nella successiva eliminazione delle cellule possono essere comuni a stimoli e cellule diverse

Induzione del processo apoptotico

 Comprende l'invio del segnale alla cellula e le vie primarie di trasduzione da esso innescate
Esiste un numero relativamente esiguo di vie biochimiche che portano all'apoptosi. La ridondanza del sistema fa sì che un singolo induttore possa innescare vie multiple in modo da assicurare che il processo apoptotico avvenga anche in caso di difetti o di blocco di una delle sequenze biochimiche

Integrazione del processo apoptotico

 Rappresenta la fase in cui la cellula "decide" di andare o meno in apoptosi
Ciò dipende in parte dalla presenza o assenza di una serie di molecole a funzione repressiva e dalla natura della risposta cellulare a quel dato segnale
La decisione di intraprendere il processo di morte è perciò il risultato dell'integrazione di differenti vie biochimiche che possono essere considerate come sensori cellulari in grado di riconoscere il segnale apoptotico come tale o, al contrario, di opporvisi

Esecuzione del processo apoptotico

 E' il meccanismo centrale del processo apoptotico comprendente tutti quegli eventi che sono responsabili dal punto di vista operativo del processo stesso
La via attivata è unica, anche se caratterizzata da una certa ridondanza di elementi che eseguono lo stesso compito

5.7.1. I GENI DELLA FAMIGLIA BCL-2 ARBITRI DELLA SOPRAVVIVENZA CELLULARE



 I geni della famiglia *bcl-2* codificano per proteine coinvolte nella regolazione, in senso positivo o negativo, del processo apoptotico

I vari membri della famiglia, grazie alla presenza di domini altamente conservati, sono in grado di interagire formando omo- ed eterodimeri, che rappresentano la forma attiva delle proteine stesse

I membri della famiglia *bcl-2* sono essenziali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare dei principali organi e sistemi, e mutazioni che li interessano sono implicate nelle neoplasie maligne

La famiglia *bcl-2* è composta da tre membri principali:

- *bcl-2*
- *bax*
- *bcl-x*

 *bcl-2*, è un proto-oncogene dotato di attività **anti-apoptotica**, sovra-espresso in seguito a traslocazione
bcl-2 codifica per una proteina integrale di membrana, localizzata prevalentemente sulla membrana mitocondriale esterna, sul reticolo endoplasmico e sulla membrana nucleare

 *bax*, è invece dotato di **attività pro-apoptotica**: antagonizza l'azione di *bcl-2*
bax permette alle cellule che lo esprimono di andare incontro ad apoptosi nonostante la presenza del prodotto di *bcl-2*

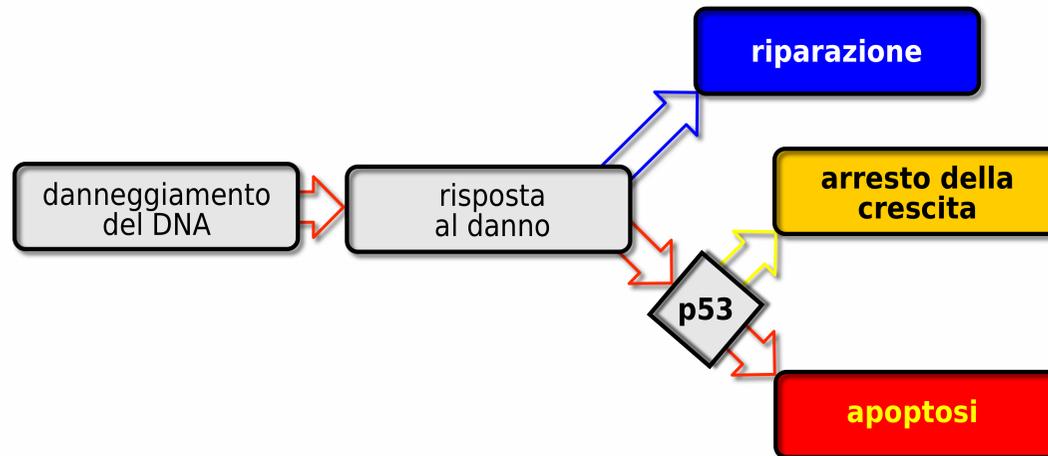
 *Bcl-x*, tramite *splicing* alternativo, produce due proteine, *bcl-xl* (ad azione anti-apoptotica) e *bcl-xs* (ad azione pro-apoptotica)

5.7.2. p53: MEDIATORE CHIAVE DELLA RISPOSTA CELLULARE AL DANNO SUL DNA

 Il gene codificante per la proteina p53 è un gene onco-soppressore il cui ruolo principale è di regolare in senso negativo la proliferazione cellulare

- danni diretti al DNA ad opera di farmaci anti-tumorali, agenti alchilanti e intercalanti, radiazioni ionizzanti, ecc., inducono un accumulo di p53
 - segue l'arresto nella fase G1 del ciclo cellulare per permettere la riparazione del danno stesso ed evitare così la trasmissione di lesioni geniche alla progenie
 - nel caso che il danno sia troppo ingente per essere riparato, p53 promuove invece l'eliminazione della cellula danneggiata mediante l'induzione di apoptosi
 - il segnale specifico stimolante l'espressione di p53 risulta essere la presenza di rotture nella molecola del DNA, indotte direttamente dall'agente danneggiante o indirettamente nei tentativi di riparazione.
 - l'attività pro-apoptotica di p53 è legata alla sua azione come fattore di trascrizione: p53 stimola l'espressione di bax, gene ad azione pro-apoptotica
- p53 è, a livello della fase di integrazione, un "sensore cellulare" di importanza critica nel determinare la risposta della cellula a tutti gli agenti che inducono danni al DNA
- cellule in cui p53 sia mutata (come accade nel 50% dei tumori umani) non sono più in grado di riconoscere il danneggiamento del DNA come uno stimolo pro-apoptotico, pur mantenendo la capacità di innescare l'apoptosi in risposta a stimoli di diversa natura (es. in caso di stimolazione del *death receptor*, CD95)

5.7.3. DANNO AL DNA ED APOPTOSI



Il modo di pensare alla morte cellulare come conseguenza di un danneggiamento cellulare è cambiato nel tempo

In particolare oggi è riconosciuto un modello in cui p53 ha un ruolo chiave

- se il danno al DNA è lieve: riparazione
- se il danno al DNA non è riparabile ma non compromette le funzioni cellulari: arresto della crescita
- se il danno al DNA compromette la funzionalità cellulare: induzione dell'apoptosi

Figura 5.16. Risposte al danno al DNA e ruolo di p53

5.8. Disregolazione dell'apoptosi

 La disregolazione dell'apoptosi è alla base dell'inizio e/o della progressione di molte malattie umane

Tabella 5.7: Disregolazione dell'apoptosi

Inibizione apoptosi

Neoplasie maligne

- linfomi follicolari
- carcinomi con mutazioni di p53
- tumori ormono-dipendenti (mammella, prostata, ovaio)

Malattie autoimmuni

- lupus eritematoso sistemico
- glomerulonefrite immuno-mediata

Infezioni virali

- adenovirus, poxvirus

Aumento apoptosi

Malattie neurodegenerative

- morbo di Alzheimer
- morbo di Parkinson
- sclerosi laterale amiotrofica
- retinite pigmentosa
- sindromi mielo-displasiche

Danni ischemici

- infarto miocardico
- ictus
- danno da riperfusione

AIDS

Anemia aplastica

Danno epatico da alcool

5.8.1. DANNO CELLULARE, NEOPLASIE MALIGNI ED APOPTOSI

-  Negli organismi pluricellulari, mutazioni nelle cellule somatiche che interessino geni critici nella regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, causano neoplasie anche fatali
- La riparazione del danno è una delle opzioni, tuttavia la relativa non essenzialità di singole cellule nei metazoi fa sì che l'ablazione della cellula offesa (e offesa) sia una strategia più sicura
- Il danneggiamento del sistema che verifica i danni al DNA o che li ripara predispone in maniera molto grave alle neoplasie maligne
- Anche quando si abbia una mutazione oncogenica, esistono potenti meccanismi che limitano l'espansione delle cellule colpite sopprimendo la loro proliferazione od innescando il loro suicidio: apoptosi
-

5.8.2. RELAZIONI RECIPROCHE TRA LE ONCOPROTEINE RAS, MYC E BCL-2

-  ● le proprietà intrinseche di inibizione della crescita delle singole oncoproteine indicano che solo in combinazione possono dare origine ad una proliferazione cellulare produttiva
- quando le proteine sono attivate in un modo coordinato le loro attività di inibizione della crescita (morte o arresto) sono bloccate dalle attività di promozione della crescita delle altre
- tuttavia quando innescate unilateralmente, come avviene dopo una mutazione oncogenica, le funzioni di inibizione della crescita generalmente predominano e bloccano la cellula danneggiata
- Questo significa che, nella maggior parte dei casi, una mutazione potenzialmente oncogenica porta la cellula all'apoptosi, prevenendo lo sviluppo di un tumore
-

5.8.3. RELAZIONE TRA ONCOGENI E SEGNALI DEATH

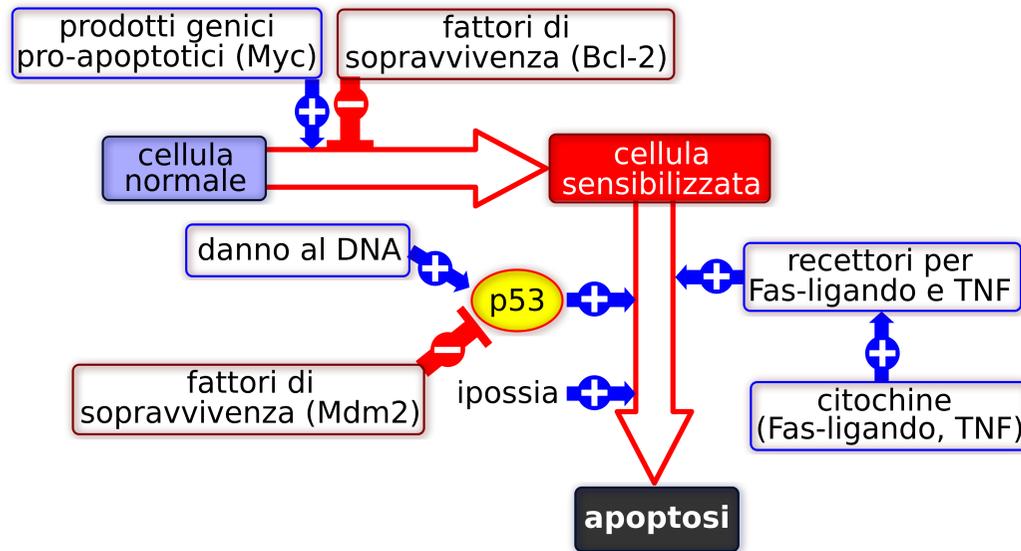


Figura 5.17. Apoptosi e p53. Modello di relazione tra oncogeni e vari segnali death in cui le mutazioni che alterano la regolazione della crescita sensibilizzano le cellule ai segnali pro-apoptotici

La regolazione dell'apoptosi è un fenomeno molto complesso che prevede l'integrazione di molti segnali pro-apoptotici ed anti-apoptotici

La complessità e la molteplicità dei segnali fa sì che un singolo segnale sbagliato possa essere assorbito nell'insieme senza dare obbligatoriamente origine al processo apoptotico

Si ricorda che complessità e molteplicità sono sempre presenti in tutti i meccanismi regolatori

5.8.4. FARMACO-RESISTENZA, APOPTOSI E p53

 Il principale limite delle terapie anti-tumorali è la comparsa all'interno della popolazione neoplastica di cellule resistenti a molti farmaci

I meccanismi principali di resistenza multipla ai farmaci chemioterapici antitumorali sono

- sovra-espressione di una glicoproteina di membrana (glicoproteina P) avente funzione di pompa che estrude il farmaco assunto e impedisce il raggiungimento di concentrazioni intra-cellulari ottimali per l'azione del farmaco stesso (meccanismo più comune)
- acquisizione della resistenza all'induzione di apoptosi

 Molti dei farmaci anti-neoplastici agiscono provocando danni al DNA

Affinché una cellula con il DNA pesantemente danneggiato possa morire per apoptosi è necessaria la presenza della **proteina p53**, che funge da "sensore" del danno al DNA

La proteina p53 risulta essere mutata nel 50% dei tumori umani

Le mutazioni di p53 sono:

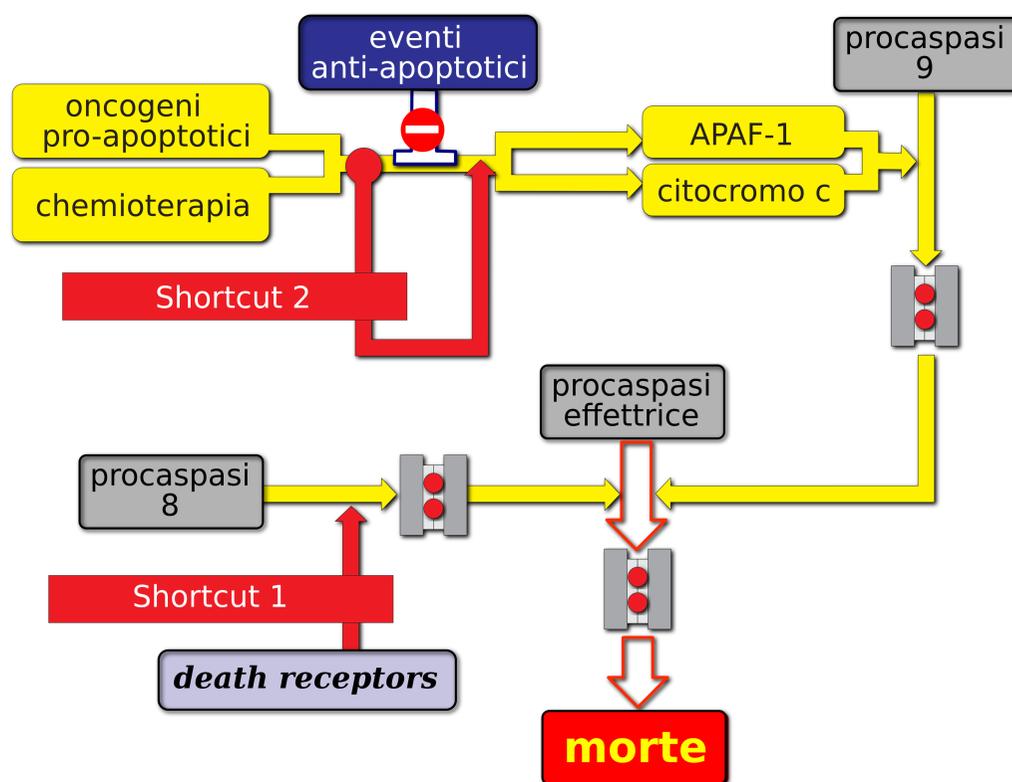
- in molti casi una lesione genetica primaria nella storia naturale del tumore
- in altri casi possono insorgere in seguito, come lesione secondaria

In quest'ultimo caso l'inattivazione di p53 può rappresentare un meccanismo di resistenza in quanto rende insensibili le cellule tumorali a tutti quegli agenti che agiscono provocando danni al DNA

5.8.5. ATTIVAZIONE DELLE CASPASI NELLE CELLULE CANCEROSE FARMACO-RESISTENTI



La maggior parte dei farmaci chemioterapici inducono apoptosi indirettamente: infliggono un danno cellulare trasdotto in una attivazione delle caspasi



Nelle cellule resistenti alla chemioterapia il meccanismo apoptotico fallisce a causa di un difetto nelle vie di trasmissione dei segnali che conducono all'attivazione delle caspasi (eventi anti-apoptotici).

Es.:

- mutazione di p53
- sovra-espressione di bcl-2

Per superare questa resistenza si possono impostare due strategie:

- attivare i complessi dei recettori *death*, con conseguente attivazione della loro caspasi iniziante corrispondente (caspasi-8) (*shortcut 1*)
- *by-pass* della parte difettiva della via per ripristinare il segnale innescato dai farmaci chemioterapici (*shortcut 2*)

Figura 5.18. Caspasi e cellule neoplastiche farmaco-resistenti

5.9. Morte cellulare programmata non apoptotica

 Sono molteplici le forme di morte cellulare programmata non apoptotica, alcune delle quali tipicamente fisiologiche altre legate a processi fisiopatologici

- anoikis
- piroptosi
- auto-fagocitosi
- cornificazione
- eccito-tossicità
- degenerazione walleriana
- frammentazione dei megacariociti

5.9.1. ANOIKIS

 L'anoikis (Frisch 2001) è un processo di morte cellulare programmata indotta dal distacco dalla matrice extra-cellulare di cellule che normalmente sono saldamente ancorate alla matrice stessa

- solitamente le cellule in tessuto rimangono ancorate per garantire quella prossimità che è necessaria per la funzione
- la matrice extra-cellulare fornisce a queste cellule segnali essenziali per la crescita e la sopravvivenza
- quando le cellule si staccano dalla matrice extra-cellulare si ha una perdita delle normali interazioni membrana-matrice che può innescare l'anoikis

Tuttavia le cellule neoplastiche maligne possono sfuggire a questo meccanismo di controllo e invadere altri organi

5.9.2. PIROPTOSI

 La piroptosi (Bergsbaken 2007) è una forma morte cellulare programmata associata a risposte antimicrobiche durante l'infiammazione

- in ciascun macrofago entro alcuni minuti dall'infezione si forma un singolo grande piroptosoma (formazione supra-molecolare composta da proteine in grado di attivare la caspasi-1)
- il piroptosoma attiva la caspasi-1
- la caspasi-1 inizia i processi della morte cellulare programmata con effetti dissimili dall'apoptosi propriamente detta in quanto attiva la flogosi

 La piroptosi è morfologicamente e meccanicisticamente diversa dalle altre forme di morte cellulare
La dipendenza dall'attivazione della caspasi 1 ne è l'aspetto distintivo

- la caspasi 1 non è coinvolta nel processo apoptotico
- le caspasi 3, 6, 8 ed i loro substrati non sono coinvolti nella piroptosi
- la perdita di integrità mitocondriale ed il rilascio di citocromo c non hanno luogo nella piroptosi

La formazione di pori dipendente dall'attivazione della caspasi 1

- dissipa i gradienti ionici cellulari
 - produce un aumento della pressione osmotica con ingresso di acqua e rigonfiamento cellulare
 - produce la conseguente lisi cellulare
 - produce il rilascio di contenuti intra-cellulari pro-infiammatori
-

Schema generale della piroptosi

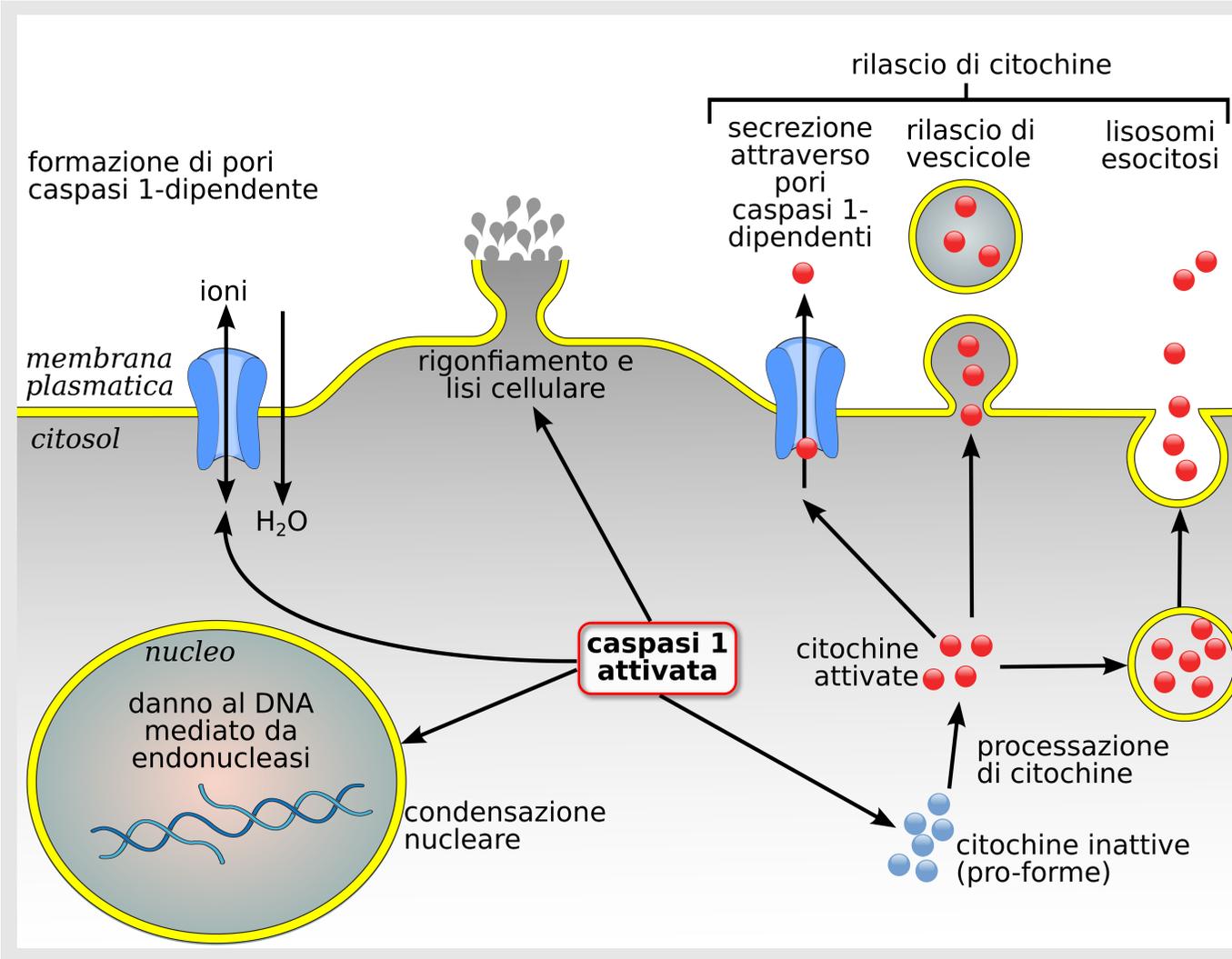


Figura 5.19. Schema generale della piroptosi: rilascio di citochine infiammatorie

Liberamente tratto da Bergsbaken (2004)

La caspasi 1 viene attivata in risposta a stimoli diversi ma produce un'unica risposta di morte cellulare programmata chiamata piroptosi

- l'attivazione della caspasi 1 porta alla formazione rapida di pori nella membrana plasmatica che dissipano i gradienti ionici transmembrana, inducendo rigonfiamento e lisi osmotica
- la caspasi 1 processa le pro-forme di alcune citochine e ne induce la secrezione sotto forma attivata
- la caspasi 1 induce la rottura del DNA cromosomico, senza un pattern discreto come avviene nell'apoptosi
- si osserva anche condensazione della cromatina nucleare, senza frammentazione del nucleo

5.9.3. AUTO-FAGOCITOSI

 L'auto-fagocitosi (Kundu 2008) può non solo essere implicata nel mantenimento dell'omeostasi delle strutture intra-cellulari, rappresentando il modo attraverso cui strutture invecchiate o danneggiate possono essere rimosse, lasciando spazio a strutture neo-sintetizzate, ma essere anche un modalità di morte cellulare:

- l'auto-fagocitosi che porta alla morte cellulare è caratterizzata dalla formazione di vacuoli giganti che inglobano gli organuli cellulari con una sequenza specifica che porta infine alla distruzione nucleare
-

5.9.4. CORNIFICAZIONE

 La cornificazione è il processo attraverso il quale si forma la barriera epidermica nell'epitelio pavimentoso pluri-stratificato della cute

A livello cellulare la cornificazione è caratterizzata da:

- produzione di cheratina
 - produzione piccole proteine ricche di prolina e di transglutamminasi che producono un guscio cornificato al sotto della membrana citoplasmatica
 - differenziamento terminale
 - perdita di nuclei ed organuli, nelle fasi finali della cornificazione il metabolismo si ferma e le cellule si riempiono di cheratina
-

5.9.5. ECCITO-TOSSICITÀ



La eccito-tossicità (Baylock 1994) è il processo patologico attraverso cui le cellule nervose vengono danneggiate ed uccise da una eccessiva stimolazione da parte di neuro-trasmittitori

Es.:

- alti livelli di glutammato causano eccito-tossicità attraverso l'influsso di alti livelli di Ca^{2+}
- alti livelli di calcio citoplasmatico attivano una serie di enzimi catabolici come proteasi, fosfolipasi, endonucleasi
- gli enzimi attivati danneggiano le strutture cellulari citoscheletriche, le membrane, il DNA

L'eccito-tossicità è coinvolta in

- perdita dell'udito da sovra-esposizione sonora
- una serie di malattie neurodegenerative

5.9.6. DEGENERAZIONE WALLERIANA



La degenerazione walleriana (Waller 1850) è un processo che si verifica quando una fibra nervosa viene tagliata o schiacciata, nel corso del quale la parte di assone che è separata dal nucleo degenera

La degenerazione walleriana si verifica sia nel sistema nervoso periferico che nel sistema nervoso centrale

Rappresenta la morte di una sola parte della cellula, fenomeno unico

5.9.7. FRAMMENTAZIONE DEI MEGACARIOCITI



I megacariociti si frammentano dando origine alla piastrine con un meccanismo programmato del tutto simile all'apoptosi con l'eccezione della mancanza di espressione sulla superficie cellulare dei recettori per il riconoscimento e la fagocitosi da parte delle cellule adiacenti dei corpi apoptotici formati

5.10. Principali fonti utilizzate

Baylock, R.L. (1994) *Excitotoxins: The Taste That Kills*. Health Press, Albuquerque, NM

Bergsbaken, T., Fink, S.L., Cookson, B.T. (2007) *Pyroptosis: host cell death and inflammation*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 99-109

Cohen, J.J. (1993) *Apoptosis*. *Immunol. Today* 14, 126-130

Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. (1999) *Robbins pathologic basis of disease*. VI ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia

Croce, C.M. (2008) *Oncogenes and cancer*. *N. Engl. J. Med.* 358, 502-511

Frisch, S.M., Screaton, R.A. (2001). *Anoikis mechanisms*. *Cur. Op. Cell Biol.* 13, 555-562

Kerr, J.F.R., Harmon, B.V. (1991) *Definition and incidence of apoptosis: a historical perspective*. In: Tomei, L.D., Cope, F.O. (eds.) *Apoptosis: the molecular basis of cell death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Kundu, M., Thompson, C.B. (2008). *Autophagy: Basic Principles and Relevance to Disease*. *Ann. Rev. Pathol.* 3, 427-455

Rubin, R., Farber, J.L. (1994) *Pathology*. II ed. Lippincott, Philadelphia

Waller A. (1850) *Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres*. *Philos. Trans. R. Soc. London*, 140, 423-429

Wyllie, A.H. (1993) *Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture)*. *Br. J. Cancer* 67, 205-208

Siti web

bmt.tue.nl

visitato il 29/08/2008

accessibile il 29/06/2012

ihm.nlm.nih.gov (Recklinghausen)

visitato il 17/10/2011

accessibile il 29/06/2012

medic.usm.my

visitato il 29/08/2008

accessibile il 29/06/2012

ocw.mit.edu

visitato il 29/08/2008

accessibile il 29/06/2012

[wikipedia commons: signal transduction pathways](http://wikipedia.commons:signal_transduction_pathways)

visitato il 17/10/2011

accessibile il 29/06/2012

