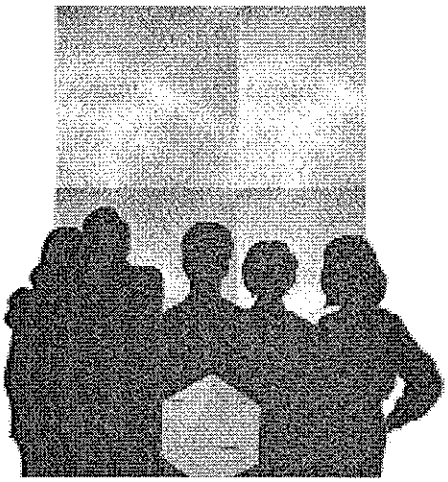
Anno 4 - N. 1
Aprile 1999

Per Vivere



EDITORIALE

Ketha e Marco: Quale libertà? pag. 2
Libertà di cura e rispetto della Costituzione pag. 3

NUOVE PROSPETTIVE

Apoptosi pag. 4

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

Terapia Di Bella: l'ultima parola? pag. 8
Considerazioni sul rapporto ISTISAN 17/98: MDR pag. 10
Quale terapia per bambini con leucemia linfoblastica acuta? pag. 14
Relazione sui pazienti in cura MDR pag. 16
MDB: aspetti tecnici e legali delle preparazioni magistrali pag. 24

ASSOCIAZIONI

Contributi delle sedi nazionali pag. 28

LETTERE AL DIRETTORE

Una parola di speranza pag. 37
Metodo di Bella e potere medico pag. 39
La storia di Mara pag. 40

AIANER Bologna
ANFCC Cortina-Belluno
ATSAT Firenze
AIANMO Modena
AIANP Puglia
AIAN Roma
ANFCC Trento/Brescia
AIANV Veneto

SISTE
VACCINETWORK

Spec. in abb. postale - a. 2 comma 20/c - legge 662/96 - Filiale di Trento

Apoptosi

Dal greco apo (prefisso = oltre, dopo), ptosis (spostamento in giù), per significare una forma di finemente organizzata disintegrazione di una cellula, che si traduce nella risoluzione in vescicole ricoperte da membrane. Che nessuna cellula sia eterna e che tutte muoiano è un concetto da tempo valido in biologia. Che la morte svolga un ruolo decisivo nel conferire forma e funzione ai tessuti adulti, è una evoluzione relativamente recente, che ha raccolto circa 20.000 lavori negli ultimi 5 anni, ed ha illustrato quanta parte ha la morte della cellula nel ricambio ad esempio della cute e delle mucose aereodigestive e genitali, nell'assicurare le funzioni tipiche delle cellule in queste sedi. La mancata, difettosa sostituzione delle cellule che muoiono, con altre funzionanti in condizioni perfette è un principio fondamentale dell'integrità dei tessuti viventi, laddove l'accoppiamento della morte con eccesso di riproduzione porta al tumore o a insufficienze funzionali.

Nella morte di una cellula, come è stato dimostrato la prima volta da H.M. ELLIS e H.R. HORVITZ (Cell, 1986, 44, 817) nel nematode Caenorhabdirtis elegans la morte della cellula appare essere l'esito finale di una serie di reazioni programmate secondo uno schema genetico, impostato sull'attività di *cisteina-proteasi chiamate anche caspasi*, il cui fine precipuo sarebbe quello di eliminare cellule che potrebbero sembrare estranee e pericolose. Il muscolo è provvisto di caspasi o proteasi con cisteina. Dette proteasi esistono normalmente nella cellula come proenzimi inattivi. Nei mammiferi sono state identificate oltre 13 caspasi, che agiscono secondo modalità diverse espresse da "chaperoni apoptotiche" che condizionano l'aumento delle concentrazioni locali dei proenzimi e condizionano la loro disposizione adatta alla loro attivazione.

Tutte le caspasi hanno simile specificità di clivaggio. Il mezzo più semplice di attivazione di una procaspase consiste nell'esporla ad una caspase precedentemente attivata. Si istituisce così la "cascata delle caspasi" una seconda modalità di attivazione è la "vicinanza indotta", come nella caspase-8; i recettori si legano aggregandosi in un complesso, che a sua volta recluta altre caspase-8 dove c'è un'alta concentrazione locale di procaspase-8. Con questa modalità la bassa attività proteasica della procaspase basta a guidare l'attività proteolitica del complesso procaspase- 8-recettore.

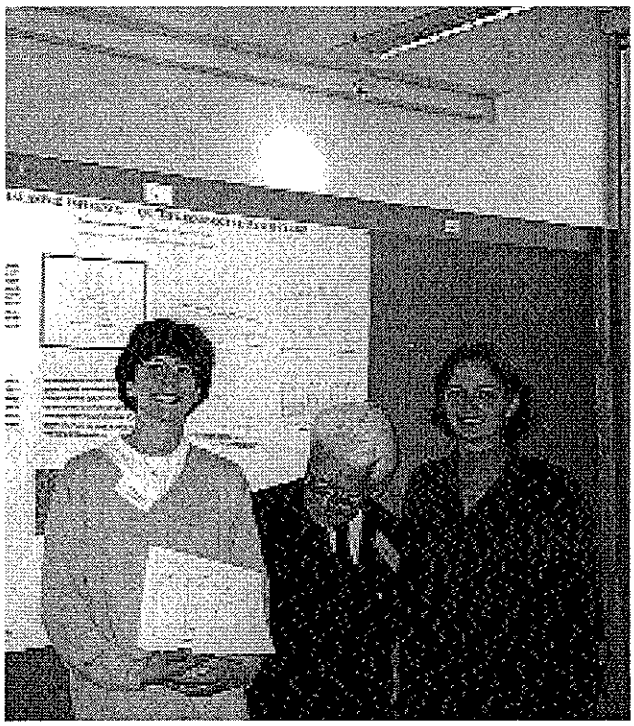
Tutte le caspasi inizialmente attivate, affollandosi per superespressione o aggregazione indotta sono capaci di attivare altre procaspase. Oltre a questa modalità d'attivazione delle caspasi, pare ve ne siano altre due. La morte cellulare nella Caenorhabdirtis elegans segue le identiche tappe dell'apoptosi nei mammiferi. Sono state identificate nelle cellule dei Nematodi tre proteine mortali, una di esse regolatrice dell'apoptosi. Un'altra proteina può interferire con altre caspasi, altre vanno incontro a processi di autoattivazione. Si ritiene che le tre proteine formino un complesso ternario inattivo, l'apoptosoma. Non tutti i componenti del sistema possono oligomerizzarsi.

Un altro importante organo sulla via della morte programmata sono i mitocondri, che sono partecipi di numerose reazioni della apoptosi. Con la liberazione del citocromo C nel citoplasma i mitocondri possono contribuire ad attivare le caspasi. Oltre ad essere sostenute dai recettori della morte, l'apoptosi può anche venire iniziata da vari fattori che possono danneggiare il DNA, compresi la luce ultravioletta, l'irradiazione X e la chemioterapia. Le proteine che risentono del danno del DNA favoriscono l'apoptosi bloccando la divisione cellulare attraverso un'alterazione molto avanzata della cellula. L'alterazione di questo regolatore potrebbe ugualmente indurre alterata proliferazione cellulare e il cancro, quando si autodistruggono o per qualche tempo cessano di dividersi.

Quando l'apoptosi si avvera oltre il tempo giusto si può giungere al M. di Alzheimer. La cura in queste condizioni consisterebbe nell'inibire l'apoptosi, e poiché le caspasi giocano un ruolo preponderante nella maggior parte dei programmi dell'apoptosi, verso le caspasi dovrebbe orientarsi la parte più attraente dell'intervento terapeutico.

MORBO DI ALZHEIMER E APOPTOSI

Oltre alla proteina denominata ß-amiloide (Aß) si è seguita la patogenesi del M. di Alzheimer attraverso lo studio dell'apoptosi. In effetti nei neuroni del cervello di pazienti con M. di Alzheimer si riscontrano diversi segni caratteristici dell'apoptosi, come la frammentazione del DNA. Inoltre oltre alla frammentazione del DNA - segno caratteristico dell'apoptosi - sono state trovate tre proteine: l'Aß ed altre due chiamate presenilina, che sembrano guidare la cellula verso l'apoptosi. La mancata riproduzione di



Il prof. Di Bella e le dott.sse Silvia Minuscoli e Carla Bruschi - Amburgo, 27 agosto 1998

un modello di Alzheimer negli animali non si è potuto ancora dimostrare con certezza se inibendo l'apoptosi si blocca anche l'Alzheimer.
Che l'apoptosi potesse avere un ruolo nella morte del neurone nell'Alzheimer fu postulato da COLTMAN C.W. e A.J. ANDERSEN (Molecular Neurobiology: 1995, 10, 19) con la dimostrazione che la proteina Aß che si forma nei cervelli colpiti da Alzheimer provoca la morte di neuroni in cultura con un processo di apoptosi e non di necrosi. Il reperto ulteriore di frammentazione del DNA lasciò scettici alcuni ricercatori. COLTMAN ha trovato anche attivazione delle caspasi; però in qual maniera la proteina Aß provochi l'apoptosi non è ancora nota. L. D'AMIAMIO & coll. dell'Istituto Nazionale d'Allergia e malattie infettive videro nel 1996 che cellule PC coltivate, simili ai neuroni in presenza di presinilina sono molto più sensibili ai fattori dell'apoptosi, compresa la proteina Aß. Una forma mutante della cellula PC_{12} che formava forme mutanti di presenilina 2 moriva con maggiore probabilità.
Diversi AA. francesi hanno visto che due proteine - la p-53 e la p-21 - cambiano la produzione di presenilina 1, il che favorisce l'apoptosi, come se la presenilina 1 fosse normalmente ad attività antiapoptasica. Altri AA. hanno visto che in neuroni coltivati che vanno incontro ad apoptosi le preseniline sono eliminate dalle caspasi come se la presenilina 1 inattivasse il processo eliminando la caspasi.
Sembra anche che forme mutanti di presenilina possano essere meno attive delle proteine normali. Se le cose fossero così una cura sarebbe l'eliminazione della distruzione della presenilina. Le vedute sulla funzione della presenilina sono tuttora speculative, e non sono dimostrate. La maggior parte degli AA. ritiene che se l'Alzheimer è provocata da apoptosi, questa è allora provocata da Aß, e l'effetto della mutata presenilina consisterebbe nell'aumentare i livelli di Aß. In diversi laboratori si è dimostrato che preseniline mutanti inducono i neuroni a formare maggiori quantità di Aß, particolarmente la forma più pericolosa di presenilina che contiene 42 aminoacidi. Ciò significherebbe che mutazioni della presenilina siano in grado di provocare Alzheimer generando maggiori quantità di Aß 42.
Occorrono chiaramente più ricerche, anche se l'apoptosi gioca un ruolo nella genesi dell'Alzheimer. Molti tuttavia sono gli AA. che ritengono che se anche l'apoptosi venisse rallentata o bloccata la cascata dei fenomeni che portano all'Alzheimer fosse bloccata. Quando si ha l'apoptosi i neuroni sono già tanto danneggiati anche se si blocca l'apoptosi.

SEGNALAZIONE E MODULAZIONE

Recettori dell'Apoptosi

Il controllo del numero di cellule nei metazoi si svolge per eliminazione di cellule pericolose per l'esistenza. Alcune si comportano come sensori, sono denominate recettori della morte e reagiscono alla presenza di segnali extracellulari scatenando il meccanismo intrinseco dell'apoptosi.
Nei metazoi vi sono cellule che contengono l'apparato enzimatico capace di attivare l'apoptosi. Nel nematode Caenorhabditis elegans vi sono tre prodotti genici, essenziali per l'apoptosi: CED-3 e CED-4, che la promuovono, e il CED-9 che la inibisce (MENGARTNER M.O. & H.R. HORVITZ: Cell, 1994, 76, 665). Il CED-3 è una caspase, una cisteinprotease, che idrolizza alcune proteine dopo residui specifici di ac. aspartico; l'enzima è reperibile come zymogeno, che viene autoattivato (SALVESEN G.S. et al.: Science 1998, 281, 1312). Il CED-4 si lega al CED-3, e ne promuove l'attivazione; il CED-9 invece si complessa con CED-4 e CED-3 e mantiene inattivo il CED-3. Gli stimoli dell'apoptosi staccano il CED-9, attivano così CED-3, mentre il CED-9 si lega al CED-4 ed impedisce che si attivi il CED-3.

Il CED-9 normalmente è complessato con CED-4 e CED-3, e mantiene il CED-3 inattivo. Gli stimoli dell'apoptosi provocano una dissociazione del CED-9, consentono un'attivazione del CED-3 ed inducono l'apoptosi. Nei mammiferi le caspasi sono simili al CED-3. L'APAF-1 è l'unico omologo del CED-4. I prodotti della famiglia genica di mammiferi B-cl-2 sono correlati con CED-9 e comprendono 2 sottogruppi di proteine capaci di inibire o promuovere l'apoptosi.

Il meccanismo dell'apoptosi viene normalmente governato dall'ambiente della cellula e da sensori nel suo interno. La cellula inizia l'apoptosi quando perde i contatti con l'esterno ovvero quando sopravvengono danni nel suo interno. S'instaura anche l'apoptosi quando una cellula viene contemporaneamente sollecitata a progredire o a dividersi. Un altro meccanismo è anche quello dell'"apoptosi" istruttiva, particolarmente importante nel sistema immunitario. I "recettori della morte" si trovano sulla superficie della cellula e trasmettono i segnali per l'apoptosi a partire da specifici "leganti mortali" che possono attivare caspasi mortali entro pochi secondi dal legame, provocando un decadimento della cellula nell'ambito di qualche ora. I recettori della morte appartengono al TNF (= tumor necrosis factor), di una superfamiglia di recettori genici che stanno nel dominio extracellulare ricco di cisteina. Questi recettori avviano il meccanismo dell'apoptosi, per quanto talvolta possono dominare il meccanismo opposto.

I meglio caratterizzati recettori della morte sono CD 95, chiamato anche Fas o Apol, ed INFRI, chiamato anche p 55 o CD120a. Altri recettori della morte sono quello degli uccelli CAR 1, il DR 3 o APO 43, il WSL_1, TRAMP o LARD - DR4 e DR5 è chiamato anche APO_2, TRAIL- R_2, TRICK-2 o KILLER. Il p-75, ONGF contiene anche un dominio recettivo della morte. I legami che attivano questi recettori ad eccezione della NGF appartengono alla superfamiglia del gene TNF. CD 95 e CD 95L giocano un ruolo importante soprattutto in 3 tipi di apoptosi fisiologica. La delezione periferica di cellule T mature attivate al termine della risposta immunitaria. L'uccisione di bersagli, come cellule infette da virus, o cellule cancerose da parte di cellule T e di cellule natural killer; uccisione di cellule infiammatorie in punti immunitariamente privilegiate come l'occhio. Dati sulla funzione biologica di CD 95 si sono ottenuti da certi ceppi di topi e da pazienti che hanno geni difettosi per CD 95 o CD 95L.

Tali mutazioni possono portare ad accumulo di cellule linfoidi alla periferia e ad una fatale sindrome autoimmune caratterizzata da allargamento massivo dei linfonodi. CD95 e CD 95L partecipano anche alla soppressione patologica della sorveglianza immunitaria, cioè alla eliminazione di cellule immuno reattive al tumore, che costituzionalmente esprimono CD 95L.

Come altri termini della famiglia TNF, anche il CD 95L è una molecola omotrimerica. La struttura cristallina di linfotossina alfa nel complesso con TNF 1 induce a pensare per analogia che ogni trimero CD 95L leghi la molecola di CD 95. Poiché nel dominio della morte appare la tendenza associativa il legame di CD 95 porta all'ammasso di recettori nel dominio della morte. Una proteina chiamata FADD (Fas Associated death Domainh, ed anche Mart) si lega a mezzo della parte della morte all'ammasso dei recettori della morte. FADD contiene anche un "dominio di affettore della morte" che si lega ad una parte analoga ripetuta in tandem nell'ambito della forma zimogenica della caspase-8 (chiamata anche FLICE o MACH). Si tratta di un esempio specifico di una interazione omofila globale denominata ARD, che si trova in diverse caspase con vasto predominio, comprendente le caspasi-2,-8,-9,-10. Per reclutamento con FADD l'oligorimerizzazione del-

la caspase-8 dirige la sua attivazione attraverso un autoclivaggio. La caspase-8 poi attiva le caspasi effettive come la caspase 9, l'omologo funzionale nei mammiferi della CED-3, che porta la cellula verso l'apoptosi. Il FADD è essenziale per l'induzione dell'apoptosi ad opera del CD 95. Oltre all'accoppiamento con CD 95 per la caspase-8 il FADD possiede anche altre funzioni di segnalazione critica. Diverse altre proteine citoplasmatiche oltre il FADD possono legarsi con CD 95.
Il TNF viene prodotto da macrofagi attivati e da cellule T, in risposta a processi infettivi. Il TNF attiva i fattori di trascrizione NF-KB e AP-l che attivano i geni dei fattori di trascrizione dell'infiammazione e dell'immunomodulazione. In alcuni tipi di cellule il TNF induce apoptosi attraverso il TNF R_1. Contrariamente al CD 95L il TNF difficilmente scatena apoptosi a meno che sia bloccata la sintesi proteica, il che suggerisce la preesistenza di fattori cellulari che possano sopprimere lo stimolo per l'apoptosi generato del TNF. L'espressione di queste proteine soppressive è probabilmente controllata da NF-KB e da JNK/AB 1.
Il TNF trimerizza il TNF R_1 fattore a seguito di legame, provocando l'associazione dei recettori del dominio della morte.
L' idea di marcare recettori specifici della morte per indurre apoptosi nei tumori è attraente, in quanto i recettori della morte hanno accesso diretto al meccanismo della caspase. Contrariamente a molti chemioterapici o radiazioni i recettori della morte danno inizio all'apoptosi indipendentemente dal gene soppressore del tumore p-53, che risulta inattivato per mutazione in oltre la metà dei cancri umani. Malgrado questi vantaggi l'utilità clinica del TNF come del CD 95L è stata ostacolata da effetti tossici collaterali. La somministrazione sistemica di certe dosi di TNF provoca una grave infiammazione simile ad uno schok settico, che si ritiene condizionata soprattutto dall'induzione di geni proinfiammatori nei macrofagi e nelle cellule endoteliali a mezzo dell' attivazione con NF-KB. L'iniezione di anticorpi a CD 95 nei topi portatori di tumore può riuscire letale per induzione di apoptosi negli epatociti che esprimono grandi quantità di CD 95.

MITOCONDRI E APOPTOSI

Numerosi aspetti dell'apoptosi sono correlati con i mitocondri, come la liberazione di attivatori delle caspasi come il citocromo C, i cambiamenti nel trasporto elettronico, l'alterata ossido-riduzione cellulare, la partecipazione della famiglia delle proteine pro- e anti-apoptiche B cl-2.
Circa due milioni di anni fa le cellule progenitrici di quelle degli eucaroti entravano in associazione con gli antenati di batteri con porpora. Il che diede enormi vantaggi nell'atmosfera di O2 che emergeva e che era tossico alla massima parte delle altre forme. Ne risultò una cellula protoeucariotica i cui batteri endosimbiotici divennero i mitocondri.
Con questa alleanza sorsero conflitti catastrofici fra i due gemoni. Nel nuovo mondo aerobico la vita e la morte vennero controllati dai protomitocondri che fornirono non solo antiossidanti critici, ma anche una fonte di specie di ossigeno reattivo (ROS) quale prodotto collaterale della fosforilazione ossidativa. Le condizioni che favorirono i protomitocondri nei confronti della cellula ospite avrebbero provocato la morte della cellula e la liberazione del liberamente vivente endosimbionte. La simbiosi sarebbe perciò diventata pericolosamente instabile, fintanto che geni essenziali per il metabolismo dei mitocondri e per la biogenesi non si sarebbero trasferiti al genoma nucleare, risultandone una simbiosi obbligata. L'apoptosi è indipendente dalla fosforilazione ossidativa, mancando l'esigenza di un DNA mitocondriale. La funzione centrale dei mitocondri come orchestratori dell'apoptosi è riconosciuta in diversi sistemi.
Oggi sappiamo che gli effettori dell'apoptosi sono una famiglia di proteasi cisteiniche intracellulari chiamate caspasi. Inibendo le caspasi non si riesce sempre ad inibire la morte indotta da stimoli proapoptotici. Anche se inibitori delle caspasi bloccano una parte o tutta la morfologia apoptotica indotta da sottrazione di fattore di crescita, da etoposide, actinomicina D, UV, stauroporina, cresciuta espressione di cMyc, o glucocorticoidi, non necessariamente mantengono il potenziale replicativo o clonogenico; alla fine la cellula, malgrado inattivazione della caspasi muore con una morte più lenta non apoptotica. Al contrario delle proteine antiapoptotiche come Bcl-2, Bclx' e Abl oncogene possono mantenere la sopravvivenza e la clonogenicità a seguito di questi trattamenti. Al contrario alcune proteine proapoptotiche come Bax, una proteina della morte di cellule di mammiferi, che si localizza sulle membrane mitocondriali, può provocare danno ai mitocondri e la morte delle cellule anche quando le caspasi sono inattivate. Queste osservazioni confermano l'esistenza di una morte cellulare.

Prof. Luigi Di Bella