



L'aspetto morfologico della necrosi è il risultato di due processi che essenzialmente agiscono insieme:

1) la **digestione enzimatica** delle cellule e

2) la **denaturazione delle proteine**. Gli enzimi catalitici derivano sia dai lisosomi delle cellule morte (autolisi) sia dai leucociti sopraggiunti (eterolisi).

Le cellule necrotiche e i loro resti scompaiono per l'intervento del processo infiammatorio, che segue sempre la morte per necrosi.

#### Aspetti morfologici di tessuti necrotici:

**Necrosi coagulativa.** Denaturazione delle proteine. Il danno o l'aumento dell'acidità intracellulare causano denaturazione non solo delle proteine strutturali, ma anche di quelle enzimatiche, bloccando in questo modo la proteolisi della cellula. I tessuti appaiono consistenti e pallidi, i profili cellulari e l'architettura del tessuto sono ancora riconoscibili. Il processo della necrosi coagulativa è caratteristico della morte cellulare per ipossia in tutti i tessuti, ad eccezione del cervello. L'infarto del miocardio è un eccellente esempio.

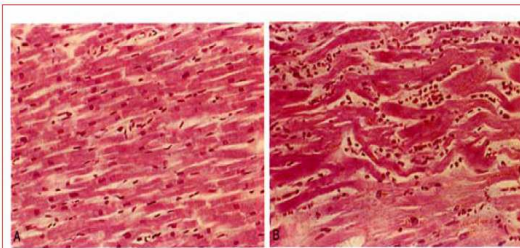
**Necrosi colliquativa.** Si verifica quando prevale la digestione enzimatica. Il processo colliquativo porta a completa digestione le cellule morte, con perdita dell'architettura cellulare e trasformazione del tessuto in una massa liquida e viscosa. Tale necrosi è caratteristica delle infezioni focali batteriche e della morte da ipossia delle cellule del sistema nervoso centrale. Nel cervello c'è un alto contenuto di lisosomi nei neuroni e una relativa mancanza di proteine strutturali.

**Necrosi caseosa.** Il tessuto necrotico è morbido e bianco come il formaggio. Le cellule morte formano una massa proteica amorfa, che non lascia intravedere alcuna architettura. È tipica della tubercolosi.

**Steatonecrosi.** Questo termine indica un focolaio di necrosi in cui si sia verificata distruzione dei lipidi. Questa evenienza è tipica del tessuto adiposo, che va incontro a necrosi per liberazione degli enzimi pancreatici, in corso di una pancreatite acuta. L'area necrotica assume un colore bianco e diventa dura come gesso, perché gli acidi grassi liberati reagiscono con il calcio.

**Necrosi fibrinoide.** Si verifica a livello della parete dei vasi, dove sulla zona necrotica si deposita la fibrina.

#### NECROSI COAGULATIVA

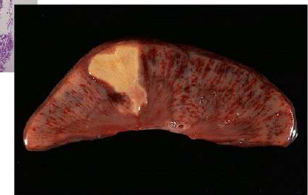


A, Miocardio normale. B, miocardio con necrosi coagulativa (due terzi superiori della figura). Sono visibili le fibre del miocardio eosinofile e prive di nucleo. I leucociti nell'interstizio costituiscono una reazione precoce alla necrosi del muscolo. Si confronti con A e con le fibre normali nella parte inferiore della figura.

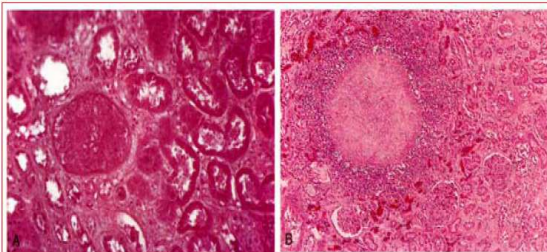
#### NECROSI COAGULATIVA



Infarto del rene

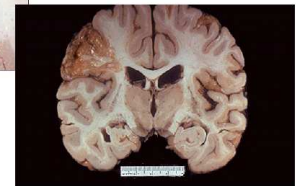


#### NECROSI COAGULATIVA e COLLIQUATIVA

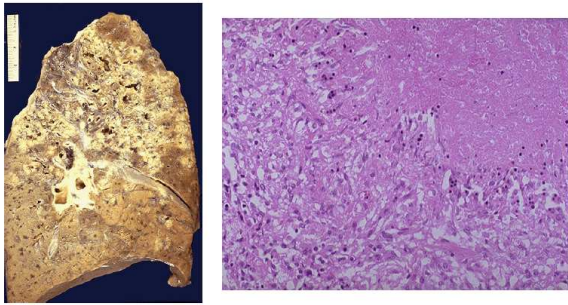


Necrosi coagulativa e colliquativa. A, infarto del rene con necrosi coagulativa, perdita dei nuclei e addensamento del citoplasma con conservazione dell'architettura di base dei glomeruli e dei tubuli. B, necrosi colliquativa nel rene causato da infezione fungina. Il sito è riempito da leucociti e resti cellulari, che generano un ascesso renale che cancella la normale architettura.

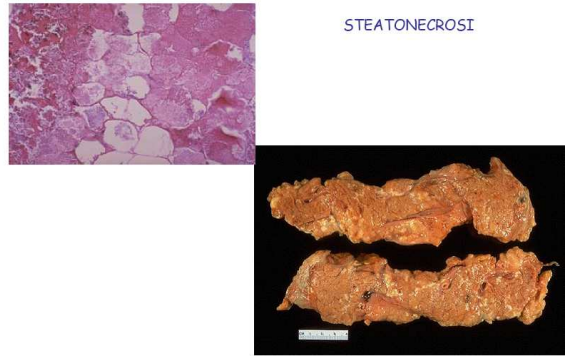
#### NECROSI COLLIQUATIVA



**NECROSI CASEOSA**



**STEATONECROSI**

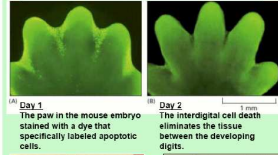


**MORTE CELLULARE PROGRAMMATA (PCD)**

- APOPTOSI (morte cellulare geneticamente programmata di tipo I)
- MORTE AUTOFAGICA (morte cellulare programmata di tipo II)

**Cell death in development**

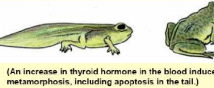
**Sculpting the Digits in Developing Mouse Paw**



(TUNEL assay)

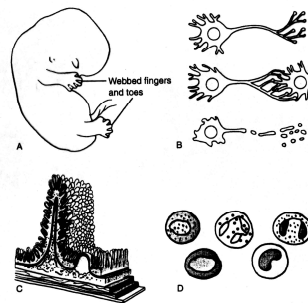
- Rimodellamento di strutture, degli organi nell'organogenesi
- Eliminazione di strutture inutilizzate
- Controllo del numero cellulare
- Eliminazione di cellule abnormi e non funzionali
- Produzione di cellule differenziate

**Metamorphosis of a Tadpole into a Frog**

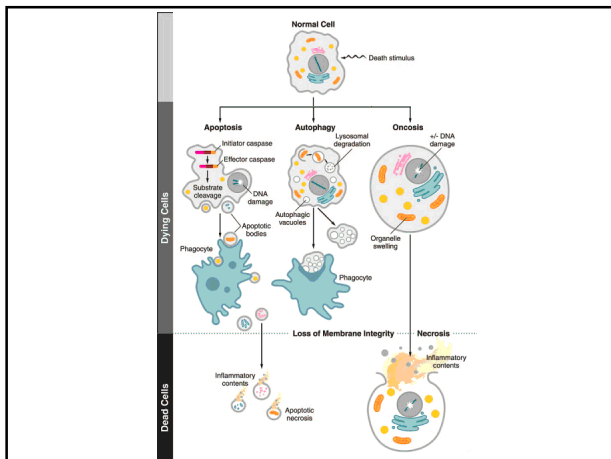


(An increase in thyroid hormone in the blood induces metamorphosis, including apoptosis in the tail.)

**Esempi di apoptosi**



- ✓ Membrane interdigitali del feto;
- ✓ Sviluppo connessioni neuronali;
- ✓ Ricambio cellule dei villi intestinali;
- ✓ Rimozione cellule ematopoietiche vecchie
- ✓ Delezione linfociti T autoreattivi nel timo



**Caratteristiche della necrosi**

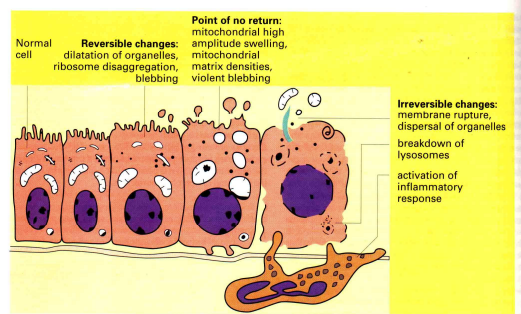


Fig. 3.9 Major events in necrosis.



### Caratteristiche dell'apoptosi

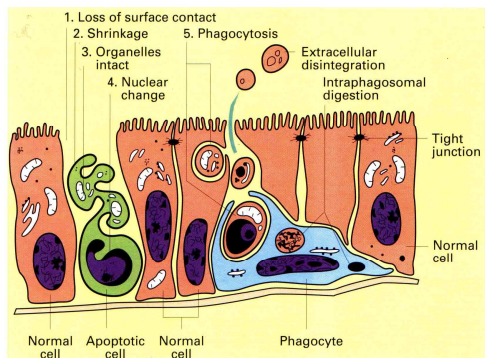


Fig. 3.1 Key morphological changes in apoptosis.

### Eventi caratteristici dell'apoptosi

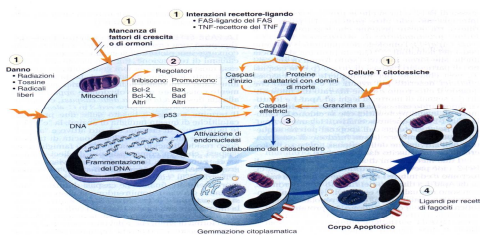
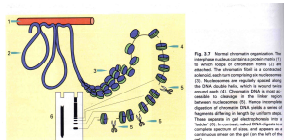


Figura 3.20. Rappresentazione schematica degli eventi caratteristici dell'apoptosi. I diversi stimuli apoptotici sono contrapposti con (1). Questi comprendono ligandi specifici che inducono morte cellulare (fattore di crescita tumorale TNF) e ligandi del FAS, mediatore di morte cellulare indotta da cellule citotossiche (destra). Altri agiscono attraverso proteine adattatrici e caspasi di inizio livello (Fig. 3.22), o a valle di eventi degradativi intracellulari, che comprendono la frammentazione della cromatina nucleare e la rottura del citoscheletro. Non è mostrata la formazione di legami crociati tra le proteine indotta dalla transglutaminasi. (4) Il risultato finale è la formazione di corpi apoptotici che contengono il ligante e la captazione da parte di cellule legatrici.

### Caratteristiche biochimiche dell'apoptosi

Si tratta di un processo, che richiede espressione di geni specifici, finemente controllato dalla cellula (oncogeni e onco-soppressori)

- ✓ Taglio delle proteine;
- ✓ Formazione di legami crociati fra le proteine;
- ✓ Rottura del DNA (a livello internucleosomiale ad opera di endonucleasi);
- ✓ Ricognizione fagocitaria (fosfatidilserina).



### L'APOPTOSI

- processo di morte cellulare identificata sulla base delle peculiari caratteristiche morfologiche in molti organismi pluricellulari filogeneticamente distanti tra loro (Kerr et al., 1972);
- l'APOPTOSI si verifica in tutti i tipi di tessuti e nel corso dell'intera vita di un organismo; ogni giorno un individuo adulto perde dai 50 ai 70 x10<sup>6</sup> cellule per apoptosi; è la principale forma di morte cellulare di tipo fisiologico;
- un altro tipo di morte cellulare programmata di tipo fisiologico è l'autofagia, autodegradazione delle proteine cellulari per attivazione dei lisosomi con formazione di autofagosomi

### 1972: John Kerr, Andrew Wyllie and Alistair Currie : APOPTOSI

Apoptosis is an essential process for any multi-cellular organism and has numerous roles in the body: **development of embryonic tissue, maintaining constant cell number, preventing autoimmune response by B and T cells and finally, cells with severe DNA damage undergo apoptosis.** Regulation of apoptosis is vital as too little or too much cell death may lead to problems, including **developmental defects, neurodegeneration, autoimmune diseases and cancer.** Occasionally the apoptotic pathway may undergo a mutation and become damaged or the initiation signals may become blocked allowing a damaged cell to thrive, generating a tumour.

### Apoptotic characteristics of the cell:

- The **nucleosomal ladder** is formed by the action of a nuclease, known as **caspase-activated DNase (CAD)** that exists as an inactive complex with an inhibitory subunit labelled ICAD and is activated by caspase 3, which mediates cleavage of the inhibitory subunit releasing the catalytic protein resulting in DNA degradation seen in apoptosis.
- Another characteristic observed in an apoptotic cell caused by caspase cleavage is **nuclear shrinking**. Loss of cell shape is caused by the cleavage of cytoskeletal proteins such as fodrin and gelsolin.
- Another protein cleaved by caspases is **PAK2**, a member of the p21-activated kinase family that seems to be involved in the active blebbing of an apoptotic cell.

**Biochemistry of Apoptosis:**

Caspases (cysteiny aspartate specific proteinases) cause the morphological changes observed when a cell undergoes apoptosis. So far, 14 caspases have been identified, 11 of which are present in mammals. They are subdivided into two families: **the effector- and initiator-caspases**. They are known as the central executioners of apoptosis, as they exist in the cell as inactive zymogens that are activated to induce apoptosis. The mature enzyme is a heterotetramer containing two p20/p10 heterodimers and two active sites.

Caspases consist of three domains: a **highly variable NH2 domain** that regulates activation, a **large subunit of about 20 kD** and **small subunit of around 10 kD**. The Active site of a caspase contains a **cysteine residue** and cleaves the substrate at **Asp-Xxx bonds**, i.e. after the aspartic acid group.

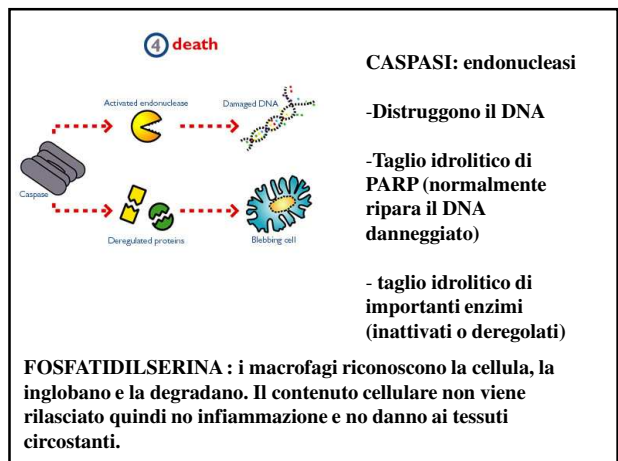
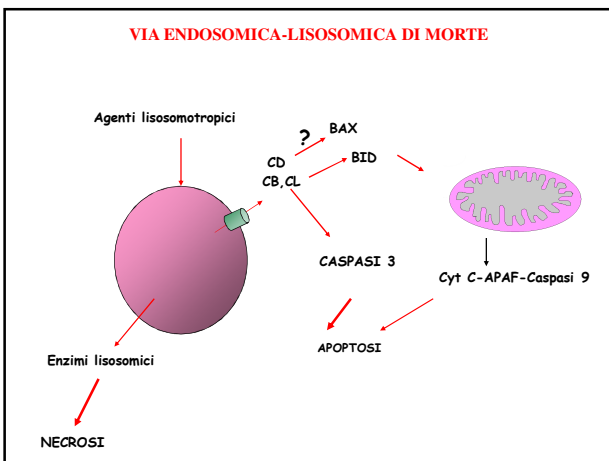
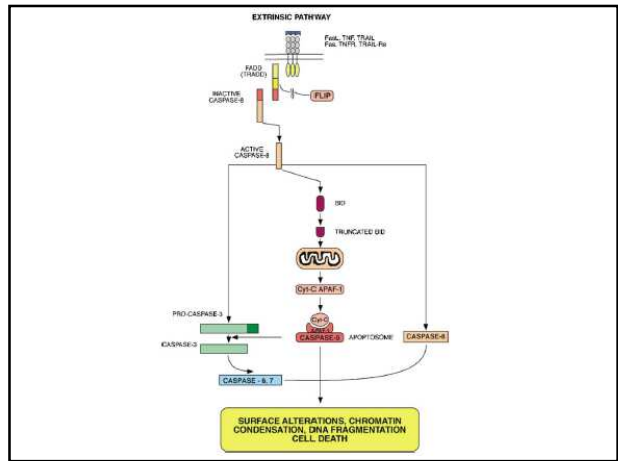
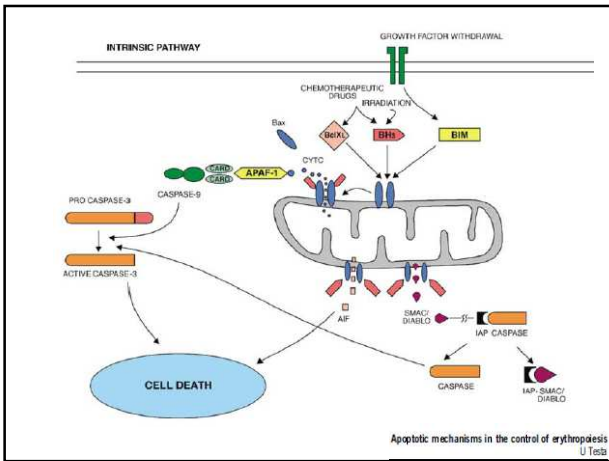
**VIA ESTRINSECA : dipende dall'attivazione dei recettori "di morte"**

L'apoptosi viene innescata dal legame di molecole segnalate con i propri recettori siti sulla membrana plasmatica (death receptor)

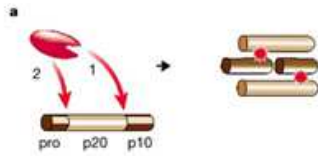
**VIA INTRINSECA : coinvolge direttamente i mitocondri**

Sono coinvolte le proteine della famiglia Bcl-2

**VIA ENDOSOMICA: coinvolge le catepsine lisosomiche**

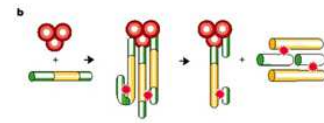


General mechanisms for caspase activation



Exposing a pro-caspase to another, previously activated caspase is the simplest mechanism for caspase activation. This is a caspase cascade used extensively by cells to activate caspase-3, -6 and -7. This cascade amplifies and integrates pro-apoptotic signals.

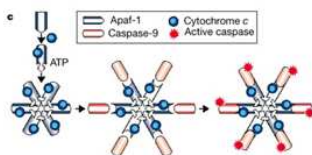
General mechanisms for caspase activation



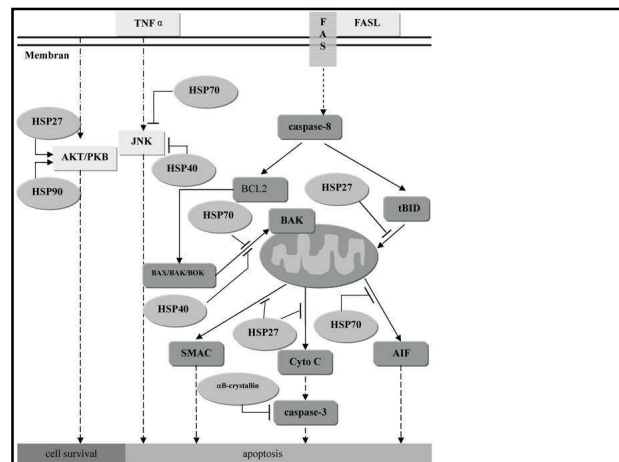
The induced proximity model

Caspase-8 is the key initiator in the death-receptor pathway. Adaptor proteins are recruited by death inducing signalling complex, resulting in a high local concentration of zymogen. These crowded conditions cause mutual cleavage of caspases and hence activation.

General mechanisms for caspase activation



Caspase-9 requires the association with a regulatory subunit such as Apaf-1. This caspase-9/Apaf-1 complex forms a haloenzyme, which is often referred to as an apoptosome, and is thought to represent the true active form of the caspase-9.



processi fisiologici in cui è coinvolta l'apoptosi:

- **ontogenesi:** sviluppo embrionale e metamorfosi degli organismi pluricellulari, nell'uomo ad es. degenerazione delle membrane interdigitali, rimodellamento della "rete neuronale" nel SNC, formazione del lume intestinale,.....;
- **omeostasi tissutale:** rimozione delle cellule alla fine del loro ciclo vitale (tessuti labili e stabili), involuzione dell'ipertrofia indotta da stimoli ormonali (gravidanza, ciclo mestruale) o fisiologici, rimozione delle cellule "danneggiate", atrofia (fisiologia e ormonale);
- **processi immunitari:** selezione clonale dei linfociti T per l'induzione della tolleranza al "self", selezione clonale dei linfociti B durante la loro maturazione; uccisione delle cellule infette da virus indotta dai linfociti;
- **processi infiammatori:** eliminazione dei macrofagi attivati durante le fasi terminali della risposta infiammatoria.

L'APOPTOSI NELLO SVILUPPO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

-Morte cellulare MORFOGENETICA: responsabile dei cambiamenti di forma durante lo sviluppo strutturale

-Morte cellulare ISTOGENETICA: associata al differenziamento di organi e tessuti

-Morte cellulare FILOGENETICA: associata alla scomparsa delle figure larvali

Mediante l'induzione di apoptosi gli organismi sono in grado di eliminare:

- cellule senescenti (fine dell'arco vitale);
- cellule danneggiate (danni subnecrogenici);
- cellule inutili (rimodellamenti) o non più utili (involutione dell'ipertofia);
- cellule potenzialmente pericolose: infette, autoreattive.

**L'APOPTOSI E' UN PROCESSO ALTAMENTE REGOLATO, CONTROLLABILE, INDUCIBILE**

**E SE NON FUNZIONA?**

**processi patologici** in cui è coinvolta l'apoptosi:

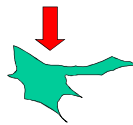
**INIBIZIONE:**

- disordini autoimmuni (lupus eritematoso sistemico)
- infezioni virali (herpesvirus, poxvirus, adenovirus)
- cancro

**INDUZIONE:**

- AIDS
- malattie neurodegenerative (morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, autismo, corea di Huntington, sindrome dell'X fragile, schizofrenia)
- sindrome mielodisplastica
- danno ischemico (ictus, infarto del miocardio)
- danno epatico da tossici (alcolismo)
- diabete

**Danno cellulare : infarto, trauma, AIDS, malattie neurodegenerative**

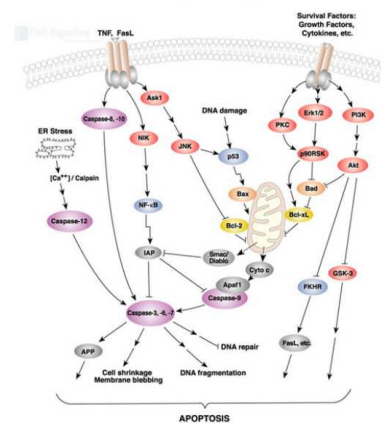


**Alterata capacità di utilizzare i cinque sensi, di deambulare, comportamento e cognizione**

**NECROSI (se insulto è intenso): passivo e senza dispendio di energia**

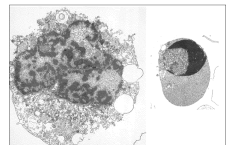
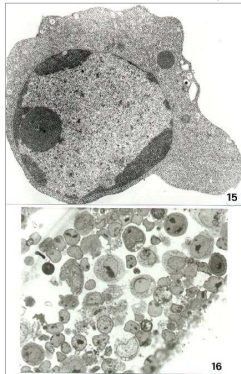
**APOPTOSI (se insulto è meno intenso): richiede energia e vie di trasduzione del segnale ben definite**

**Overview: Regulation of Apoptosis**



**Tecniche di studio dell'apoptosi:**

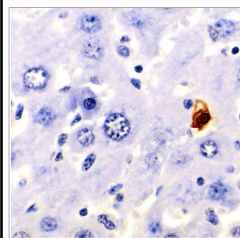
**Microscopia elettronica**



SEM images showing the chromatin condensation, crescent bodies and membrane blebbing (morphology) characteristic in apoptotic cells.

Transmission Electron Microscopy. Surface blebbing and apoptotic nuclear morphology.

**TUNEL**



TUNEL histochemical staining in murine liver, brown cell is apoptotic



La tecnica TUNEL evidenzia, in questo embrione di *Xenopus*, le cellule apoptotiche

**E**

**TUNEL**

**sham**

**RV**

**0h**

**48h**

**20µm**

**20µm**

**20µm**

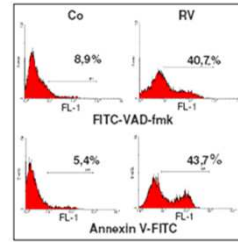


### Elettroforesi del DNA



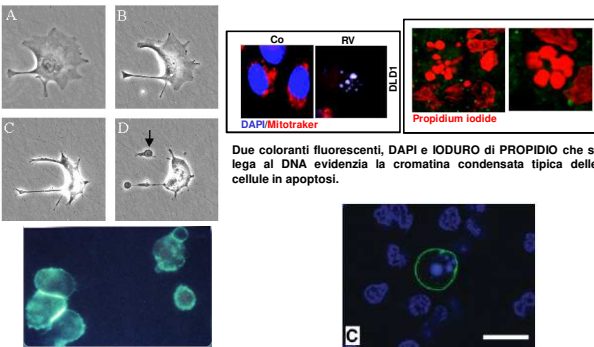
- 1- DNA di cellule in apoptosi: si può osservare il *ladder* (*scaletta*), formato da frammenti di peso molecolare discreto (multipli di nucleosomi)
- 2- DNA ad alto peso molecolare di cellule integre
- 3- DNA di cellule in necrosi: i frammenti sono di peso molecolare vario, per lo più piccolo

### Citofluorimetria a flusso



Il citofluorimetro evidenzia il legame della membrana con con l'annexina V-FITC che si lega alla fosfatidilserina esposta all'esterno della membrana plasmatica nel corso dell'apoptosi

### Microscopia ottica a contrasto di fase e fluorescenza



Due coloranti fluorescenti, DAPI e IODURO di PROPIDIO che si lega al DNA evidenzia la cromatina condensata tipica delle cellule in apoptosi.

Un colorante fluorescente (H33342 - FITC EC) che si lega alla membrana plasmatica ed evidenzia la presenza di un'estroflessione (*bleb*) della membrana di una cellula apoptotica.

Phosphatidylserine exposure detected by annexin V FITC (green; DNA, blue) in an apoptotic Jurkat cell with typically fragmented nucleus.

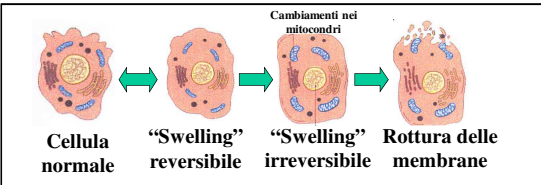
### NECROSI/APOPTOSI A CONFRONTO

Compare cell necrosis with apoptosis: how do they differ?

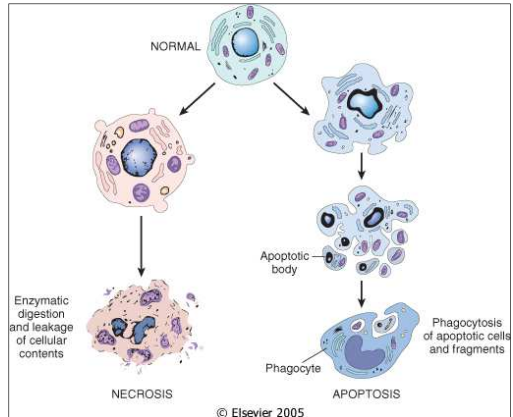
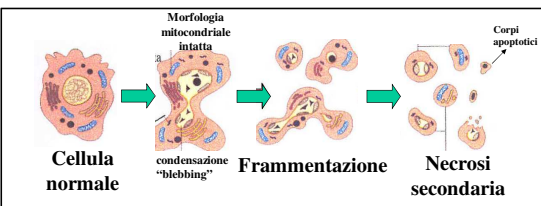
Necrosis	Apoptosis
Group of cells affected	Single or few cells selected
Caused by injurious agent/event	Programmed death
Reversible events precede irreversible	Irreversible once initiated
Energy deprivation causes changes	Events are energy-driven
Cells swell due to influx of water	Cells shrink as cytoskeleton is disassembled
Haphazard destruction of organelles and nuclear material by enzymes from ruptured lysosomes	Orderly packaging of organelles and nuclear fragments in membrane-bound vesicles
Cellular debris stimulates inflammatory cell response	New molecules expressed on vesicle membranes stimulate phagocytosis, no inflammatory response

Necrosis is a messy business. Apoptosis is an ordered event.

### NECROSI



### APOPTOSI





### APOPTOSI Vs NECROSI

<b>Membrana plasmatica integra</b>	<b>Membrana plasmatica permeabile</b>
<b>Diminuisce volume cellula</b>	<b>Aumento volume cellula</b>
<b>Organuli citoplasmatici sostanzialmente intatti</b>	<b>Frammentazione organuli citoplasmatici</b>
<b>Nucleo frammentato, DNA idrozzato (frammenti di 180-200 paia basi)</b>	<b>Nucleo può essere frammentato, idrolisi irregolare del DNA</b>
<b>Attivazione transglutaminasi</b>	<b>Non c'è attivazione transglutaminasi</b>
<b>Si formano corpi apoptotici rivestiti da membrana</b>	<b>Si verifica la dissoluzione della cellula</b>
<b>Colpisce cellule isolate, non altera tessuto</b>	<b>Colpisce gruppi di cellule o aree di tessuto distruggendo la struttura</b>
<b>Fagocitosi da parte di cellule vicine senza attivazione dell'infiammazione</b>	<b>Risposta infiammatoria e riparazione del danno con cicatrizzazione</b>

	Apoptosi	Necrosi
Istologia	Colpisce cellule isolate in tessuti vitali	Muiono gruppi di cellule distruggendo la struttura del tessuto
Citologia	Nuclei picnotici, citoplasma condensato, frammenti cellulari rotondi	Edema cellulare Nuclei intatti ma colorati debolmente
Test di esclusione del colorante	I coloranti sono inizialmente esclusi	I coloranti entrano
Ultrastruttura		
Citoplasma	Compatto, con organuli intatti	I mitocondri mostrano un rigonfiamento di gr. entità e corpi densi nella matrice
Reticolo endoplasmatico	dilatato	Profili degli organuli dilatati
Membrana plasmatica	intatta	Rotture della membrana plasmatica e delle membrane interne
Nucleo	Cromatina condensata in semilinee e toroidi Disintegrazione nucleare	Cromatina con struttura più grossolana, ma che mantiene una distribuzione normale
Circostanze	Spesso in casi di "morte programmata" Atrofia Uccisione immunitaria cellulo-mediata Tossine (basse dosi)	Ma in condizioni fisiologiche Complemento Ipossia Tossine (alte dosi)
Effetti sui tessuti	Nessuna infiammazione Fagocitosi ad opera di cellule adiacenti Rapida involuzione senza il collasso della struttura dell'intero tessuto	Infiammazione acuta Cicattrizzazione tardiva

Cell Death and Differentiation (2007) 14, 1237-1266  
© 2007 Nature Publishing Group All rights reserved 1350-9047/07 \$30.00  
www.nature.com/cdd

**Table 2 Morphological aspects of different modes of cell death<sup>a</sup>**

Cell death mode	Characteristic morphological aspects	Notes
Apoptosis (Type 1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Rounding up of the cell</li> <li>● Reduction of cellular and nuclear volume (pyknosis)</li> <li>● Retraction of pseudopodes</li> <li>● Nuclear fragmentation (karyorrhexis)</li> <li>● Little modification of cytoplasmic organelles</li> <li>● Plasma membrane blebbing</li> </ul>	<sup>a</sup> 'Apoptosis' is the original term introduced by Kerr et al. <sup>44</sup> to define a cell death with specific morphological features.
Autophagy (Type 2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Lack of chromatin condensation</li> <li>● Massive vacuolization of the cytoplasm (double-membraned autophagic vacuoles)</li> </ul>	<sup>a</sup> 'Autophagic cell death' defines cell death occurring with autophagy, though it may misleadingly suggest a form of death occurring through autophagy. <sup>45</sup>
Necrosis (oncosis) (Type 3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Cytoplasmic swelling</li> <li>● Rupture of plasma membrane</li> <li>● Swelling of cytoplasmic organelles</li> <li>● Moderate chromatin condensation</li> </ul>	<sup>a</sup> 'Necrosis' identifies, in a negative fashion, cell death lacking the features of apoptosis or autophagy, and usually appears as oncosis. <sup>46</sup>
Mitotic catastrophe	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Micronucleation</li> <li>● Multinucleation</li> </ul>	<sup>a</sup> 'Mitotic catastrophe' refers to a cell death occurring during or shortly after a failed mitosis. <sup>11</sup>

