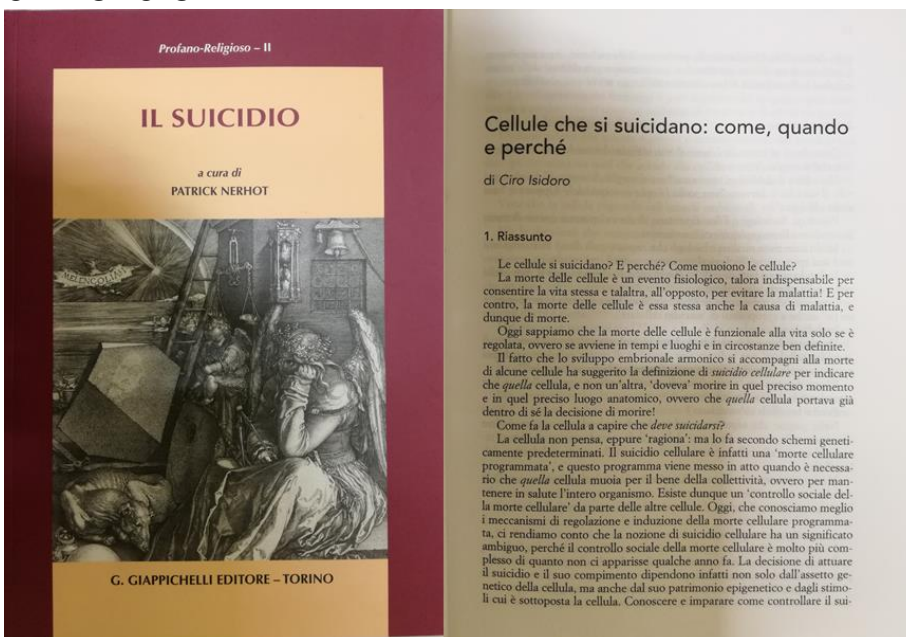


CONVEGNO

IL SUICIDIO

12 settembre 2014, ore 9-18
Campus Luigi Einaudi
Meeting Room (settore D2 – 2° piano)

Lungo Dora Siena, 100, 10153 Torino
011 670 6111



Cellule che si suicidano: come, quando e perché

Ciro Isidoro

Medico e Biologo

Professore di Patologia Cellulare
dell'Università del Piemonte Orientale.

Dipartimento di Scienze della Salute
Via Paolo Solaroli 17
28100 - Novara

RIASSUNTO

Le cellule si suicidano? E perché? Come muoiono le cellule?

La morte delle cellule è un evento fisiologico, talora indispensabile per consentire la vita stessa e talaltra, all'opposto, per evitare la malattia! E per contro, la morte delle cellule è essa stessa anche la causa di malattia, e dunque di morte.

Oggi sappiamo che la morte delle cellule è funzionale alla vita solo se è regolata, ovvero se avviene in tempi e luoghi e in circostanze ben definite.

Il fatto che lo sviluppo embrionale armonico si accompagni alla morte di alcune cellule ha suggerito la definizione di *suicidio cellulare* per indicare che *quella* cellula, e non un'altra, 'doveva' morire in quel preciso momento e in quel preciso luogo anatomico, ovvero che *quella* cellula portava già dentro di sé la decisione di morire!

Come fa la cellula a capire che *deve suicidarsi*?

La cellula non pensa, eppure 'ragiona': ma lo fa secondo schemi geneticamente predeterminati. Il suicidio cellulare è infatti una 'morte cellulare programmata', e questo programma viene messo in atto quando è necessario che *quella* cellula muoia per il bene della collettività, ovvero per mantenere in salute l'intero organismo. Esiste dunque un 'controllo sociale della morte cellulare' da parte delle altre cellule. Oggi, che conosciamo meglio i meccanismi di regolazione e induzione della morte cellulare programmata, ci rendiamo conto che la nozione di suicidio cellulare ha un significato ambiguo, perché il controllo sociale della morte cellulare è molto più complesso di quanto non ci apparisse qualche anno fa. La decisione di attuare il suicidio e il suo compimento dipendono infatti non solo dall'assetto genetico della cellula, ma anche dal suo patrimonio epigenetico e dagli stimoli cui è sottoposta la cellula. Conoscere e imparare come controllare il suicidio delle cellule è fondamentale per la cura delle malattie, che sono sempre il risultato di un difetto quantitativo (per eccesso o per difetto) della morte cellulare o di un errore nel momento e nel luogo in cui essa si verifica.

INTRODUZIONE

Quando ci si trova di fronte al suicidio, la domanda che ci assale è “Perché si sceglie di morire?”.

Ma subito il dubbio ci tormenta: “ma si *sceglie* di morire?” In altre parole: il suicidio è davvero “una *scelta libera e consapevole*”? Oppure è “una *scelta obbligata*”?

Psicologi, Sociologi e Filosofi tentano di dare risposta a queste domande, e talora offrono spiegazioni convincenti.

Ma lo scienziato medico e biologo che risposte può dare? Possiamo trovare una spiegazione ‘biologica’ per questo evento così tragico?

In fondo siamo fatti di cellule, che in piccolo riproducono il ciclo della vita e della morte. Cosa succede nel mondo delle cellule, dove pure si parla (a proposito, e un pò anche a sproposito) di ‘suicidio cellulare’.

Le cellule si ‘suicidano’?

Da alcuni decenni è stato introdotto in biologia cellulare il concetto di ‘suicidio cellulare’ per indicare una modalità di morte cellulare predeterminata, ovvero ‘geneticamente programmata’, nota come “*apoptos*”.

Esiste dunque un ‘programma di morte’ insito in ogni cellula e, per estensione, in ogni organismo vivente?

Perché le cellule si ‘suicidano’?

Nelle pagine che seguono, cercheremo di rispondere a queste e altre domande sulla vita e sulla morte delle cellule, e vedremo quali fattori interni ed esterni alla cellula possono influire, e in che modo, sul destino della cellula.

Ma, soprattutto, cercheremo di capire se la ‘scelta’ di morire sia per la cellula una scelta ‘libera e consapevole’ oppure rappresenti un evento obbligato, un finale già scritto che viene messo in atto quando le circostanze ambientali lo impongono.

Una avvertenza importante.

La tentazione di fare paragoni trasversali tra le Scienze Sociali e le Scienze Biologiche a riguardo di processi tra loro distinti che pure possono apparire simili è obiettivamente forte. Sociologi e Politici, per rendere più efficace un messaggio, talora mutuano la terminologia propria della Biologia: per esempio, parlano di ‘anticorpi’, per intendere i mezzi di contrasto alle deviazioni, o di ‘DNA’ e ‘genetico’, per indicare comportamenti culturali innati e immutabili. Similmente, la Biologia può far uso di descrittori propri delle Scienze Umanistiche. La commistione dei linguaggi è però ingannevole, in quanto può autorizzare a credere che vi siano uguaglianze di funzioni e di effetti tra processi fenomenologici di fatto diversi.

Diciamo subito, per evitare equivoci e incomprensioni che possano poi degenerare in polemiche inutili e critiche ingiustificate, che ogni parallelismo qui riportato tra quel che accade alla cellula e nella società delle cellule con quel che accade all’Uomo e nella società degli Uomini è da considerarsi puramente aneddótico, o al più provocatorio.

Vero che la cellula risponde agli stimoli ambientali, vero che la cellula possiede le informazioni su come gestire queste risposte.

Ma le decisioni che vengono prese nella cellula seguono automatismi biologici, dei quali alcuni sono stati ben compresi mentre molti altri rimangono ancora oscuri. E’ importante

sottolineare che gli automatismi biologici non sono assoggettati ad un finalismo ragionato e consapevole, anche se sono parte integrante di un disegno progettuale che ha come fine ultimo la sopravvivenza della cellula, della sua progenie e dell'intera comunità di cui è parte.

Nel proporre paragoni tra l'Uomo e la cellula non possiamo eludere un fatto sostanziale: a differenza dell'Uomo, la cellula non possiede un cervello pensante.
La cellula non ha una "coscienza".
La cellula non possiede il "libero arbitrio".

Ma, ammettiamolo, la tentazione di attribuire alla cellula tutte queste facoltà, e magari anche una etica sociale e una morale (religiosa) è fortissima, e lo sarà ancor più dopo aver letto questo articolo.

Io vi ho avvertiti.

Cosa vuol dire ‘morire’ in Biologia?

La Biologia, la Scienza della Vita, può aiutarci a capire la *morte*? Può dare una risposta razionale, meccanicistica?

La Biologia è una Scienza sperimentale, e dovrebbe avere gli strumenti per spiegare la *morte* utilizzando il metodo sperimentale, e dunque potrebbe rispondere alla domanda essenziale non con ipotesi e congetture, ma con esperimenti e prove materiali a supporto della spiegazione.

E seguendo questo metodo la Biologia ci conferma che in effetti “la morte è la conseguenza (inevitabile) della vita”.

Ma la Biologia ci dice anche che “non solo la morte segue la vita, ma la vita stessa come la conosciamo segue la morte”!

Di più, a complicare il quadro, possiamo aggiungere che negli organismi formati da più cellule “la morte di tutte le cellule segue alla morte di poche cellule”, e “alla morte di alcune cellule segue la vita di tutte le altre cellule”!

Queste affermazioni possono apparire contraddittorie e confondenti.

Pure, ciò è quanto abbiamo imparato osservando il ciclo riproduttivo delle cellule, la formazione degli organismi complessi e l’evoluzione delle malattie.

Vita e Morte delle cellule nell’Uomo

Le nostre cellule si suicidano?

In un Uomo adulto si stima che mediamente cinquanta-sessanta miliardi di cellule muoiono ogni giorno: per la maggior parte esse verranno sostituite da cellule di nuova nascita, mentre alcune verranno perse per sempre. Ad esempio, le cellule del sangue, della pelle e dell’apparato digerente vengono rinnovate continuamente in pochi giorni, mentre le cellule del sistema nervoso o dei muscoli non possono essere sostituite in tempi così rapidi.

Dobbiamo rassegnarci quindi al fatto che alcuni tessuti (in particolare quelli nervoso e muscolare) vadano incontro a degenerazione senile a causa di questo lento e inesorabile stillicidio di “suicidi” cellulari.

Ma *come* muoiono queste cellule? E *perché* muoiono?

A queste domande cercheremo di rispondere nei paragrafi successivi.

Come muoiono le cellule: assassinio, suicidio e anoressia

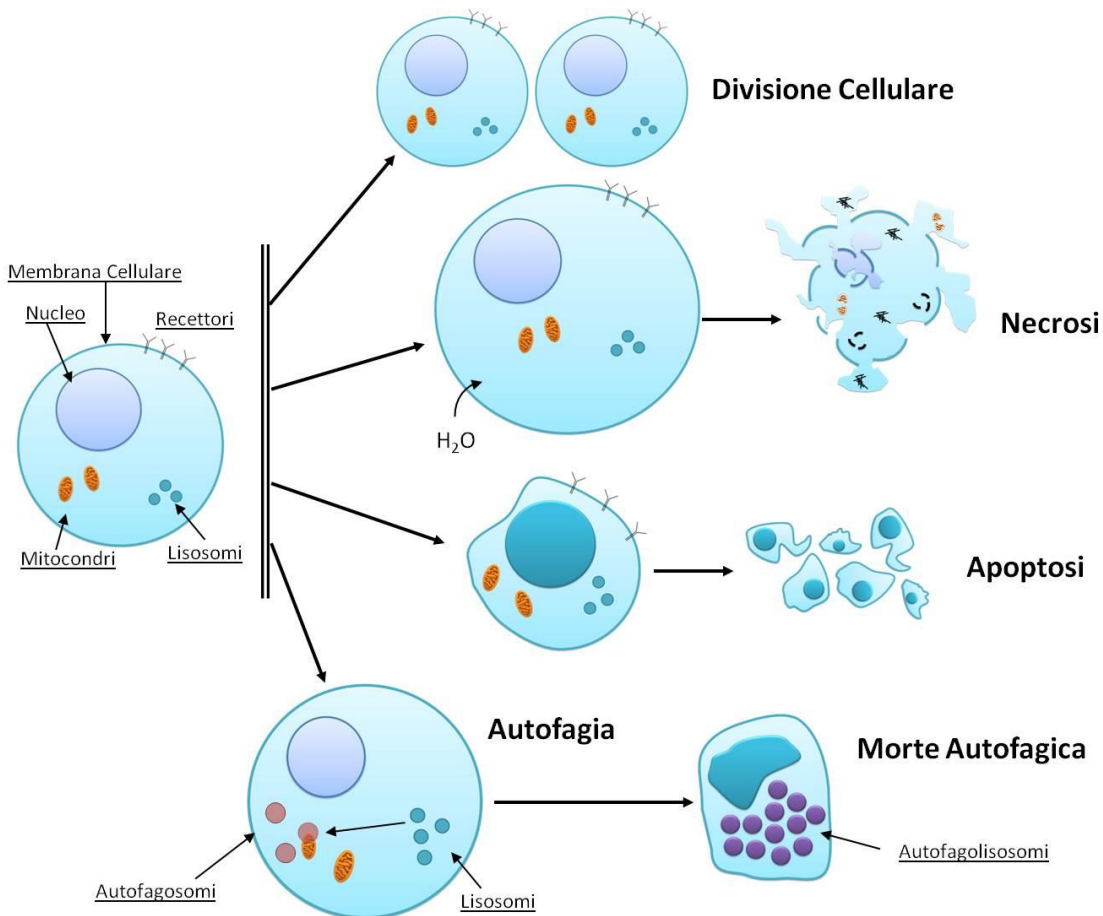
Le cellule non muoiono tutte allo stesso modo. Conosciamo almeno tre diverse modalità di morte cellulare, e quale tra queste sarà attuata dipende dalla causa che porta a morte la cellula, dipende dalle circostanze ambientali e dipende pure dal ‘carattere’ genetico (ed epigenetico) della cellula... e cioè se ne ha voglia, e se *può* morire in quel dato modo!

La cellula può in effetti morire suicida, oppure morire per autodigestione (una sorta di anoressia indotta da stress e privazione di nutrienti), oppure ancora morire per distruzione totale dei componenti cellulari (vedi Figura 1).

Le prime due modalità, sono note con i termini scientifici di ‘apoptosi’ e di ‘morte cellulare autofagica’, rispettivamente, e sono due modalità di morte cellulare individuale che richiede l’attuazione di un programma geneticamente preordinato (gli scienziati parlano di

‘morte cellulare programmata’ di tipo 1 e di tipo 2, rispettivamente). Questo programma di morte cellulare viene attivato nella singola cellula da una combinazione di fattori interni ed esterni alla cellula stessa.

La terza modalità di morte cellulare, quella che si caratterizza per la distruzione totale di tutte le componenti cellulari, è detta ‘necrosi’, ed è provocata da fattori esterni e non richiede il concorso di fattori interni alla cellula. La necrosi è la forma di morte cellulare conosciuta da molto più tempo. Cominceremo da questa.



La Necrosi: assassinio cellulare plurimo aggravato

Il nome “necrosi” in sé richiama (dal greco antico) l’immagine del ‘cadavere’, ovvero di un corpo in disfacimento. In questo caso, il fattore che determina la morte cellulare agisce in modo aspecifico e indiscriminato su tutte le cellule a tiro, provocando quindi una sorta di ‘strage degli innocenti’ (infatti, potrebbero essere coinvolte anche cellule sane non destinate a morte). Si tratta per lo più di una morte ‘accidentale’, non voluta. La necrosi è per lo più provocata da insulti tossici di elevata intensità e che agiscono per breve tempo. Nelle cellule colpite si assiste ad un progressivo e inarrestabile ingresso di acqua che dilata le membrane cellulari fino a farle scoppiare. Il momento cruciale che segna la fine della vita della cellula è la rottura della membrana dei lisosomi, un organello ricco di enzimi idrolitici acidi in grado di degradare (quasi) tutte le macromolecole biologiche (nei libri di scuola elementare viene paragonato allo ‘stomaco’ della cellula). Appena il contenuto acido dei lisosomi viene rilasciato nel citoplasma ha inizio la dissoluzione della cellula.

Questa modalità di morte cellulare ha conseguenze collaterali sgradevoli. Infatti, le cellule necrotiche rilasciano sul terreno di battaglia tanti residui 'cadaverici' che provocano una reazione immunitaria-infiammatoria, volta a fare pulizia e riparare il danno. Il fatto è che le reazioni immunitarie-infiammatorie hanno un elevato costo energetico, e per di più lasciano 'cicatrici' che compromettono la forma e la funzione degli organi colpiti.

L' Apoptosi: un suicidio programmato da tempo

Il nome "apoptosi", che richiama etimologicamente (dal greco) l'immagine delle foglie che in autunno silenziosamente cadono dalle piante o i petali che cadono dal fiore, fu introdotto la prima volta nel 1972 da John Kerr, Andrew Wyllie e Alastair Currie. Nella cellula che muore per apoptosi si osserva la riduzione del volume cellulare (perdita di acqua), la frammentazione e condensazione del nucleo e del DNA, e infine la frammentazione della cellula in piccoli corpi apoptotici contenenti porzioni di citoplasma e di DNA molto compattati. I corpi apoptotici saranno poi fagocitati dalle cellule vicine o dai macrofagi e digeriti nei loro lisosomi (cellule vive che si nutrono di cellule morte!). L'apoptosi non provoca reazione infiammatoria e fibrosa; l'apoptosi non lascia cicatrici. Cellule in apoptosi si osservano negli organi in regressione, negli abbozzi embrionali, ed anche nei tumori. L'apoptosi controbilancia la proliferazione cellulare: insieme, questi due processi assicurano il rinnovamento tissutale pur mantenendo costante il numero delle cellule che compongono un organo. L'apoptosi può essere indotta da molecole presenti nell'ambiente tissutale, come per esempio citochine che stimolano i recettori di morte presenti sulla membrana cellulare, oppure da sostanze tossiche per il mitocondrio.

Nei tessuti embrionali l'apoptosi compare spontanea nel corso dell'organogenesi. Accade che alcune cellule decidano di morire, scegliendo il momento più opportuno per andarsene in silenzio e fare spazio ad altre cellule. Proprio come le foglie che cadono dagli alberi in una stagione definita, anche le cellule che nell'embrione muoiono di apoptosi pare che seguano un calendario prefissato. Nel 1973 Richard Locksley propose il termine "morte cellulare programmata" per indicare l'apoptosi. L'aggettivazione *programmata* in realtà oggi indica la messa in atto di un 'programma di morte' già scritto nei nostri geni. In effetti, la cellula che muore in apoptosi mette in atto una serie di modificazioni biochimiche e morfologiche ben definite e ordinate nel tempo e nella successione, come in un 'rito della morte' che è uguale in tutte le circostanze, quale che sia stata la causa a innescarla. Il programma si svolge a tappe sequenziali, ed è possibile fino all'ultimo fermare l'esecuzione della sentenza. Il momento cruciale è rappresentato dall'attivazione a cascata di enzimi proteolitici (le caspasi) che culminano con l'attivazione di altre proteine con attività enzimatica sul DNA, il citoscheletro, e altre strutture cellulari, con ciò provocando la frammentazione del nucleo e della cellula in corpi apoptotici. Oggi disponiamo di farmaci che possono bloccare l'esecuzione dell'apoptosi, per esempio mediante l'inibizione delle caspasi. I corpi apoptotici presentano sul lato esterno della membrana una molecola che 'invita' i macrofagi alla loro fagocitosi, e ciò facilita la loro stessa eliminazione. Una volta innescata (pronunciata la sentenza), la cellula attiva questo programma di morte in modo autonomo, e si avvia alla morte: questo comportamento *apparentemente* volontario ha suggerito il termine di *suicidio cellulare*. Sull'ambiguità di questa denominazione e della definizione di *morte cellulare programmata* associate all'apoptosi ritorneremo nell'ultimo paragrafo.

La "morte cellulare autofagica": un caso di anoressia forzata

Il termine “autofagia” significa letteralmente ‘mangia te stesso’! E’ un processo di digestione enzimatica che si svolge nei lisosomi e che serve alla cellula per sbarazzarsi di quelle strutture in esubero e ridondanti o che non sono utilizzate o che siano state danneggiate e malfunzionanti.

Si tratta di un processo molto delicato che deve essere finemente regolato se si vuole assicurare la sopravvivenza della cellula. Infatti, se la cellula dovesse eccedere con l’autofagia... finirebbe per consumarsi tutto... troppo... e superato il ‘punto di non-ritorno’ inevitabilmente essa andrebbe incontro a morte! Questa modalità di morte cellulare è detta autofagica, e si caratterizza dal punto di vista morfologico per la presenza abbondante di autofagosomi, la scarsità di mitocondri, la riduzione del volume cellulare. Alla morte cellulare autofagica può poi seguire l’apoptosi o, più raramente, la necrosi.

Il suicidio cellulare e la nascita della vita

Il titolo, volutamente provocatorio, può apparire contraddittorio, eppure è così: il suicidio cellulare è un evento necessario per la sopravvivenza di altre cellule e, dal punto di vista evolutivo, nasce con la nascita di un organismo pluricellulare (come appunto siamo noi!).

Nel corso dello sviluppo embrionale, infatti, molte cellule dovranno suicidarsi lungo tutto il periodo della gastrulazione e della morfogenesi, per consentire la formazione degli organi e per dare loro la forma finale come poi ci apparirà nel piccolo neonato. L’abbozzo embrionale si modellerà nel corso della gestazione grazie proprio al sacrificio di cellule in esubero, cui viene fortemente consigliato di ‘suicidarsi’!

La morte di queste cellule deve essere rigorosamente ‘silenziosa’, “pulita”, non deve lasciare scorie che possano turbare l’equilibrio, non deve provocare infiammazione. E dunque non può trattarsi di necrosi, che come abbiamo visto prima coinvolge un numero imprecisato di cellule in modo indiscriminato e provoca effetti collaterali indesiderati. Le cellule che si suicidano nel corso dell’embrio-morfogenesi scelgono la via dell’apoptosi o della morte autofagica, a seconda delle situazioni e del tipo di tessuto/organo.

Il tempo di morire: chi e quando tocca di suicidarsi?

Ma non è importante solo il *modo* con cui le cellule muoiono, fondamentale è che muoiano esattamente le cellule predestinate, non una di più non una di meno, e in quel preciso momento, non troppo presto non troppo tardi, ed esattamente in quel luogo. Errori nel controllo dei suicidi cellulari nel corso dello sviluppo embrionale provocano malformazioni d’organo permanenti che molto spesso sono incompatibili con la vita stessa.

Possiamo sapere *quali* cellule e *dove* e *quando* esattamente *devono morire* per consentire la vita dell’intero organismo?

Nell’Uomo, per ovvi e comprensibili motivi etici, non è possibile fare sperimentazioni che consentano di sapere con esattezza quali cellule e quando innescano il processo di suicidio programmato.

Infatti, per rispondere a queste domande bisognerebbe poter ‘tracciare’ le cellule, ovvero adottare delle manipolazioni genetiche che rendano le cellule dell’embrione ‘visibili’ (per esempio “fluorescenti”) in modo da poter vedere *quali* e *quando* esse muoiono.

Questo esperimento è stato condotto nel *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), un verme ermafrodita tondo e trasparente lungo circa 1 mm, e ha permesso di determinare con esattezza quali cellule e quando devono morire nell'embrione per consentirne lo sviluppo normale. Questo nematode possiede circa 19.000 geni, poco più della metà di quelli presenti nelle nostre cellule. Negli anni '80, insieme con i suoi collaboratori, Robert Horvitz riuscì a mappare tutte le cellule del *C. elegans*, e questo gli fece poi guadagnare il Premio Nobel.

Dal momento della fecondazione trascorrono circa 58 ore per giungere al verme adulto e maturo. Dalla cellula uovo fecondata si forma inizialmente una larva costituita da 558 cellule. Le prime divisioni cellulari, fino alla morula, avvengono nell'utero (circa 3 ore), e poi le fasi successive (inclusa la gastrulazione) proseguono fuori dall'utero. La schiusa, che libera nel terreno una piccola larva, avviene dopo circa 12 ore dalla fecondazione. Nelle successive 46 ore la larva si accresce fino a formare il verme adulto, che è costituito da esattamente 959 cellule. Nel corso dello sviluppo embrionale si verifica la morte di esattamente 131 cellule. I ricercatori riuscirono non solo a contare le cellule che morivano, ma notarono che la morte non era accidentale ma interessava sempre e solo determinate cellule, collocate in una precisa posizione, e avveniva in un preciso momento del passaggio a larva e poi ad adulto, e seguendo un ordine assolutamente regolare. Le cellule predestinate alla morte non muoiono per necrosi, ma per apoptosi. Horvitz e i suoi collaboratori identificarono anche il gene responsabile di questi suicidi controllati. Se questo gene, denominato Ced-3 (che codifica per la caspasi, una proteasi che innesca la fase terminale dell'apoptosi), viene inattivato non si osserva la morte delle 131 cellule in esubero e si forma un verme adulto di 1090 cellule che presenta evidenti malformazioni. Il genoma di *C. elegans* è stato per intero sequenziato nel 1999, e grazie a ciò noi oggi conosciamo nel dettaglio tutti i *geni della morte*, quelli che danno le istruzioni per attivare il programma suicida.

Geni della morte omologhi a quelli descritti in *C. elegans* sono presenti in tutte le specie animali.

E, parimenti, ci sono anche i *geni della sopravvivenza*, che si oppongono all'esecuzione della morte. Nel verme *C. elegans* mutante in cui è inattivato il gene Ced-9 si osserva un eccesso di morte cellulare nell'embrione, che infatti non giunge allo stadio di larva. Introducendo nella cellula uovo di questo mutante il gene umano che codifica per la proteina BCL-2 (una proteina potenzialmente oncogenica, come vedremo dopo), si ripristina la sopravvivenza cellulare e si può ottenere lo sviluppo completo del verme.

Ma *chi* dice a quelle cellule che devono suicidarsi in quel luogo e in quel momento?

Abbiamo appena visto che nell'embrione la morte suicida della cellula dipende dalla presenza e attivazione dei geni della morte, ma l'esecuzione finale può essere fermata dalla presenza di proteine della sopravvivenza. Come è regolata l'accensione e lo spegnimento di questi geni?

In un momento preciso dello sviluppo embrionale del pollo si osserva la morte apoptotica di alcune cellule nell'area anatomica deputata alla formazione delle ali: per quelle cellule l'orologio segna l'ora della morte! John W. Saunders Jr. (1966) prelevò quelle cellule poco prima che morissero (dopo che la sentenza era stata emessa e prima che venisse eseguita) e le trapiantò in una regione diversa nella stessa area anatomica e notò che quelle cellule non si suicidavano più. Questo esperimento dimostra che l'ambiente cellulare circostante esercita una influenza determinante nel consentire o impedire che il programma di morte sia portato a compimento.

Il suicidio cellulare e la vita

I suicidi cellulari continuano anche durante il corso della nostra vita.

Un buon esempio è rappresentato dai cheratinociti, cellule che rivestono lo strato più superficiale della pelle, e che ci proteggono dalle radiazioni solari e anche dall'aggressione dei micro-organismi presenti nell'ambiente (inclusi i nostri vestiti) e che quotidianamente sono a contatto con il nostro corpo. I cheratinociti sono cellule dell'epidermide che provengono dallo strato germinativo profondo e man mano che risalgono alla superficie perdono gli organuli cellulari vitali e si infarciscono di una proteina (la cheratina) molto resistente alle aggressioni chimico-fisiche. Alla fine di questo processo differenziativo, il cheratinocita è di fatto una cellula 'morta', ma infarcita di cheratina e per alcuni giorni rimarrà aderente allo strato superficiale della pelle per proteggerci, fino a quando spontaneamente si staccherà perché dal basso sono giunti nuovi cheratinociti pronti a sostituirli. Sappiamo anche che l'esistenza di un cheratinocita è di circa ventuno giorni, da quando inizia il cammino differenziativo a quando definitivamente abbandona il nostro corpo. In assenza di questo strato protettivo, la pelle è esposta a rischi di arrossamento (infiammazione dovuta all'irraggiamento solare) e di infezioni (i batteri che normalmente sono sulla pelle possono più facilmente penetrare negli strati profondi). Questo è il motivo per cui si sconsiglia di 'lavare' la pelle troppo spesso (il che non autorizza certamente a puzzare!). Ma quelle pratiche di 'scraping' per rimuovere le cellule morte della pelle, in voga tra le donne (e anche tra gli uomini), andrebbero praticate... con cautela.

Un altro buon esempio è rappresentato dai linfociti, le cellule che ci proteggono dalle infezioni e che garantiscono la nostra unicità. Semplificando, possediamo due categorie di linfociti dell'immunità specifica: i linfociti B e i linfociti T (ma esiste anche una terza categoria detta nonB-nonT che però interviene nelle reazioni immunitarie aspecifiche). I linfociti B sono responsabili della produzione di anticorpi se vengono stimolati da una molecola a noi estranea (detto antigene). I linfociti T si distinguono a loro volta in vari sottogruppi, ma le due classi principali sono i linfociti T *helper* (che coadiuvano, regolano e autorizzano le risposte immunitarie) e i T citotossici (quelli che effettivamente intervengono nell'uccidere le cellule estranee o malate). I linfociti T citotossici devono essere ben addestrati (educati, istruiti) a riconoscere le nostre cellule sane e devono saperle distinguere da quelle malate (esempio infettate da virus o divenute tumorali) o da quelle che non ci appartengono (esempio, trapiantate nel nostro corpo!). I linfociti T citotossici quindi preservano la nostra integrità e identità, e si oppongono ai trapianti d'organo (e infatti, nei pazienti trapiantati è necessario somministrare farmaci che inibiscono l'attivazione di questi linfociti). I linfociti T imparano a riconoscere le nostre cellule nel timo, un piccolo organo posto alla base del collo. Ciò avviene grazie a un recettore posto sulla membrana dei linfociti T che deve adattarsi alle proteine identitarie (dette antigeni di istocompatibilità) poste sulla membrana delle nostre cellule (e che noi ereditiamo dai nostri genitori). Nel timo, i linfociti T immaturi si confrontano con le nostre cellule e se per errore non dovessero riconoscere gli antigeni di istocompatibilità vanno incontro a morte suicida, in quanto inutili... perché non si può affidare la difesa del nostro corpo a chi non ci sa riconoscere e distinguere dai nemici! Ma non va bene neppure il linfocita T immaturo che con il suo recettore si aggancia in modo avido e duraturo agli antigeni di istocompatibilità. Un tale linfocito auto-reattivo può essere pericoloso per la nostra incolumità. Infatti, nella confusione di una forte e cronica reazione infiammatoria, quando sono in campo molte cellule dell'immunità che rilasciano citochine (molecole che servono a comunicare la necessità di attivare il sistema immunitario), questi linfociti T auto-reattivi possono 'perdere la testa' e aggredire le nostre cellule: è così che si sviluppa una malattia autoimmune.

E' dunque un bene per il nostro organismo che le cellule T auto-reattive vengano indotte a suicidarsi prima di andare in giro per il nostro corpo!

Tutti i giorni, milioni e milioni di linfociti T immaturi vanno al Timo per sostenere l'esame di ammissione in circolo, e solo l'uno-due per cento di loro è fortunato e sopravvive. Si tratta in effetti di fortuna, perché il recettore di membrana che deve riconoscere (ma non troppo avidamente!) i nostri antigeni di istocompatibilità viene sintetizzato nel linfocita T immaturo sorteggiando a caso le informazioni presenti nel DNA. Ciò che qui è interessante sottolineare è che nel corso della nostra vita un numero incalcolabile di miliardi di linfociti T ha avuto una vita breve, il tempo di andare dal midollo al timo, e lì essere costretto a suicidarsi 'solo' perché si era costruito un recettore sbagliato!

E per rimanere in tema di immunità, dobbiamo considerare che le cellule dell'immunità, stimulate dalla presenza di un invasore nel nostro corpo, vanno incontro a una espansione clonale (ovvero, si moltiplicano) nei linfonodi per poi andare in circolo a combattere l'invasore (e infatti, più o meno percettibilmente, i linfonodi si ingrossano nel corso delle infezioni). Quando la guerra è finita (e spesso la vinciamo noi!) e non ci sono più nemici da combattere, i linfociti in esubero non servono più e devono essere eliminati. Queste cellule accettano di suicidarsi, letteralmente facendo 'kara-kiri' reciproco, cioè stimolandosi l'un l'altro un recettore di membrana detto appunto 'recettore di morte'.

Il suicidio cellulare e la morte

Abbiamo visto che nel corso dello sviluppo embrionale si verificano divisioni cellulari asimmetriche e morti suicide.

Abbiamo anche visto che la morte suicida ci accompagna nel corso della vita, e che il suicidio di alcuni tipi cellulari (esempio i linfociti T) è un prezzo necessario da pagare per avere la sicurezza che il sistema immunitario ci difenda dalle aggressioni, e senza correre rischi di autodistruzione. E abbiamo anche citato il caso di suicidio cellulare che, cessato lo stimolo, fa regredire un organo o tessuto che era andato incontro ad una espansione transitoria del numero di cellule per aumentata richiesta funzionale (es., le cellule dell'immunità a fine infezione; l'utero a fine gravidanza; la mammella a fine allattamento).

I casi illustrati fin qui evidenziano un controllo 'sociale' del suicidio, in cui cioè la morte suicida viene 'accettata' e messa in atto dalla vittima designata su suggerimento (o istigazione?) delle cellule vicine o, più in generale, da mediatori molecolari rilasciati nel sangue (citochine che stimolano il 'recettore di morte').

Il controllo 'sociale' della morte cellulare suicida garantisce la Salute psico-fisica e l'integrità funzionale del nostro corpo.

Ma non sempre è tutto così sotto controllo come vorremmo.

E quando il suicidio cellulare sfugge al controllo... quando muore la cellula che non deve morire, e quando non muore la cellula che dovrebbe morire... ecco che allora insorge la Malattia, che poi ci porterà alla Morte.

A titolo esemplificativo possiamo considerare due patologie in cui il suicidio cellulare è deregolato in modo opposto: le malattie neurodegenerative e il cancro; nel primo caso si

osserva il suicidio precoce di neuroni, e per contro, nel secondo caso le cellule sono resistenti alla istigazione al suicidio.

Un caratteristica comune alle malattie neurodegenerative è la presenza di aggregati di proteine anomale nella cellula nervosa e negli spazi inter-neuronali. Malattie neurodegenerative relativamente frequenti di questo tipo sono la Malattia di Parkinson, la Malattia di Huntington e la Malattia di Alzheimer. In molti casi, soprattutto in quelli con predisposizione familiare, una mutazione in un gene importante per la funzione della cellula nervosa determina una anomalia nella sintesi della proteina codificata, tale che viene meno quella funzione. La proteina anomala spesso tende a formare aggregati, e questo impedisce il buon funzionamento della cellula.

La presenza di aggregati proteici nella cellula rappresenta uno stimolo per l'autofagia, che come abbiamo visto prima è un sistema volto a mantenere 'pulita' la cellula attraverso la degradazione dei componenti cellulari anomali e malfunzionanti. Nelle malattie neurodegenerative, tuttavia, i neuroni affetti presentano un difetto di regolazione dell'autofagia, che è insufficiente a degradare tutte le proteine anomale che vengono continuamente sintetizzate. Probabilmente, la presenza stessa della proteina anomala interferisce con l'attuazione dell'autofagia. L'accumulo di aggregati proteici rende la cellula nervosa molto fragile e sensibile allo stress ossidativo provocato dai neurotrasmettitori. Con il trascorrere del tempo, i neuroni affetti non reggono più lo stress... e si suicidano, cioè muoiono di apoptosi. Ciò spiega la comparsa poi dei sintomi in una età più o meno avanzata, a seconda della gravità della mutazione genica e del numero di neuroni che vanno incontro a suicidio.

Nel caso del cancro la situazione è ancor più complessa. Le cellule tumorali hanno perduto i caratteri differenziativi, non svolgono i compiti necessari al buon funzionamento dell'organo, e pensano soltanto a dividersi (sono quasi sempre in ciclo). Le cellule tumorali più aggressive sviluppano anche resistenza ai farmaci chemioterapici citotossici. E dunque, non solo le cellule tumorali tendono a duplicarsi spesso e volentieri (in media, ogni 12-24 ore), ma sono anche restie a morire. Cosa rende la cellula tumorale resistente all'apoptosi? Conosciamo oggi molte proteine che regolano il processo apoptotico, in senso positivo e in senso negativo, e nelle cellule tumorali i geni che codificano queste proteine sono mutati in modo da alterarne la funzione. Per esempio, il gene oncosoppressore TP53 codifica per una proteina, la p53, che ha un ruolo importantissimo nel controllare che non vi siano mutazioni pericolose nel DNA e nell'evitare che queste mutazioni possano essere trasmesse alle cellule figlie. In presenza di danno al DNA, la p53 determina il blocco della divisione cellulare, la riparazione del DNA e, nel caso non si riesca a riparare la mutazione, induce l'apoptosi, innesca cioè il programma di morte suicida della cellula proprio per evitare che possano nascere cellule figlie con un DNA mutato. In oltre il sessanta per cento dei tumori la funzione di p53 risulta alterata, per mutazione o delezione del gene TP53.

Un'altra proteina che conferisce resistenza all'apoptosi è BCL-2, che è codificata da un gene oncogene. In alcuni tumori, soprattutto nei linfomi, questo oncogene è iperattivo e produce grandi quantità di proteina BCL-2, la quale impedisce che venga danneggiato il mitocondrio, da cui può partire il segnale di attivazione delle caspasi e dunque l'esecuzione dell'apoptosi.

Le cellule possono evitare il suicidio?

La risposta è: dipende!

Immaginiamo il caso di una cellula in un organo funzionante, che serve all'economia generale dell'organismo.

In presenza di condizioni avverse la cellula... accetta il suo destino senza tentare opposizioni? La risposta è "no"!

La cellula è sana, non è ancora giunta la sua ora e non ha motivo per accettare di suicidarsi senza tentare di resistere. La situazione è infatti diversa rispetto a quando nel corso dell'embriomorfogenesi la morte cellulare era *programmata* sin dall'inizio, già decisa al momento della fecondazione!

In questo caso le condizioni ambientali sono improvvisamente divenute ostili per cause non 'programmate', e potrebbero presto ritornare favorevoli: dunque, prima di attivare il programma di morte la cellula mette in atto una serie di azioni per evitare la catastrofe.

Condizioni ambientali sfavorevoli significa carenza di metaboliti (nutrienti e ossigeno), presenza di sostanze chimiche (veleni, cancerogeni, ossidanti, etc) o di fattori fisici (radiazioni, alte temperature, etc) che possono provocare danni permanenti al DNA, alle membrane cellulari, alla funzione delle proteine e degli organelli cellulari.

La cellula possiede le istruzioni (programma genetico) e gli strumenti per contrastare queste condizioni avverse. La cellula in questa situazione ha due obiettivi prioritari: ritardare la morte (bloccare l'apoptosi) e riparare i danni. La cellula attiva immediatamente l'autofagia. Questo processo è un utile mezzo per degradare le strutture cellulari danneggiate e ricavarne materiale ed energia per sintetizzarle nuovamente. Non solo, l'autofagia consente alla cellula di sopravvivere in assenza di metaboliti esterni utilizzando i propri costituenti, che vengono gradualmente degradati secondo necessità e facendo attenzione a non esagerare (per evitare la morte cellulare autofagica). Oggi sappiamo come tutto ciò venga regolato a livello molecolare: attraverso un network di interazioni proteiche che coinvolgono fundamentalmente la proteina (oncogenica) della sopravvivenza BCL-2 (ricordate l'esperimento con il verme *C. Elegans*?) e la proteina (oncosoppressore) dell'autofagia BECLIN-1. La sintesi di queste proteine e il loro reclutamento nel network che regola autofagia e apoptosi sono fortemente influenzati dalle condizioni ambientali (presenza/assenza di fattori di crescita, ormoni, nutrienti, ossigeno, sostanze tossiche, etc).

In sintesi, la cellula possiede nel DNA le istruzioni per attivare questi programmi (di autofagia e di apoptosi), ma la lettura e scrittura di questi programmi dipendono da regolazioni epigenetiche e dalle circostanze ambientali.

In *primis* vengono messi in atto automatismi biologici che hanno come finalità la salvezza della cellula fin tanto che è sana e funzionante.

Se però non è stato possibile riparare il danno al DNA o se i fattori tossici nel microambiente continuano a danneggiare gli organelli indispensabili alla sopravvivenza cellulare tale da compromettere la sintesi delle proteine (reticolo endoplasmatico e ribosomi), la produzione di energia (mitocondri) e lo smaltimento dei rifiuti tossici (lisosomi), allora non c'è più motivo di tenere in vita la cellula... e l'esecuzione del programma di morte cellulare non viene impedito.

L'orologio della morte

Nel 1961 Leonard Hayflick dimostrò che le cellule animali 'normali' coltivate nei laboratori possono duplicarsi per non più di circa cinquanta volte nell'arco di uno-tre anni. Questo numero è oggi noto come "limite di Hayflick". Il fatto straordinario evidenziato da Hayflick è che le cellule 'ricordano' le duplicazioni che hanno fatto. Infatti, le cellule che erano state congelate e poi rimesse in coltura riprendevano a dividersi ma poi cessavano di farlo quando avevano raggiunto il numero massimo possibile.

Esiste quindi un *orologio molecolare*, un contatore delle divisioni cellulari.

Fu l'intuizione del biologo Alexei Olovnikov nel 1973 a offrire la spiegazione del fenomeno.

Alle estremità dei cromosomi è presente un lungo tratto, detto telomero, formato da sequenze ripetute di DNA che servono per l'aggancio degli enzimi che copiano il DNA. A ogni duplicazione cellulare il DNA di ciascun cromosoma viene ricopiato, ma non per intero poiché la porzione del telomero impegnata nel legame con l'enzima non può essere letta; ne consegue che la copia avrà all'estremità un telomero più corto. A ogni duplicazione i telomeri si accorciano, e a un certo punto si otterrà un cromosoma il cui telomero è così corto da non consentire più l'aggancio dell'enzima. A quel punto il DNA non può più essere duplicato, e anche la cellula non si divide più: è stato raggiunto il limite di Hayflick.

Una cellula normale, dunque, non può replicarsi indefinitamente, neppure se gli viene assicurata la disponibilità di nutrienti e fattori di crescita e di sopravvivenza.

La morte cellulare tra *morte clinica* e *morte biologica*

Se, quando e come debba un Uomo essere considerato 'morto' è tema di continuo dibattito nelle comunità scientifica, filosofica, religiosa e nella Società in generale. Un dibattito che evidentemente e inevitabilmente rimane *vivo* (è il caso di dirlo), in quanto le definizioni stesse di "*morte*" sono suscettibili di continui aggiustamenti e precisazioni.

La Scienza è in continua evoluzione, e il Pensiero pure.

Da un lato, i progressi nella conoscenza dei processi biochimici che regolano la vita e la morte delle cellule possono modificare sensibilmente i limiti e le tipologie dei parametri biologici e clinici da considerare per definire cosa sia la morte. Parimenti, la disponibilità di tecnologie sempre più sofisticate e accurate per la misurazione delle funzioni vitali offre nuove modalità di accertamento e certificazione dello stato di 'morte' del paziente.

D'altro lato, anche la Società si evolve e con essa mutano i valori dell'etica, della morale, e della fede religiosa.

In questa sede ci limiteremo a riportare brevemente ciò che nella comunità scientifica viene inteso (con largo, ma non assoluto, consenso) per morte biologica e morte clinica.

La distinzione tra queste due definizioni ha importanti riflessi e implicazioni dai punti di vista legale, etico e medico sui quali non ci soffermeremo.

La certificazione della morte clinica si basa sull'accertamento di tre funzioni ritenute essenziali per attribuire il significato di 'vivente' ad un organismo, e cioè: la funzione cardio-circolatoria, la funzione respiratoria e la funzione cerebrale. In pratica, l'assenza di attività autonoma o di riflessi stimolati di queste funzioni autorizza a considerare 'clanicamente morto' il soggetto.

La 'morte biologica' fa invece riferimento al danno irreversibile delle cellule che compongono l'organismo. Ma, come abbiamo visto sopra, la morte delle cellule segue tempi e modalità diverse a seconda del tipo cellulare e del tipo di danno a cui sono sottoposte. Per esempio, i neuroni non possono sopravvivere senza ossigeno per più di 5-10 minuti e, infatti, un criterio per dichiarare la morte cerebrale è l'assenza di segnali elettrici (elettroencefalogramma 'piatto') per almeno 30 minuti (e misurata 3 volte). In assenza di circolazione sanguigna le cellule nervose non ricevono più ossigeno e glucosio e rapidamente vanno incontro a morte necrotica, con conseguente rilascio di enzimi lisosomici che idrolizzano il tessuto in pochi minuti. Le cellule del miocardio possono invece resistere di più, fino a circa 20 minuti, in condizioni di anossia e, dunque, per dichiarare la morte 'cardiocircolatoria' bisogna verificare che non ci sia attività cardiaca (elettrocardiogramma 'piatto') per almeno 20 minuti consecutivi. In questo caso la morte

cellulare avviene per necrosi, successivamente al disperato tentativo di sopravvivenza opposto dalla autofagia.

La morte biologica assoluta di tutte le cellule si completa nelle 24-48 ore successive alla cessazione della circolazione sanguigna. Le ultime cellule a morire sono i globuli rossi, gli spermatozoi e le cellule staminali del bulbo pilifero.

La finestra temporale per l'espianto degli organi è dunque nel periodo che intercorre tra l'accertamento della morte clinica e la morte biologica. Ma per poter utilizzare gli organi trapiantabili è indispensabile mantenere le cellule di questi organi vitali e dunque una volta accertata la 'morte cerebrale' si deve artificialmente mantenere la circolazione sanguigna anche in assenza di attività cardiaca con l'assistenza di appositi macchinari.

La morte delle cellule, dunque, precede, accompagna e segue la morte clinica, contrassegnandosi con i segni di deterioramento delle funzionalità degli organi (in primis il cervello, poi il cuore, e a seguire il fegato, i reni e l'occhio) e prosegue ancora dopo nel tempo fino alla putrefazione e poi colliquazione di tutti i tessuti molli.

Breve biografia dell'autore



Affiliazione: Responsabile del Laboratorio di Patologia Molecolare del Dipartimento di Scienze della Salute di Novara, Università del Piemonte Orientale.

E-mail: isidoro@med.uniupo.it; Web: www.isidorolab.com

Ciro Isidoro è laureato in Scienze Biologiche (Università di Torino, *summa cum laude*) e in Medicina e Chirurgia (Università del Piemonte Orientale, *summa cum laude*). Si è formato alla ricerca sperimentale in numerosi laboratori all'estero. In Germania (Università di Muenster) ha seguito il corso di dottorato in Rerum Medicinalis (Materie Mediche) e poi ha svolto attività come assistente alla ricerca per alcuni anni.

Attualmente è Professore di Patologia Generale presso la Scuola di Medicina dell'Università del Piemonte Orientale. Insegna Experimental Oncology nel corso di Medical Biotechnology e Patologia Generale nel corso di Scienze Biologiche. E' Professeur Honoraire de la faculté de Medicine et Pharmacie de la Université de Franche-Comté di Besançon (Francia). E' Visiting Professor presso la Faculty of Medicine, Siriraj Hospital della Mahidol University di Bangkok (Thailand) e la Faculty of Allied Health Sciences della Chulalongkorn University di Bangkok (Thailand).

Le sue ricerche sono volte alla comprensione dei meccanismi di regolazione dell'apoptosi e dell'autofagia nelle malattie neurodegenerative e nel cancro. E' autore di oltre cento pubblicazioni scientifiche peer-reviewed su giornali specialistici internazionali.