

GOGU I. GHIORGHITĂ

**MOARTEA CELULARĂ PROGRAMATĂ ȘI
MECANISMELE EI**

**PROGRAMMED CELL DEATH AND ITS
MECHANISMS**



Editura Academiei Oamenilor de Știință din România

București 2012

Referenți științifici:

Prof. univ. dr. Constantin Toma - membru titular al Academiei Române

Prof. univ. dr. Dumitru Cojocaru - Universitatea "Al. I. Cuza" din Iași

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

GHIORGHIȚĂ, GOGU

Moartea celulară programată și mecanismele ei /

Gogu Ghiorghiță. - București : Editura Academiei Oamenilor
de Știință din România, 2012

Bibliogr.

Index

ISBN 978-606-8371-77-1

576.36

Coperta și punerea în pagină: biolog dr. Mihaela Hârțan.

Lucrarea de față a apărut cu sprijinul Universității de Vest "Vasile Goldiș" din Arad.

Dedic această lucrare, ca semn al neuitării, memoriei a trei distinse personalități dispărute prematur dintre noi, adevărați profesioniști, care au avut în comun strălucirea, dorința și ambiția de a performa în domeniul lor: prof. univ. dr. Ion Băra, prof. univ. dr. Ioniță Ichim și prof. gr. I Dana Palaghiță.

CUPRINS

	Pag.
Cuvânt înainte	13
1. Apoptoza – definiție, istoric	17
2. Necroza și apoptoza – două forme diferite ale morții celulare	22
3. Modificări biochimice prezente în apoptoză	29
4. De ce a fost „inventată” apoptoza?	32
5. Factori care induc și care inhibă apoptoza	34
5.1. Factori care induc apoptoza	34
5.2. Factori care inhibă apoptoza	39
6. Fazele apoptozei	42
7. Mecanismele moleculare ale apoptozei	47
7.1. Semnale și receptori în apoptoză	47
7.2. Gene, proteine adaptor și alte proteine implicate în apoptoză	56
7.3. Caspazele și rolul lor în apoptoză	75
7.3.1. Structura și clasificarea caspazelor	75
7.3.2. Mecanismele de activare a caspazelor	81
7.3.3. Substraturile din aval pe care acționează caspazele	97
7.4. Căile de realizare a apoptozei	99
7.5. Reglarea apoptozei	104
8. Inducerea apoptozei în procesele fiziologice normale	107
9. Apoptoza în procesele patologice	116
9.1. Apoptoza în infecțiile virale și bacteriene	116
9.2. Apoptoza și cancerul	121
9.3. Boli determinate de dereglarea apoptozei	127
9.4. Apoptoza și bolile autoimune	128
10. Moartea celulară programată la plante (MCP)	134
10.1. MCP în cursul creșterii vegetative a plantelor	140
10.2. MCP în cursul dezvoltării reproductive a plantelor	145
10.3. MCP în interacțiunea dintre plante și mediul abiotic și biotic	147
10.3.1. MCP ca răspuns la stresul abiotic	147
10.3.2. MCP ca răspuns la agenții patogeni	153
10.4. Metacaspazele și paracaspazele	157
10.5. Enzimele de procesare vacuolară (VPE)	164
11. MCP la animale versus MCP la plante	166
Bibliografie	173
Glosar de termeni	183
Summary	190

CONTENT

Foreword	13
1. Apoptosis – definition, history	17
2. Necrosis and apoptosis – two different forms of cell death	22
3. Biochemical changes present during apoptosis	29
4. Why was apoptosis „invented“?	32
5. Factors that induce or inhibit apoptosis	34
5.1. Factors that induce apoptosis	34
5.2. Factors that inhibit apoptosis	39
6. Phases of apoptosis	42
7. Molecular mechanisms of apoptosis	47
7.1. Signals and receptors in apoptosis	47
7.2. Genes, adaptor proteins and other proteins involved in apoptosis ...	56
7.3. Caspases and their role in apoptosis in animals	75
7.3.1. Caspases – structure and classification	75
7.3.2. Mecanism of activation of caspases	81
7.3.3. Downstream substrates on which caspases manifest their role ..	97
7.4. Methods of assessing apoptosis	99
7.5. Apoptosis regulation	104
8. Induction of apoptosis in physiologically normal processes	107
9. Apoptosis during pathological processes	116
9.1. Apoptosis during viral and bacterial infections	116
9.2. Apoptosis and cancer	121
9.3. Diseases caused by apoptosis disorders	127
9.4. Apoptosis and autoimmune diseases	128
10. Programmed cell death in plants (PCD)	134
10.1. PCD during plant vegetative growth	140
10.2. PCD during plant reproductive development	145
10.3. PCD during the interaction plants - abiotic and biotic environment	147
10.3.1. PCD in response to the abiotic stress	147
10.3.2. PCD in response to the pathogens	153
10.4. Metacaspases and paracaspases	157
10.5. Vacuolar processing enzymes (VPE)	164
11. PCD in animals versus PCD in plants	166
References	173
Index of terms	183
Summary	190

ABREVIERI

ABA - acid abscisic
ADCC - Antibody dependant cellular cytotoxicity
AICD - Activation induced cell death
AIF - Apoptosis inducing factor
AKT - Protein kinaza B
AMC - 7-amido-4-metilcumarină
AMPc - Adenozin monofosfat cyclic
AL – apoptosis-like
ANT - Adenine nucleotide translocator
Anx-1 –anexina-1
AP-1 - Protein activator- 1
Apaf-1 - Apaf-1 Apoptotic Protease Activating Factor 1
Arc – activity-regulated cytoskeleton-associated protein
ASC - apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
BI-1 - Bax-Inhibitor 1
Bim – membru al familiei de proteine Bcl-2, BH3-only
Bmf – membru al familiei de proteine Bcl-2, BH3-only
bcl-2 - Proto-oncogenă ce codifică proteina Bcl-2, care inhibă sinuciderea celulară
CAPK- Kinază activată de ceramide
CARD - Caspase activation and recruitment domain
CD - Cell death (receptori de Ig de diverse densități)
Cdk - Kinaze ciclin-dependente
Ced - Cell death defective
CL - caspase-like
CMH - Complexul major de histocompatibilitate
CPT – camptotecină
CRADD - Caspase and RIP adapter with death domain
CrmA - Cytokine response modifier (proteină precoce a cowpox virus - virusul vaccinului)
CTL - Limfocite T citotoxice
DCC - Deleted in colorectal cancer
DED - Death effector domain
DD - Death domain
DIABLO - Direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI
DISC - Death inducing signalling complex
DR - Death receptor
EGR - Early growth response factor-1
ET - Elemente traheale
FADD/MORT1 - Fas-associated protein with death domain
Fas/CD95 - Proteină transmembranară ce poate iniția căile de semnalizare celulară spre apoptoză
FasL - Fas ligand
FITC - Fluorescein isothiocyanate
FLICE inhibitory protein (c-FLIP) - {FADD(Fas-associated death domain)-like IL- 1 β -converting enzyme} – este o proteină anti-apoptotică
fmk = fluoro-metil-cetonă
FLASH - Proteină ce conține semnalul de transducție a Fas, omoloagă cu Ced-4 fmk – fluorometilcetonă
GFP - Green fluorescent protein
GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HGF - Hepatocyte growth factor
HR - Hypersensitive reaction or respons

HR-MCP - moarte celulară programată ca urmare a unui răspuns hipersensibil la plante
Hrk - Genele (proteinele) Harakiri
HtrA2/Omi – serin protează mitocondrială implicată în apoptoză
IAP - Inhibitor of apoptosis protein
ICE - Interleukin -1 β converting enzyme
IFN - Interferon
ITIM/ITAM - Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
JNK - c-Jun N-terminal kinases; proteine de legare ADN, codificate de genele c-jun
KIR - Killer Ig like receptors
LGL - Large granular lymphocytes
LPC - Lysophosphatidylcholine
LPS - Lipopolizaharide
LSD1 - proteină ce monitorizează un semnal superoxid-dependent și funcționează ca regulator negativ al morții celulare la plante
MAP-1 - Modulator of apoptosis-1
MAPK - Mitogen-activated protein kinases
MCA - metacaspază
MCP – moarte celulară programată
MDM2 – mouse double minute 2
MMP – permeabilizarea membranei mitocondriale
NF- κ B - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK cells - Natural Killer (celule care atacă direct structuri și antigene non-self)
NO - Oxid de azot
P2Z receptor - Receptor purinergic, responsabil de liza ATP-dependentă
PAR - poly-(ADP)-riboză
PARP - Poli-(ADP-ribozil)-polimeraza
PCR - Polymerase chain reaction
PI - Propidium iodide
PKA - Serin-treonin kinază
PKC - Protein kinaza C
PPT – porul permeabilității de tranziție
PPV – Protease precursor vesicles
PMM – permeabilitatea membranei mitocondriale
PRX - Peroxiredoxins
PS - Phosphatidylserine
PSR - Phosphatidylserine receptor
Pst - *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*
PTEN – phosphatase and tensin homolog
PTPC - complexul porului permeabilității de tranziție
RE - Reticulul endoplasmatic
RAIDD - RIP-associated ICH-1/Ced-3 homologous death domain protein
RIP - Receptor interacting protein
RM - rupturi monocatenare ale ADN
ROS/ROI - Reactive oxygen species/reactive oxygen intermediates
RuBisCO - Ribulozo-bifosfat-carboxilază
SA – acid salicilic
SAPK - Stress-activated protein kinases
SARP - Secreted apoptosis related proteins
SLE - Systemic lupus erythematosus
SMAC - Second mitochondria-derived activator of caspases
SOD - Superoxid dismutază
SRP - Signal recognition particle
STX – Staurosporină
TGF – transforming growth factor

TNF - Tumor necrosis factor
TNFR - Tumor necrosis factor receptor
TRADD - TNFR1 associated protein with death domain
TRAF - TNF-associated factor
TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRX - Tioreodoxină
TSN - Tudor Staphylococcal Nuclease
TSP - Trombospondină
TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase –mediated dUTP nick end labeling
U1 - Particulă ribonucleoproteică din nucleu esențială în racordarea precursorilor ARNm
VDAC - voltage-dependent anion channel
VMN – virusul mozaicului napului
VMT – virusul mozaicului tutunului
VPE – enzime de procesare vacuolară
WAN-1 = proteină specifică *C. elegans*, ortolog al ANT de la mamifere
ZEN1 - *Zinnia* endonuclease-1
zVAD-fmk - Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-(OMe)-fluoromethylketone

Cuvânt înainte

Fenomenul de dispariție a unor celule prin moarte naturală în cursul dezvoltării organismelor a fost observat încă din a doua jumătate a secolului al XIX-lea, dar a fost neglijat o lungă perioadă de timp. Confirmarea lui a venit de abia în intervalul 1965-1972, în urma unor experiențe efectuate de Kerr și colaboratorii săi pe ficatul de șobolan, în care s-a observat că prin întreruperea fluxului de sânge în unii lobi hepatici unele celule dispăreau printr-un proces morfologic diferit de *necroza celulară* tipică. Acest tip de moarte celulară, observat de autor și în celulele bazale de carcinom și în alte forme de tumori maligne netratate, a fost confirmat apoi de numeroși alți autori și a primit numele de *apoptoză*. Fenomenul de apoptoză a fost recunoscut și acceptat ca modalitate distinctă și importantă de moarte celulară programată la animale după publicarea rezultatelor obținute de Horvitz (1999) în studiile sale de acest gen întreprinse la nematodul *Caenorhabditis elegans*.

Necroza celulară este un proces pasiv, o formă patologică de moarte celulară cauzată de agenți nocivi de natură fizică, chimică etc, în care are loc distrugerea integrității membranei plasmatică, pierderea conținutului celular și apariția unui proces inflamator, iar eliminarea celulelor afectate se realizează prin fagocitoza sistemului mononuclear. Apoptoza este un fenomen fiziologic normal, activ, este o moarte celulară programată, nedestructivă, care se produce cu consum de energie, în care celulele animale își păstrează integritatea membranei plasmatică, dar se micșorează, iar nucleul lor se condensează, apoi conținutul acestora se separă în fragmente delimitate de membrane (*corpi apoptotici*), a căror eliminare de către macrofage se face fără urme, nefiind însoțită de un proces inflamator. Prin apoptoză un organism pluricelular elimină unele celule nedorite, realizându-și astfel homeostazia celulară. În timp ce modificările celulare provocate de apoptoză sunt coordonate și programate genetic, cele specifice necrozei au un nivel ridicat de autonomie, sunt mai mult procese de natură reactivă față de acțiunea nocivă a unor factori fizici și chimici diverși.

Prin apoptoză se modelează forma unui organism pluricelular sau a unor organe ale acestuia, sunt eliminate celule aflate în exces, nefuncționale sau greșit plasate, celule care se dezvoltă anormal (care au material genetic grav lezat și nereparabil), celule potențial periculoase (celule canceroase, celule autoreactive ale sistemului imun, celule infectate de virusuri etc), sunt produse celule diferențiate lipsite de organite celulare etc. Se consideră că în corpul uman sunt produse prin mitoză cca 100.000 de celule în fiecare secundă și cam tot atâtea mor prin apoptoză. Apoptoza este un fenomen complex, multifazic, în care intervin semnale (din interiorul și din exteriorul celulei), precum și unii receptori specifici. Arsenalul proteinelor și enzimelor care participă la inițierea și desfășurarea apoptozei este impresionant. Principalii „actori” ai apoptozei sunt însă *caspazele*, enzime care au capacitatea de a scinda legăturile peptidice ale substratului după un rest de acid aspartic. Caspazele apoptotice sunt de două categorii: *caspaze inițiatoare (apicale)* și *caspaze de execuție (efectoare sau din aval)*. Ele au o organizare în cascadă, cele inițiatoare fiind situate în amonte, iar cele de execuție în aval. Substratul caspazelor poate fi constituit din proteine citoplasmice și nucleare, proteine ce iau parte la metabolismul și reparația

ADN-ului, protein-kinaze, proteine implicate în transducția semnalului și în exprimarea genelor, în reglarea ciclului celular și a proliferării celulare etc. Activarea caspazelor se poate produce fie pe calea apoptotică mediată de receptorii morții (în care receptorii din familia TNF activează caspaza-8 din amonte), fie pe calea mitocondrială (în care, prin eliberarea *cyt. c* din mitocondrii, este activată caspaza-9 din amonte). Ambele căi duc în final la activarea unei caspaze efectoare majore din aval (în principal a caspazei-3), iar prin acțiunea caspazelor de execuție apar modificările morfologice specifice celulelor animale intrate în apoptoză, dezasamblarea celulară, fragmentarea nucleului și a citoscheletului, formarea corpilor apoptotici și fagocitarea lor de către macrofage, dispariția fără urme a celulei în cauză și fără consecințe pentru celulele din jur.

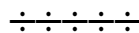
Apoptoza este un proces controlat, dereglarea acesteia – fie în sensul intensificării, fie în sensul reducerii ei – ducând la stări patologice. O apoptoză deficitară poate conduce la cancer, autoimunitate (incapacitatea de a elimina limfocitele autoreactive), infecții persistente (incapacitatea de a eradica celulele infectate) etc, în timp ce o apoptoză excesivă poate contribui la boli neurodegenerative (bolile Alzheimer, Parkinson, Huntington, scleroza laterală amiotrofică), la autoimunitate (inducerea apoptozei necontrolate în organe specifice), la SIDA (depleția limfocitelor T) și ischemie (atac de cord, infarct miocardic) etc.

Moartea celulară programată (MCP) nu este un fenomen specific doar animalelor. Ea însoțește și creșterea și dezvoltarea plantelor din momentul germinării semințelor, până la maturarea și senescența plantelor. Deși MCP la plante are unele asemănări cu apoptoza la animale, ea prezintă totuși diferențe importante, întrucât plantele nu au un sistem imun, nu conțin fagocite, iar peretele celular specific plantelor împiedică formarea corpilor apoptotici. MCP la plante este implicată într-o serie de procese specifice acestora, cum ar fi: formarea embrionului, degenerarea stratului de aleuronă în timpul germinării semințelor la monocotiledonate, formarea elementelor traheale ale xilemului, formarea aerenchimului în rădăcini și a unor tipuri de trichomi epidermali, ablația organelor florale, eliminarea celulelor primordiilor de stamine la florile femele ale speciilor monoice, degenerarea celulelor tapet ale anterei, auto-incompatibilitatea polenului, formarea lobilor și perforațiilor foliare, dehiscența fructelor sau spargerea păstăilor etc. La plante, factori de stres cum ar fi hipoxia, deficitul hidric, radiațiile UV, salinitatea, temperaturile extreme, poluanții, toxinele, metalele grele etc, pot induce un stres oxidativ ce poate fi urmat de moartea celulară. MCP poate interveni la plante și ca răspuns la agenții patogeni.

În ciuda progreselor înregistrate în ultimul timp în domeniul MCP, la plante nu s-au găsit omologi strâns înrudiți cu caspazele, dar s-a identificat o familie de proteaze ancestrale implicate în MCP – *metacaspazele*. Aceste enzime sunt specifice doar eucariotelor lipsite de caspaze și execută activități *caspase-like*, fiind implicate în moartea celulară, deși nu pot cliva substraturile caspazelor. S-ar putea însă ca pe viitor să asistăm la unele surprize, pentru că recent Sundström et al. (2009) de la Universitatea de Științe Agricole din Upsala (Suedia) au constatat că o proteină cu funcție anti-apoptotică bine conservată evolutiv, TSN (*Tudor Staphylococcal Nuclease*), este degradată în timpul MCP de proteaze specifice: de *caspaze* în cazul celulelor animale și de *metacaspaze* în

cazul celulelor plantelor (fapt ce anulează funcția ei anti-apoptotică). Celulele cărora le lipsește proteina TSN, suferă frecvent MCP prematură. La plante s-a identificat și o altă familie de proteaze – enzimele de procesare vacuolară (VPE) care execută activități de tip caspază. VPE sunt cistein-proteaze și deși nu sunt înrudite cu caspazele și metacaspazele, au unele proprietăți enzimatiche comune cu ale caspazei-1. Metacaspazele și VPE par să fie primii candidați cu responsabilități de activități caspase-like la plante.

Deși în ultimele două decenii s-au înregistrat progrese însemnate în cunoașterea căilor și mecanismelor morții celulare programate la animale și la plante, domeniul acesta are încă destule incertitudini. Dacă la animale lucrurile sunt ceva mai clare, în sensul existenței unui program unic al MCP (cu două căi principale de realizare), la plante par să existe mai multe programe operaționale ale MCP. Este evident însă că sistemele MCP la animale și la plante nu sunt similare, pentru că nici unul din sistemele de moarte celulară descrise la plante nu pare să aibă toate trăsăturile specifice apoptozei de la animale, (Krishnamurthy et al., 2000). Împărtășim opinia unor autori care consideră că MCP ar fi la fel de veche ca și celula primordială, fiind prezentă nu numai la eucariotele pluricelulare, ci și la unele procariote și eucariote unicelulare. Pe parcursul evoluției organismelor pluricelulare, MCP ar fi fost „fin acordată” pentru a îndeplini unele roluri, cum ar fi controlul social al membrilor celulari într-un organism.



Mi-am dorit de ceva vreme să mă apropiez de subiectul abordat în această carte, întrucât el îmi apărea a fi unul extrem de incitant și voiam să-i cunosc unele detalii și taine, dar am avut mereu alte priorități. Ocazia s-a ivit în urmă cu 5 ani, când mi s-a oferit să prezint un curs despre apoptoză studenților de la școala doctorală. Îmi procurasem mai demult un volum cu lucrări pe această temă, apărut în 1999 chiar sub coordonarea celui care a fondat domeniul - profesorul F. R. J. Kerr, volum pe care nu avusesem însă răgazul să-l deschid până atunci. Mi-au fost de mare folos la început și informațiile ample conținute în două lucrări monografice apărute în România în același an, semnate de specialiști în acest domeniu, una de către profesorul Dănăilă și colaboratorii săi, iar cealaltă de către Moldoveanu și Popescu (autori citați frecvent în această carte). Aveam să constat curând că în domeniul apoptozei s-a lucrat și s-a scris enorm, astfel încât sarcina oricui de a face o sinteză a cunoștințelor acumulate în acest domeniu nu este defel una ușoară. Nici nu mi-am propus de altfel acest lucru, ci mai degrabă am vrut să scriu o carte care să se constituie într-un fel de abecedar al domeniului, o încercare de a face cât de cât accesibil tuturor celor interesați, indiferent de domeniul lor de competență, un subiect suficient de complex și de complicat, pe lângă care nu poți trece indiferent, fără oarecare emoție și chiar sfială. În ce măsură am reușit în tentativa mea, numai cititorul va putea să decidă. Aș vrea să cred totuși că lucrarea de față va stârni interes și prin faptul că ea tratează nu doar moartea celulară programată în regnul animal, ci și modalitățile și mecanismele acestui proces în regnul vegetal, fiind din acest punct de vedere inedită în peisajul științific românesc.

Publicarea acestei lucrări a fost posibilă și datorită sprijinului acordat de domnul prof. univ. dr. Aurel Ardelean – rector fondator și președinte al Universității „Vasile Goldiș” din Arad, un om pe care îl respect și prețuiesc în

mod deosebit pentru că este un român adevărat și pentru contribuția sa la dezvoltarea biologiei și a învățământului superior în România.

Mi-au fost aproape în acest demers mai tinerii mei colegi biologi, dr. *Mihaela Hârțan*, dr. *Diana Elena Maștei* și dr. *Daniel Ioan Maștei*, cărora le aduc mulțumiri pentru sprijinul acordat în tehnoredactarea, ilustrarea și punerea în pagină a lucrării, în traducerea rezumatului ei, în realizarea copertei, pentru unele sugestii etc

Autorul

1. Apoptoza – definiție, istoric

În condiții normale de viață o celulă (aparținând unui organism pluricelular, fie reprezentând un organism monocelular) își urmează ciclul specific de viață, care cel mai adesea se sfârșește cu diviziunea ei și cu formarea a două celule identice. S-a constatat totuși că în condițiile cultivării *in vitro* celulele nu se divid la infinit, chiar dacă dispun de condiții optime de creștere (prin suplimentarea mediului nutritiv cu factori de creștere). Astfel, în timp ce fibroblastele provenite de la un fetus uman se divid în cultură de 80 de ori, cele provenite de la un adult în vârstă de 40 de ani se divid de numai 40 de ori, (Dănăilă et al., 1999). Celulele au deci o capacitate limitată de proliferare, după care își încetează funcțiile vitale, printr-un mecanism care nu depinde de factorii favorabili sau nefavorabili în care trăiesc. Într-un organism pluricelular adult, diviziunea și moartea celulară, două procese contradictorii, asigură menținerea unui număr constant de celule într-un anumit organ. Acest echilibru, *homeostazia* (alții o numesc *homeodinamie*), se realizează atunci când într-un țesut rata mitozei este compensată de rata morții celulare, iar în cazul când acest echilibru este perturbat, pot avea loc două evenimente importante și nedorite: 1) fie celulele se divid mai rapid decât ele mor și atunci se inițiază un proces de dezvoltare tumorală; 2) fie celulele se divid mai încet decât ele mor și atunci au loc pierderi de celule (cazul unor boli neuro-degenerative).

La începutul anilor 1960 se acorda un interes deosebit studiului lisosomilor (organite celulare descoperite anterior de De Duve și colaboratorii săi) și implicării acestora în producerea morții celulare în urma acțiunii unor agenți dăunători, care ar determina eliberarea enzimelor digestive din lisosomi (ipoteza fiind cunoscută sub numele de “*suicide bag*” – *sacul sinucigaș*). Un aport important la descoperirea morții celulare normale (programate) și la definirea termenului de *apoptoză* au avut cercetările efectuate de Kerr și colaboratorii săi între 1965 și 1972. În investigații efectuate pe ficatul de șobolan, autorii au întrerupt fluxul de sânge prin ramurile venei porte în unii lobi hepatici și au studiat consecințele acestei obstrucții. După câteva ore de la operație s-a instalat necroza celulelor situate în jurul venulelor terminale hepatice. S-a observat însă, în parenchimul din jurul portei, că unele celulele hepatice erau suprimate progresiv printr-un proces, care morfologic, era diferit de necroză: celulele respective se transformau în mase citoplasmice mici – de formă rotundă sau ovoidală, care conțineau frecvent una sau mai multe particule de cromatină nucleară condensată. Lizozomii prezenți aici se colorau discret prin anumite tehnici histochimice, fapt ce arăta că ei sunt intacti. În aceeași situație se aflau și ribozomii și mitocondriile. Observațiile l-au determinat pe autor să considere inițial că această condensare celulară ce ducea la formarea maselor amintite ar fi efectul digestiei progresive a componentilor citoplasmatici de către lizozomii intacti, idee neconfirmată însă de investigațiile de microscopie electronică. Aceste observații evidențiau în ficatul de șobolan corpi rotunjiți dispuși în spațiul extracelular, corpi formați din fragmente de citoplasmă condensată înconjurată de membrană, cu organite bine conservate, iar unii dintre ei prezentau mase de cromatină condensată (care aparent erau lipsite de membrană). Fenomenul a fost denumit de Kerr (1965) “*necroză condensată*”, (“*shrinkage necrosis*”), constatând ulterior că ea este un tip de moarte celulară care se produce și în țesuturile normale (nelezate). Acest tip de necroză, pus în evidență în lobii de ficat lipsiți de aportul de sânge, a fost apoi observat de autor și în celulele

bazale de carcinom, precum și în alte forme de tumori maligne netratate, (Kerr și Searle, 1972), fiind confirmată de numeroși alți autori. Era un tip special de moarte celulară care sugera autodistrugerea celulară și nu degenerarea specifică din necroza clasică. Ea are loc spontan în țesuturile adulte normale, în țesuturile endocrin-dependente, în tumorile maligne, poate fi indusă de agenți care determină necroza clasică și în multe cazuri este implicată în reglarea dimensiunilor țesutului, având un rol opus mitozei.

Termenul de *apoptoză* pentru moartea celulară de acest tip a fost sugerat de J. Cormack, profesor la Universitatea din Aberdeen, termen care în greaca veche descrie căderea frunzelor din copaci sau a petalelor de la flori (*apo* = din, de pe; *ptosis* = cădere), termen adoptat și consacrat de Kerr et al. (1972), care au diferențiat modificările morfologice celulare care apar în timpul morții celulare programate (MCP), de cele specifice necrozei celulare. Conform Wikipedia, termenul de *apoptosis* a fost folosit de către Hippocrate din Cos (460-377 î. Hr.) pentru descrierea „căderii oaselor” în procesul descompunerii țesuturilor după moarte. Prin apoptoză se înțelege moartea programată a celulelor, încetarea funcțiilor lor vitale, printr-un mecanism care nu depinde de factorii (favorabili sau nocivi) din mediul extracelular.

Fenomenul a fost observat, se pare, de pe la jumătatea secolului al XIX-lea, dar a fost neglijat. După cum arăta Dănăilă et al. (1999), încă în 1842 (la scurt timp după elaborarea teoriei celulare de organizare a organismelor vii), Vogt avansa ideea că unele celule mor în mod natural în cursul dezvoltării lor. În 1864, Weismann descria moartea celulară pe parcursul dezvoltării la *Dipterae*, iar în 1872 Stieda se apropia de înțelesul actual al noțiunii de apoptoză prin observațiile lui privitoare la moartea condrocitelor în timpul osificării. În 1879 se efectuau primele observații microscopice asupra morții celulare, fiind introduși și unii termeni de profil: *cariorexie* – care însemna dezintegrarea nucleului și *carioliză* – care descria dispariția lui (Van Cruchten și Van Den Broek, 2002). Mecinikov constata în 1883 că în mușchii mormolocilor de broască fagocitoza era asociată cu moartea celulară, iar în 1889, Berd observa că pe parcursul dezvoltării embrionului de pește o serie de neuroni sunt supuși morții celulare. În 1885, Flemming descria un fenomen de regresie normală a foliculilor ovarieni pe care l-a denumit *cromatoliză*, considerat de Gräpper (1914) un mecanism de contrabalansare a mitozei, (Kerr, 1999). În 1890, Arnheim a introdus termenii *picnoză* și *marginăția cromatinei* (Van Cruchten și Van Den Broek, 2002). Într-o serie de lucrări apărute între cele două războaie mondiale se sugera posibilitatea existenței morții celulare normale în timpul dezvoltării embrionare, dar nu se intuia încă rolul acestui fenomen și faptul că el este implicat în numeroase procese biologice normale, dar și într-o serie de boli, inclusiv în cancer. Mai târziu, Gluecksmann (1951) avansa ideea că, pe parcursul dezvoltării nevertebratelor și vertebratelor, apare fenomenul de moarte celulară normală. Într-o lucrare publicată în 1964, Lockshin și Williams folosesc termenul de moarte celulară programată pentru a defini fenomenul de moarte celulară care apare în zone și în momente precise pe parcursul dezvoltării fluturelui de mătase. Doi ani mai târziu, Tata (1966) arăta că moartea celulară normală putea fi contracarată prin intervenția cu inhibitori ai sintezei ARN și a proteinelor, iar Saunders (1966) evidențiază un fapt deosebit de important și anume că această moarte celulară normală putea fi prevenită de substanțele produse de alte celule și țesuturi, că deci ea putea fi influențată prin semnale provenite de la alte celule, (Dănăilă et al., 1999).

Apoptoza a fost în cele din urmă recunoscută și acceptată ca modalitate distinctă și importantă de moarte celulară programată la animale după publicarea rezultatelor obținute de Horvitz (1999) în studiile sale de acest gen întreprinse la nematodul *Caenorhabditis elegans*.

Neglijarea mult timp a apoptozei s-a datorat faptului că ea “*este un fenomen criptic, iar dimensiunile mici ale multor corpi apoptotici, viteza cu care ei sunt dispuși în celulele adiacente și absența unor exudate inflamatorii au contribuit la ignorarea procesului în țesuturile adulte normale, unde rata de producere a lui este redusă*”, (Kerr, 1999).

În timp ce *necroza celulară* este o formă patologică de moarte celulară, datorată unor leziuni mecanice, hipoxiei, acțiunii unor agenți fizici dăunători sau unor toxine etc, care determină distrugerea integrității membranei plasmatică, pierderea conținutului celular și apariția unui proces inflamator, iar eliminarea celulelor afectate se realizează prin fagocitoza sistemului mononuclear, în *apoptoză* celulele își păstrează integritatea membranei plasmatică, celulele se zbârcesc, nucleul celulei se condensează, conținutul lor se separă în fragmente delimitate de membrane (*corpi apoptotici*), care sunt fagocitate de macrofage, iar eliminarea lor nu este însoțită de un proces inflamator. Apoptoza este un proces fiziologic normal, care se produce cu consum de energie, după un program genetic bine definit, înscris în genomul celulei, nedestructiv, care se finalizează cu moartea celulei, prin care un organism pluricelular elimină unele celule nedorite, realizându-și astfel homeostazia celulară. Potrivit definiției propuse de Willie et al., (1980), „*apoptoza este un proces fiziologic strict reglat, caracterizat parțial de condensarea nucleară și micșorarea volumului celular, cu păstrarea intactă a membranei plasmatică, culminând cu distrugerea cromatinei nucleare și digestia ADN-ului genomic, ca eveniment ireversibil*”, (Dănăilă et al., 1999).

Deși unii specialiști fac distincție între moartea celulară programată (prin care înțeleg moartea celulară fiziologică normală, înscrisă în programul genetic) și apoptoză (prin care înțeleg moartea fiziologică asociată cu fenomenele de condensare a citoplasmei, fragmentarea ADN-ului și formarea corpurilor apoptotici), în prezent se consideră că ambele denumiri desemnează unul și același fenomen, admițându-se sintagma „*moarte celulară programată prin apoptoză*”. Termenul de moarte celulară programată (MCP) a fost folosit înaintea celui de apoptoză, fiind propus de către Lokshin și Williams (în 1964) în observațiile acestor autori asupra dezvoltării țesuturilor la insecte. Investigațiile în domeniul apoptozei s-au bucurat în ultimele decenii de un interes cu totul deosebit și de eforturi de cercetare însemnate, rezultatele unor specialiști în acest domeniu fiind onorate în anul 2002 cu Premiul Nobel pentru Fiziologie și Medicină, acordat cercetătorilor Sydney Brenner (Marea Britanie), Robert Horvitz (SUA) și John Sulston (Marea Britanie).

Se pare totuși că apoptoza prezintă mai multe fațete, variante, în sensul că în unele cazuri pot fi întâlnite modificările nucleare tipice apoptozei (apoptoză „*nucleară*”), în timp ce în altele apar doar modificări în citoplasmă (condensarea ei, umflarea mitocondriilor și ruperea ribozomilor), lipsind fenomenele de fragmentare a ADN-ului și formarea de vezicule de cromatină dispuse în partea internă a membranei nucleare (apoptoză „*citoplasmatică*”). Având în vedere multitudinea de manifestări ale acestui fenomen, unii autori preferă termenul generic de moarte celulară programată

(MCP), cel de apoptoză fiind folosit, cum notam anterior, doar atunci când apar modificări morfologice celulare. Acest tip de moarte celulară (MC) trebuie delimitat totodată de „moartea celulară prin mitoză” (*mitotic cell death*), realizată de către agenții mutageni cu acțiune antimitotică (cum ar fi radiațiile ionizante, unii agenți alkylanți etc), în care moartea celulară se produce ca urmare a incapacității celulelor de a se divide (datorită blocării mitozei), (Dănăilă et al., 1999).

Între timp au apărut și alte puncte de vedere în acest concept de moarte celulară, după cum urmează:

1) *apoptoza* a fost definită ca fiind moartea celulară mediată de caspaze - având trăsăturile morfologice descrise anterior;

2) *necroza* reprezintă moartea celulară accidentală, necontrolată, haotică;

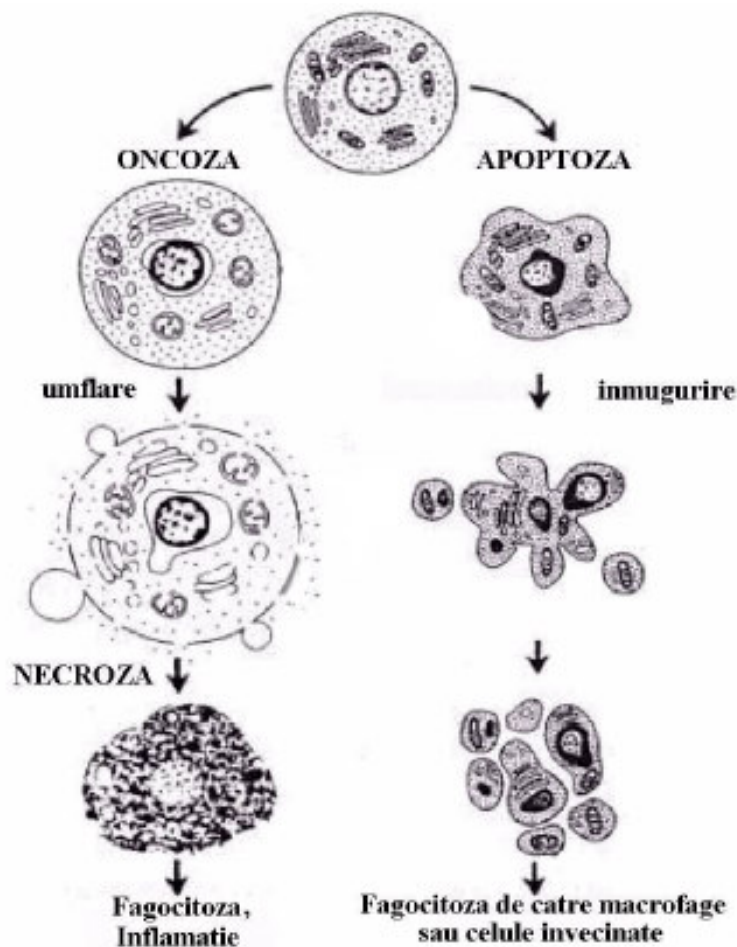


Fig. 1.1. - Ilustrarea oncozei, necrozei și apoptozei (după Majno și Joris, 1995; modificată).

3) *oncoza* (de la „onkos” – umflare) este considerată o stare pre-lethală ce duce la moartea celulară datorită depleției rezervelor energetice celulare și perturbării pompelor ionice din membrana plasmatică și se caracterizează prin umflarea celulei, umflarea organitelor celulare, creșterea permeabilității membranei. Este provocată de ischemie și posibil de agenți toxici care interferează cu generarea de ATP sau determină creșterea permeabilității membranei plasmatică. De regulă, este însoțită de

carioliză, iar distrugerea ADN are loc într-o manieră nespecifică, (Majno și Joris, 1995; Fink și Gookson, 2005). Se pare că celulele ce intră în oncoză sunt supuse necrozei, având ca element esențial natura inflamatorie, (fig. 1.1.).

4) *piroptoza* – este considerată o formă de moarte celulară determinată de infecția cu specii de *Salmonella* și *Shigella*, este inflamatorie și ar fi dependentă doar de caspaza-1 (caspază care nu este implicată în moartea celulară apoptotică). Activarea caspazei-1 în macrofagele infectate cu cele două specii de bacterii determină procesarea citokinelor IL-1 β și IL-18 și moartea celulei gazdă. Se consideră că piroptoza (de la *pyro*=foc, febră; *ptosis*=cădere) ar juca un rol important în MC din sistemele imun, cardiovascular și nervos, unde a fost observată activarea caspazei-1, (Fink și Gookson, 2005).

Într-o lucrare de sinteză dedicată apoptozei, Elmore (2007) arăta că au fost descrise și alte forme de MC. Una din ele, denumită de Formigli et al., (2000) *aponecroză*, prezintă unele trăsături morfologice specifice atât necrozei cât și apoptozei. O formă distinctă de MCP, denumită de Sperandio et al. (2000) *paraptoză*, nu răspunde la inhibitorii de caspază sau la Bcl-X_L și ar fi coordonată de o formă alternativă de activitate caspază-9, independentă de Apaf-1.

Mai nou, sistemele de moarte celulară (MC) la animale au fost clasificate în 3 categorii (tipuri): *apoptoza* (MC de Tipul I), *autofagia* (MC de Tipul II) și *necroza* (MC de Tipul III), (Lockshin și Zakeri, 2004). După alții, tipul III de MC ar fi moartea celulară nelizozomală, (Iakimova et al., 2005). În tabelul 1.1 sunt prezentate tipurile de moarte celulară așa cum au fost definite de Clarke, (1990).

Tabel nr. 1.1 – Tipuri de moarte celulară (după Clarke, citat de Van Cruchten și Van Den Broek, 2002)

Tipul de moarte celulară (MC)	Starea nucleului	Starea membranei celulare	Starea citoplasmei	Eliminarea heterofagă
Tipul 1 Apoptoză	Condensarea nucleului, îngrămădirea cromatinei care conduce la picnoză	Cutată, formează umflături	Pierderea ribozomilor de pe RER și polisomi; citoplasmă redusă ca volum și care devine electron-densă	Proeminentă și importantă
Tipul 2 MC autofagică	Picnoză în unele cazuri; segmente nucleare se pot umfla sau segrega	Endocitoză, posibil umflare	Vacuole autofagice abundente; RE și mitocondriile uneori dilatate; aparatul Golgi adesea mărit	Ocazională și târzie
Tipul 3A MC ne-lisosomală	Vacuolizare târzie urmată de dezintegrare	Rupturi	Dezintegrare generală; dilatarea organitelor, care formează spații goale ce fuzionează unul cu altul și cu spațiul extracelular	Absentă
Tipul 3B MC citoplasmatică	Creșterea târzie a granularității cromatinei	Umflarea celulei	Vacuolizare provocată de dilatarea RE, a membranei nucleare, aparatului Golgi și uneori a mitocondriilor	Prezentă

În apoptoză, celulele supuse MCP se transformă în corpi apoptotici, care vor fi înghițiți și digerați de către macrofage. *Autofagia* reprezintă un proces catabolic major la eucariote, în care porțiuni de citoplasmă și organite celulare sunt sechestrate în vezicule cu membrană dublă și sunt livrate lizozomilor (la animale) și vacuolei (la plante și fungi), unde vor fi digerate de enzimele hidrolitice (www.slu.se/Bozhkov; Elmore, 2007). Bozhkov consideră că autofagia, în funcție de magnitudinea ei poate fie să salveze, fie săucidă celula. În condiții de stres sau înfometare, autofagia poate asigura supraviețuirea celulară prin eliminarea organitelor sau proteinelor lezate, aprovizionând celula cu produșii de degradare rezultați în procurarea energiei sau pentru procesele de sinteză. Dacă autofagia depășește un anumit prag și, prin acțiunea ei elimină porțiuni mari de citosol și organite, în final celulele afectate mor, ea fiind în acest caz un executor al MCP. Termenul de autofagie („self-eating”) derivă din latină și are înțelesul de auto-distrugere, autoliză, proces în care componenții citoplasmatici sunt degradați de către mașinăria lisosomală a celulei (Reape et al., 2007). Acest mecanism al MCP este bine reprezentat pe parcursul dezvoltării embrionare a vertebratelor și constă în vacuolizarea celulei, degradarea citoplasmei, o ușoară condensare a cromatinei. Autofagia se caracterizează prin formarea vacuolelor autofagice, dilatarea mitocondriilor și a reticulului endoplasmatic, o ușoară lărgire a aparatului Golgi (Bras et al., 2005). Autofagia începe cu sechestrarea de material citoplasmatic în vezicule cu membrană dublă – *autofagosomi*, proces care se produce sub controlul GTP-azelor și a fosfatidil-inositol-kinazelor. Autofagosomii fuzionează apoi cu lizozomii. *In vivo*, celulele supuse autofagiei pot fi fagocitate de celulele învecinate, (Fink și Gookson, 2005). Procesul de autofagie a fost împărțit în etape (trepte): 1) inducția; 2) formarea autofagosomului; 3) fuziunea cu lisosomul sau vacuola; 4) degradarea corpului autofagic și reciclarea produșilor (Elmore, 2007). Al treilea tip morfologic de MCP ar fi reprezentat de MCP nelizosomală, sau MCP asemănătoare necrozei (*necrosis-like PCD*) și implică umflarea organitelor și formarea în citoplasmă de „spații goale” lizozom-independente, având asemănări cu necroza, (Iakimova et al., 2005).

Moartea celulară programată (MCP) apare ca fiind un proces activ, programat, dependent de semnale celulare codificate genetic și de activități specifice în celulele care mor. Necroza, este privită ca un proces opus MCP, deoarece reprezintă o prăbușire a celulei datorită acțiunii directe a unor stimuli externi (care poate fi prevenită doar de absența acestora), proces care nu reclamă activitate celulară (coordonată). Unii consideră că formele sub care se poate manifesta moartea celulară programată (MCP) sunt apoptoza, autofagia și piroptoza. Se constată însă că în ce privește cel de al III-lea tip de MCP opiniile specialiștilor sunt împărțite. Cert este faptul că majoritatea autorilor fac distincție între MCP prin apoptoză și alte tipuri de MCP (prin autofagie, asemănătoare-apoptozei, sau asemănătoare-necrozei etc).

2. Necroza și apoptoza – două forme diferite ale morții celulare

La animale, există două tipuri majore de moarte celulară: *apoptoza*, proces înalt reglat, programat, dependent de energie și *necroza*, care rezultă în urma unor leziuni. Apoptoza sau moartea celulară programată (MCP) la animale, așa cum a descris-o Kerr et al (1972) se caracterizează prin rotunjirea și micșorarea celulei, condensarea cromatinei (picnoza), fragmentarea nucleului (cariorexie), formarea de vezicule

(blebbing) la suprafața externă a membranei celulare, clivajul internucleosomal al ADN-ului în fragmente caracteristice de 180 pb și formarea de corpi apoptotici. Membrana plasmatică în celulele mamiferelor rămâne intactă până în stadiile târzii ale apoptozei, fapt ce previne instalarea unui răspuns inflamator, (Vercammen et al., 2007). *Necroza* se caracterizează prin umflarea celulelor (oncoză), dilatarea organelor, care determină ruperea membranei plasmatică și a endo-membranelor, având drept consecință eliberarea rapidă a enzimelor hidrolitice. De altfel, una din diferențele esențiale între apoptoză și necroză este aceea că în apoptoză membrana celulară își păstrează integritatea până la formarea și fagocitarea corpurilor apoptotici.

MCP la animale este un proces fiziologic prin care are loc eliminarea unor celule nedorite. Iată câteva exemple de acest gen, asupra cărora vom reveni în capitolele ce urmează:

- dispariția unor celule care au avut funcții temporare (cum e cazul resorbției celulelor cozii mormolocului de broască în cursul metamorfozei);
- celule care au fost produse în exces, cum sunt neuronii la vertebrate;
- celule prezente în poziții neadecvate, cum sunt cele ale țesuturilor interdigitale, a căror dispariție asigură formarea degetelor la mamifere;
- eliminarea celulelor musculare în metamorfoza insectelor;
- moartea a 131 de celule din cele 1090 de celule somatice inițiale, pe parcursul dezvoltării nematodului *Caenorhabditis elegans*;
- moartea unor celule pe parcursul procesului de specializare celulară, cum este cazul keratinocitelor de la suprafața pielii etc.

Perturbarea procesului de moarte celulară programată a anumitor tipuri celulare poate determina stări de boală, cum ar fi: moartea celulelor T helper în cazul SIDA, sau moartea în exces a neuronilor cerebrali care poate duce la boli neuro-degenerative ca: maladia Alzheimer, boala Huntington, boala Parkinson, boala Lou Gehrig, (Pennell și Lamb, 1997).

Deși apoptoza și necroza se soldează în final cu moartea unor celule, între cele două procese sunt diferențe notabile în privința manifestării lor, a mecanismelor și consecințelor asupra celulelor și organismelor, unele deja prezentate în capitolul anterior. În timp ce apoptoza este, cum spuneam, o formă normală de moarte celulară, necroza este o formă patologică de moarte celulară.

Cum s-a arătat deja, *necroza* poate fi provocată de o multitudine de factori de natură fizică, chimică și biologică (radiațiile, hipo- sau hipertermia, hipoxia, toxinele și alți agenți chimici, infecțiile virotice sau cu alți agenți patogeni etc), fiind însoțită de un proces inflamator. Până la un anumit nivel modificările induse de necroză în celule sunt reversibile: desfacerea proteinelor care formează citoscheletul, alterarea integrității și permeabilității membranelor, perturbarea activității pompei ionice din membrane etc, după care ele devin ireversibile. Modificările morfologice provocate de necroză sunt precedate de reducerea nivelului de ATP, ceea ce privează celula de suportul energetic pentru refacerea schimbărilor induse. În timp ce în apoptoză cantitatea de calciu ionic în citosol crește, în necroză are loc reducerea gradientului de calciu datorită perturbării pompei de calciu, dar și pierderii integrității membranelor. În citosol sunt activate fosfolipazele și proteazele, sinteza proteinelor se reduce, iar ulterior încetează. Cantitatea de apă în celulă crește, având loc și redistribuirea apei în interiorul ei. Schimbarea gradientilor cationici determină lărgirea reticulului

endoplasmatic, celula își modifică forma și dimensiunile, iar cromatina nucleară ia aspect floculos. În necroză nucleul celulei nu se fragmentează în porțiuni delimitate de membrană ca în apoptoză, cromatina are tendința de condensare, dar nu se redistribuie, iar aglomerările de cromatină sunt neregulate și slab conturate. Într-o fază ulterioară, schimbările declanșate de necroză devin ireversibile. Lezarea structurii și funcțiilor membranei plasmatică și a membranelor endoplasmatică se accentuează, mitocondriile se hidratează puternic și se dilată, iar în interiorul lor apar granule dense (bogate în lipide), cromatina se dispersează sub forma unor particule libere – iar la sfârșitul necrozei cromatina dispare (se degradează odată cu organitele celulare, degradarea ADN-ului nuclear și a histonelor producându-se la întâmplare), are loc distrugerea progresivă și digestia enzimatică a organitelor celulare, citoplasma se vacuolizează, celulele devin eozinofile, lizozomii se umflă și în final eliberează enzimele litice, celulele se umflă și ele și în cele din urmă se dezintegrează. Mecanismele prin care se produc modificările ireversibile celulare specifice necrozei ar fi: reducerea nivelului ATP sub cel critic, apariția radicalilor toxici ai oxigenului, eliberarea enzimelor litice în celulă, activarea fosfolipazelor dependente de calciu legate de membranele interne. Modificările celulare provocate de necroză au un nivel ridicat de autonomie, nu sunt coordonate și programate genetic precum sunt cele din apoptoză, ci sunt mai mult procese de natură reactivă față de acțiunea nocivă a unor factori fizici și chimici diverși, (Dănăilă et al., 1999; Moldoveanu și Popescu, 1999; Krishnamurthy et al., 2000; Ricci, 2002; Elmore, 2007).

Tabel nr. 2.1 – Comportarea unor parametri celulari și tisulari în cazul necrozei și apoptozei (Hettis, citat după Dănăilă et al., 1999)

Parametri analizați	Necroză	Apoptoză
Factori inductori	Toxine, hipoxie, lezări masive, depleția ATP	Condiții fiziologice sau patologice; depleția ATP nealterată
Energia necesară	Se desfășoară fără consum de energie	ATP- dependentă
Aspecte histologice	Balonizarea celulară, distrugerea organitelor, moartea mai multor celule	Condensarea celulei, a cromatinei, formarea corpurilor apoptotici, moartea unei singure celule
Modul de degradare a cromatinei (ADN-ului)	Întâmplător, rezultând fragmente de diverse dimensiuni	Clivarea internucleosomală a cromatinei în fragmente de 180 pb sau multipli de 180 pb
Starea membranelor plasmatică	Lizate	Intacte (cu suprafața crenelată sau veziculată, zbârcite)
Fagocitoza celulelor moarte	Fagocite care migrează în zona de necroză	Fagocite și celule învecinate
Reacția tisulară	Inflamație	Reacție inflamatorie absentă

Spre deosebire de apoptoză, unde celula „se pregătește” pentru eliminarea ei prin fagocitoză, în necroză acest fenomen nu are loc, ci dimpotrivă, datorită lezării sistemului de membrane celulare, sunt eliberate în celulă enzimele de degradare, care duc în cele din urmă la dezintegrarea ei, fenomenul fiind însoțit de un proces inflamator. Față de apoptoză, necroza este un proces ne-fiziologic, care nu este asociat în mod normal cu dezvoltarea, nu apare în urma unui semnal de transducție controlat genetic, nu necesită activitatea proteazelor și nucleazelor pentru o degradare controlată

a celulei, nu reclamă Ca^{2+} sau schimbări în fosforilarea proteinelor, (Pennell și Lamb, 1997).

Tabel nr. 2.2. – Modificări induse de necroză și apoptoză la nivel celular (prelucrare după Dănăilă et al., 1999; Ricci, 2002)

Parametri analizați	Necroză	Apoptoză
Trăsături morfologice		
Apariție. Începutul procesului	Afectează grupuri mari de celule; alterare tisulară masivă. Creșterea volumului celular (umflarea citoplasmei și a mitocondriilor)	Afectează o singură celulă. Reducerea volumului celular (condensarea citoplasmei și a nucleului)
Membranele nucleare și plasmatică	Distrușe în fazele timpurii	Persistă integral până în ultimele stadii; suprafața zbârcită (crenelată), cu circumvoluțiuni
Cromatina	Mase mici de cromatină slab delimitate, dispersate întâmplător, ulterior lizate	Cromatina se condensează în mase adiacente membranei nucleare și ulterior se fragmentează
Organitele celulare	Umflarea și dezintegrarea lor în fazele timpurii	Mitocondriile capătă pori prin implicarea proteinelor din familia Bcl-2
Vezicule	Nu se formează vezicule, se produce liza completă	Se formează vezicule mărginite de membrană (corpi apoptotici)
Faza terminală	Are loc liza celulară totală	Celula se fragmentează în corpi mai mici
Trăsături biochimice		
Reglare	Se pierde reglarea homeostaziei ionilor	Proces strict reglat, care implică activare și parcurge trepte enzimatică
Input energetic	Procesul nu reclamă energie (se produce pasiv și are loc și la 4 ⁰ C)	Proces activ, dependent de energia ATP (nu se produce la 4 ⁰ C)
ADN	Fragmentare și degradare întâmplătoare (inclusiv a histonelor)	Fragmentare internucleozomală nerandomizată Activarea endonucleazelor
Timing	Fragmentare ADN postlitică (eveniment tardiv în moartea celulară)	Fragmentare ADN prelitică
Evenimente biochimice		- Eliberarea de factori diverși (cit. c, AIF) în citoplasmă de către mitocondrii; - Activarea cascadei de caspaze; - Alterări ale asimetriei membranei (translocarea fosfatidil-serinei din citoplasmă spre partea externă a membranei)
Impact fiziologic		
Proporții	Afectează grupuri de celule învecinate	Efecte localizate care distrug celule individuale
Inducție	Determinată de factori nefiziologici (atacul complementului, virusuri litice, hipotermie, hipoxie, ischemie, toxine metabolice)	Indusă de stimuli fiziologici (lipsa factorilor de creștere, schimbări în mediul hormonal)
Fagocitoza	Fagocitoză realizată de macrofage	Fagocitoză realizată de către celule adiacente sau de macrofage
Sistemul imun	Răspuns inflamator semnificativ	Răspuns inflamator absent

În cazul necrozei, fragmentele rezultate în urma dezintegrării aleatorii a celulei moarte sunt fagocitate de macrofage întocmai ca particulele străine pătrunse în organism, de unde și apariția reacției inflamatorii (Dănăilă et al., 1999). Unele din trăsăturile morfo-fiziologice și biochimice celulare care însoțesc necroza și apoptoza sunt sintetizate în tabelele 2.1 și 2.2.

Spre deosebire de necroză, apoptoza este un proces activ, afectează celule izolate, decurge rapid după inițiere, se desfășoară cu consum de energie, după un program genetic prestabilit, în care membranele plasmactice rămân intacte, chiar dacă ele se cutează (zbârcesc) și capătă aspect vezicular. Citoplasma și nucleul celulei se condensează, volumul celular scade aproape la jumătate (datorită, se pare, pierderii de apă și de ioni), celulele capătă formă alungită sau neregulată, dar organele citoplasmice nu prezintă modificări specifice (se mențin aparent normale). Condensarea și rotunjirea celulei se datorează distrugerii citoscheletului proteic de către *caspaze*. În faza incipientă a apoptozei concentrația calciului ionizat din citosol ar crește, fapt ce activează trans-glutaminazele, enzime care contribuie la reducerea volumului celular (ele leagă încrucișat proteine citoplasmice prin formarea de legături transversale de tipul ϵ -lizil- γ -glutamil). Menținerea integrității membranelor celulare permite desfășurarea activității enzimatice, evită pierderea de proteine, contribuie la păstrarea echilibrului osmotic celular și la realizarea proceselor biochimice „specifice” apoptozei, (Dănăilă et al., 1999; Moldoveanu și Popescu, 1999; Ricci, 2002; Fink și Gookson, 2005; Elmore, 2007).

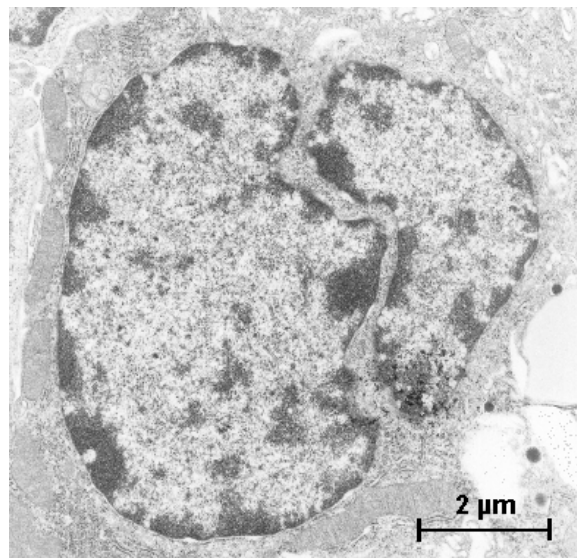


Fig. 2.1 - Celulă secretoare din glanda mamară în ziua a 3-a de involuție, aflată în stadiul timpuriu de apoptoză (după Vallan et al., 1998); se observă condensarea cromatinei la marginea membranei nucleare interne)

Un efect vizibil în apoptoză, încă de la declanșarea ei, este condensarea treptată a cromatinei nucleare, cu formarea de mase compacte, de formă emisferică sau concavă, care se dispun la periferia nucleului (aderă la suprafața internă a membranei nucleare - *picnoză*), iar membrana nucleară devine discontinuă (fig. 2.1). Față de condensarea normală a cromatinei specifică mitozei, în apoptoză se produce o condensare rapidă a cromatinei, urmată de intervenția imediată a endonucleazelor, care

o degradează în fragmente specifice de ADN de cca 180-200 pb (la nivelul zonelor internucleosomale, proces considerat a fi un marker important al apoptozei), fenomen denumit *cariorrexie* (*karyorrhexis*).

S-a stabilit de altfel că primele modificări morfologice ale celulelor apoptotice coincid cu fragmentarea genomului în zona de unire a doi nucleosomi învecinați (Moldoveanu și Popescu, 1999), ceea ce sugerează că moartea celulară s-ar datora clivării ADN-ului. Și nucleolul suferă modificări, formând mase granulare, rotunde sau ovale, osmiofile, care se dispun în centrul acestuia, mase care se pot dezintegra în fragmente mai mici, mai slab osmiofile (mai bogate se pare în proteine). La microscopul optic, o celulă intrată în apoptoză este mai mică, ratatinată (zbârcită), mai densă, nucleul este picnotic și prezintă mase dense de cromatină, eozinofile. Se pare că pierderea apei, a electroliților și blocarea sistemului de transport al ionilor (Na^+ , Cl^- , K^+) contribuie la ratatinarea celulelor, proces ușor de observat în culturile celulare prin pierderea contactului celulei apoptotice cu celulele învecinate (a desmozomilor) și a structurilor specializate de la suprafața ei (a pseudopodelor, microvililor etc). Spre sfârșitul apoptozei, nucleul celulei se dezintegrează în fragmente mai mici de cromatină condensată, fragmente învăluite de o membrană dublă.

Un rol important în integrarea și propagarea semnalelor morții determinate de leziunile ADN, stresul oxidativ, chimioterapice etc îl joacă mitocondriile. Factorii amintiți pot duce la perturbarea potențialului transmembranar intern al mitocondriei (*Dy*) și așa-numitei permeabilități de tranziție (*PT*). S-a observat în același timp o umflare a mitocondriilor, datorită influxului apei în matrix, care poate duce la ruperea membranei externe a mitocondriei și la eliberarea proteinelor pro-apoptotice din spațiul inter-membranar în citoplasmă. Printre proteinele cu acest rol se numără *citocromul c* - care activează *apoptozomul*, dar și alți factori cum ar fi factorul de inducere a apoptozei (*AIF*), endonucleaza *endoG*, proteina *Smac/Diablo* etc, (GEWIES, 2003). Perturbările produse *Dy* și *PT* determină pierderea homeostaziei biochimice a celulei: sinteza ATP este sistată, moleculele redox (NADH , NADPH și glutationul) sunt oxidate, speciile reactive ale oxigenului (*ROS*) cresc cantitativ (provocând oxidarea lipidelor, proteinelor și acizilor nucleici).

Membrana plasmatică formează invaginări spre interiorul celulei care duc la generarea de vezicule interne ce conțin porțiuni de citoplasmă cu organite celulare intacte și fragmente nucleare, structurile formate fiind denumite *corpi apoptotici*. Unele modificări morfologice celulare care se produc în necroză și apoptoză sunt ilustrate în figura 2.2.

Unii autori consideră că înaintea formării corpurilor apoptotici, membrana nucleară se dezintegrează, iar fragmentele rezultate s-ar dispersa în citoplasmă, unde împreună cu porțiuni din citoplasmă și organite celulare intacte ar genera acești corpi, alții apreciază că integritatea membranei nucleare se păstrează și că părți din ea însoțesc fragmentele nucleare în momentul constituirii corpurilor apoptotici. De îndată ce se formează veziculele, se produc și modificări morfologice și biochimice specifice ale membranelor, care permit recunoașterea celulelor apoptotice de către macrofage sau alte celule învecinate. Corpuri apoptotici se desprind din celula moartă printr-un proces de „înmușurire”. Structura, mărimea și numărul corpurilor apoptotici depind de dimensiunile celulelor și ale nucleilor.

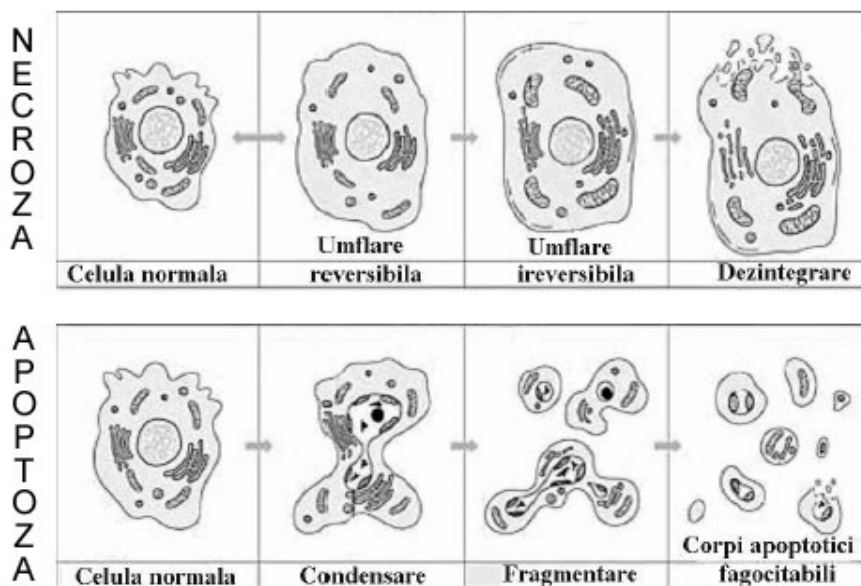


Fig. 2.2. – Schemă care relevă unele modificări morfologice celulare care apar în necroză și apoptoză

Corpii apoptotici rezultați ajung în spațiul dintre celule, unde sunt recunoscuți și rapid fagocitați de către macrofage sau de către alte celule din vecinătate (celule de natură epitelială sau fibroblastică), fiind degradați de către enzimele lizozomale, fără ca procesul să fie însoțit de o reacție inflamatorie, (Dănăilă et. al., 1999; Păunescu, 2006). Lipsa reacției inflamatorii s-ar datora faptului că: - celulele apoptotice nu eliberează conținutul și constituenții lor în țesutul din jur; - fagocitoza lor are loc rapid de către celulele învecinate și astfel este prevenită necroza secundară; - celulele apoptotice înghițite (ingerate) nu produc citokine inflamatoare (Elmore, 2007).

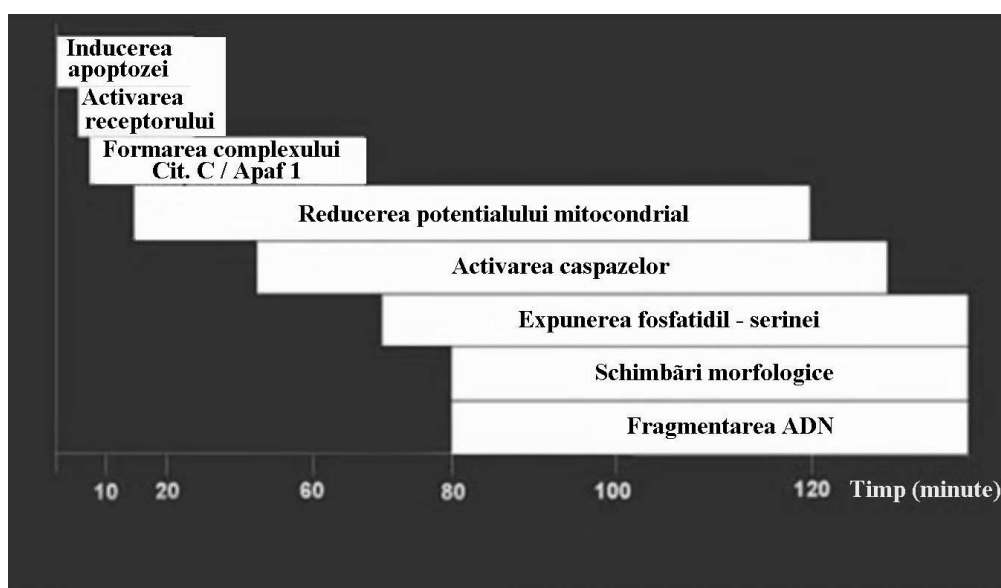


Fig. 2.3 - Cronologia fenomenelor apoptotice în celule HeLa (inducția pe calea TNF α a apoptozei cu actinomycină D; internet)

Fenomenul de înlăturare a celulelor moarte de către celulele fagocitare din vecinătate este denumit *eferocitoză* (*efferoctosis*). Timpul scurs între declanșarea procesului de apoptoză și formarea corpurilor apoptotici este scurt, de ordinul minutelor sau zecilor de minute), iar digestia corpurilor apoptotici durează în medie câteva ore (fig. 2.3).

Deoarece moartea celulară prin apoptoză decurge rapid și nu este însoțită de fenomene inflamatorii, apoptoza a fost mult timp neglijată, așa cum am arătat și în capitolul anterior.

Celulele intrate în apoptoză au pe suprafața lor markeri moleculari, liganzi pentru receptorii macrofagelor, care asigură recunoașterea și captarea lor. Între aceștia se numără *fosfatidil-serina* pentru receptorii fosfatidil-serinei, *trombospondina* pentru receptorii trombospondinei, lanțuri glucidice pentru *lectine*, sau (ca mecanism alternativ) proteine din clasa *integrinelor* în cazul receptorilor pentru *vitronectină*, (Moldoveanu și Popescu, 1999).

Apoptoza este, cum am arătat deja, un proces relativ punctiform, care implică o celulă sau un număr mic de celule. Ea poate cuprinde un număr mare de celule pe parcursul dezvoltării embrionare a unor organisme și un număr mai mic de celule în cazul organelor deja constituite.

Citând o serie de autori, Elmore (2007) arată că moartea unei celule prin necroză sau apoptoză ar depinde de natura semnalului MC, de tipul de țesut și stadiul lui de dezvoltare, de mediul fiziologic, cele două procese putând avea loc simultan, funcție de intensitatea și durata stimulului, de mărimea depleției ATP și de disponibilitatea caspazelor.

3. Modificări biochimice prezente în apoptoză

Evenimentele biochimice produse în apoptoză sunt complexe, se petrec după un anume program și au loc în cascadă. Dintre acestea, degradarea nucleului și a organelor celulare, produsă de enzime specifice, reprezintă în fapt procesul biochimic cel mai important.

Unul din componenții normali ai membranei plasmatică este *fosfatidil-serina* (*PS*), proteină localizată pe suprafața internă a acesteia (spre citoplasmă). În anumite condiții, are loc translocarea acestei proteine de pe fața internă, pe cea externă a membranei. Este un fenomen întâlnit frecvent în procesul de transformare malignă a celulelor, care a fost semnalat și în apoptoză (la începutul ei). S-au evidențiat și situații în care apoptoza s-a produs fără translocarea PS de fața internă pe cea externă a membranei. Translocarea acestei proteine precede fragmentarea nucleară și degradarea organelor celulare. De altfel, inhibitorii apoptozei și a enzimelor care au rol esențial în acest proces (*caspazele*), inhibă și translocarea PS pe fața externă a membranei plasmatică. Deși această translocare a fost semnalată și în alte procese fiziologice și patologice, ea este considerată ca un fenomen specific în apoptoză, care face ca celula în cauză să fie mai ușor recunoscută și apoi fagocitată de către macrofage, (Dănăilă et al., 1999).

Un eveniment biochimic foarte important, ce se petrece după translocarea fosfatidil-serinei este, cum arătam, fragmentarea ADN-ului nuclear, care face ca moartea celulară prin apoptoză să devină inevitabilă. Fragmentarea nucleului este precedată, așa cum am precizat în capitolul anterior, de condensarea și marginalizarea cromatinei. Inițial se formează fragmente ale fibrei de cromatină de dimensiuni mai

mari, de 300 kbp și 500 kbp și ulterior fragmente de 180 pb sau multipli ai acestui număr. Fragmentarea fibrei de cromatină și ADN-ului la locurile de legătură dintre nucleosomi se face prin intervenția unor endonucleaze ca NUC1, DN-aza I și DN-aza II prezente în nucleu, enzime activate de Ca^{2+} și Mg^{2+} , dar inhibitate de Zn^{2+} , sau de unele nucleaze activate de caspaze, cum ar fi CAD (*caspase activated DN-ase*) sau factorul de fragmentare a ADN de 40 kDa (DFF40), (Jan et al., 2008). Fragmentele ADN pot fi determinate prin metoda TUNEL a grupărilor 3'-OH. Dacă în apoptoză clivarea fibrei de cromatină are loc în fragmente cu un anumit număr de perechi de baze și duce la păstrarea organizării ei nucleosomale, în necroză această clivare este – cum am arătat deja, întâmplătoare și determină și degradarea histonelor. Se consideră totodată că în cursul apoptozei are loc transferul activ din citoplasmă în nucleu a unor proteaze, care determină degradarea unora din proteinele nucleare. În cazul când apoptoza este indusă prin medierea receptorului *Fas*, în prima fază procesele specifice acestui fenomen se petrec în citoplasmă, de unde se transmite semnalul tanatogen spre nucleu, iar într-o fază ulterioară se produce un semnal tanatogen invers – din nucleu spre citoplasmă (prin molecule semnal). Acest transport nuclear activ ce însoțește apoptoza se face cu consum de energie.

S-a observat că în timpul apoptozei devin active unele enzime ca *adenozin-monofosfat-kinaza*, crește cantitatea unor enzime ca: *trans-glutaminaza*, *ribonucleaza*, *gamma-glutamyl-transpeptidaza*, *cathepsina* etc. Implicațiile acestor modificări enzimatică în procesul de apoptoză sunt încă insuficient cunoscute. Ceea ce se știe totuși, este faptul că *trans-glutaminaza* ar avea un rol important la cutarea (încrețirea) membranei plasmatică și menținerea integrității ei, la împiedicarea dispersiei constituenților celulari în spațiul extracelular, la formarea corpilor apoptotici și recunoașterea lor de către fagocite.

Un rol deosebit în apoptoză par să aibă și unele *protein-kinaze*. Tirozin-kinaza, de exemplu, s-ar asocia cu unele proteaze și ar contribui la inducerea semnalului apoptotic. O altă kinază – *PKA (serin-treonin-kinaza)*, enzimă a cărei activitate este reglată de GTP-ază (guanozin-trifosfatază), este de asemenea implicată în apoptoză, fiind responsabilă de modificările ce se produc la nivelul citoscheletului. *Protein-kinaza B* (sau *AKT*) are și ea un rol în apoptoză. S-a observat că prezența ei în exces în neuroni a crescut rezistența acestora la apoptoză. Se pare că această kinază manifestă o acțiune anti-apoptotică certă. Se consideră, de altfel, că în desfășurarea apoptozei *protein-kinazele* și procesul de fosforilare a proteinelor efectoare au un rol deosebit, ele asigurând totodată și activarea endonucleazelor. O altă enzimă implicată în apoptoză, al cărei rol este insuficient clarificat, este *poli-(ADP-ribozil)-polimeraza (PARP)*. În multe tipuri de moarte celulară programată s-a semnalat fragmentarea acestei enzime. S-a constatat însă că între fragmentarea PARP și fragmentarea ADN-ului nu există o legătură certă.

Printre alte modificări biochimice în celulele ce urmează calea apoptotică, s-a observat creșterea cantității de *beta-tubulină* citoplasmatică, proteină necesară în procesul de formare a corpilor apoptotici. Având în vedere că apoptoza se produce cu consum de energie, cu siguranță ea presupune și modificări ale metabolismului glucidic celular, care sunt însă puțin studiate și cunoscute.

Și unii produși lipidici au implicații în apoptoză. Fosfolipidele sunt mesageri secunzi care iau parte la reglarea activității enzimelor implicate în apoptoză:

proteinkinaze, fosfataze, proteaze. În supraviețuirea celulei *sfingomielina* are un rol important. Sfingomielinele sunt fosfolipide prezente în membrana plasmatică, iar degradarea lor se face de către *sfingomielinază*. Prin intervenția acestei enzime, semnalul tanatogen din apoptoză determină transformarea sfingomielinei în *ceramide* (*N-acil sfingozine*), mesageri pentru efectorii apoptozei. *Sfingozina* are capacitatea de inhibare a activității proteinkinazei-C, enzimă cheie în reglarea procesului de proliferare și în diferențierea apoptozei. Sfingozina influențează agregarea trombocitelor, inhibă coagularea, are efect anticancerigen și antimicrobian, poate induce apoptoză. Ea ar avea rol dublu: în citosol reglează enzimele ce transmit semnalul apoptozei (fosfokinaze și proteaze), iar în nucleu favorizează degradarea ADN-ului. În figura 3.1. este redată o schemă reprezentând interacțiunile posibile între calea TNF și cea a sfingomielinei.

Sunt păreri conform cărora activarea căii sfingomielinice s-ar realiza atât direct, prin acțiunea exercitată de agenți externi, cât și prin intermediul receptorilor *Fas* și *TNF* (*tumor necrosis factor*). În situația din urmă ar fi implicate domeniile tanatogene (*DD – death domain*) ale acestor receptori, astfel încât celula este dirijată spre apoptoză.

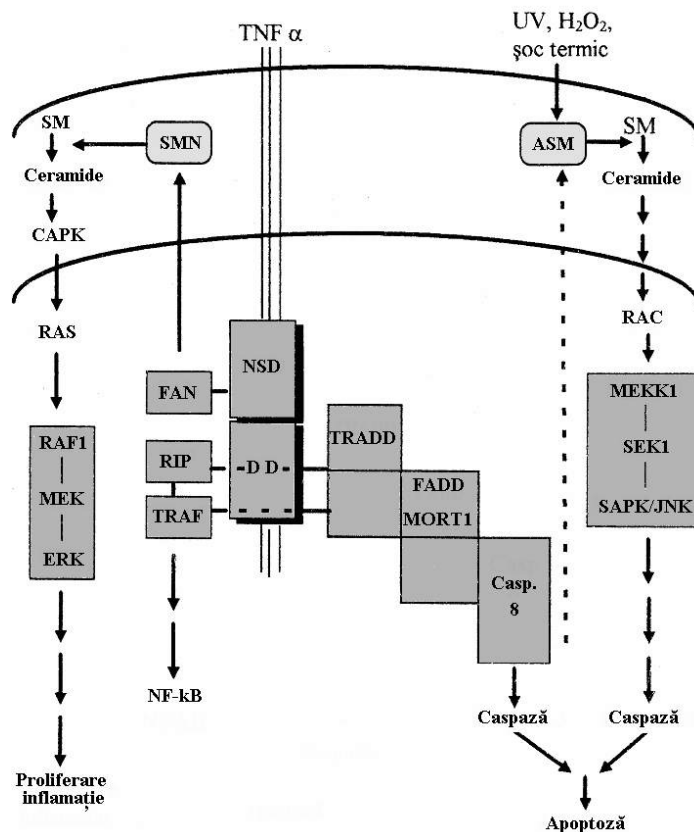


Fig. 3.1 - Mecanisme posibile de interacțiune între TNF și calea sfingomielinei (adaptată de Moldoveanu și Popescu, 1999 - după Haimovitz-Friedman, 1997).

(SM – sfingomielină; SMN – sfingomielinază neutră; CAPK – kinaza activată de ceramide; FAN – proteina-adaptor la SMN; NSD – domeniul de legătură cu SMN; DD – domeniul morții; ASM – sfingomielinază acidă; TRADD – proteină asociată domeniului morții din receptorul 1 al TNF; FADD/MORT1 – proteină cu domeniul morții asociată Fas; SEK1 – stress kinaza; RAC – subfamilie a familiei RAS).

În unele cercetări s-a evidențiat că în transmiterea semnalului apoptotic ar fi implicat și sistemul *SAPK-JNK* (*SAPK* desemnează protein-kinazele activate de factori de stres; *JNK* desemnează protein-kinazele *c-JUN* cu NH-terminal). Sfingomielinaza și ceramidele determină creșterea cantității de *SAPK* active, urmată de hidroliza *JNK – c-JUN*, procese cu rol important în apoptoză. Unii factori de stres ca radiațiile ionizante și UV, dar și TNF, proteinele șocului termic, proteinele șocului oxidativ etc, au capacitatea de a genera ceramide și de a activa sistemul *SAPK-JNK*. Pe lângă rolul de mesager secundar al căii sfingomielinice de declanșare a apoptozei, ceramidele pot avea și funcția de efector direct, fiind implicate în fragmentarea ADN-ului (prin activarea receptorului pentru TNF), modificare tipică în apoptoză, (Dănăilă et al., 1999).

Deși formarea complexului adaptor *TRADD-FADD-FLICE* (care primește semnale prin receptorii Fas/TNF) determină activarea caspazelor, independent de via activarea ceramidelor, s-a constatat totuși că eliminarea domeniului tanatogen (DD) al celor doi receptori, precum și lipsa acestui domeniu la proteinele adaptor *FADD/MORT1*, inhibă atât inducerea ceramidelor cât și a apoptozei. Unele cercetări arată că ceramidele se pot constitui în semnale de activare a caspazelor (proteazele *ICE-Ced-3*), efectorii apoptozei, (Friedman et al., 1997). În legătură cu apoptoza mediată de ceramide se apreciază că deși ele pot iniția procesul apoptotic, celulele pot evita intrarea în apoptoză, întrucât de-a lungul acestei căi de semnalizare ar exista o serie de puncte de control în care procesul poate fi blocat. Astfel de puncte sunt cele controlate, de exemplu, de *PKC* și *Bcl-2*. Proteina *Bcl-2* exercită acest control în apropierea punctului de „orientare” (*commitment*) către apoptoză, (Moldoveanu și Popescu, 1999).

S-a observat de asemenea că fracțiunile oxidate ale lipidelor cu densitate scăzută (LDL) determină producția în exces a ceramidelor și acumularea lor în celule. Aceste fracțiuni oxidate ale lipidelor ar avea capacitatea de a induce apoptoza, fie prin intermediul ceramidelor, fie a caspazelor. Chiar și acizii grași ar fi capabili să inducă apoptoza, acest proces fiind mijlocit tot de ceramide.

Creșterea concentrației de calciu intracelular determină activarea unor enzime hidrolitice, între care și a proteazelor și endonucleazelor, despre ale căror implicații în apoptoză am discutat anterior. De altfel, se consideră că ionul de calciu ar avea rol important în primele faze ale apoptozei și că de fapt creșterea cantității lui în citosol ar putea declanșa acest proces. Într-o serie de experiențe s-a evidențiat că zincul ar juca rol de moderator al apoptozei. În condițiile unor concentrații ridicate de zinc extracelular (500-1000 μM) este blocată apoptoza, iar la concentrații mici (80-200 μM) zincul ar putea induce apoptoza. Intervenția s-ar realiza prin acțiunea ionilor de zinc asupra endonucleazelor, prin inhibiția sau activarea lor și implicit a blocării sau activării fragmentării ADN-ului nuclear, (Dănăilă et al., 1999).

4. De ce a fost „inventată” apoptoza?

Celulele somatice proliferază folosind ca mecanism mitoză. Totodată, apoptoza este un proces obișnuit în organismele multiceulare și servește la eliminarea celulelor nedorite sau lezate. Numeroase studii au arătat că în țesuturile care proliferază există un număr mare de celule care dispar prin apoptoză. Acest proces poate fi observat în diverse zone ale organismului precum celulele criptelor intestinale,

în spermatogonii, în centrul nodurilor limfatici, pe parcursul dezvoltării sistemului nervos etc. Este atât de strânsă legătura dintre ciclul celular și moartea celulară încât unii își pun problema dacă apoptoza nu reprezintă o formă aberantă a mitozei, (Brady și Gil-Gomez, 1999). King și Cidrowski (1995) au denumit incapacitatea celulei de a progresa în ciclul celular, datorită unei mitoze anormale ce poate duce la moartea celulei – „catastrofă mitotică”. Celulele în cauză manifestă o serie de schimbări morfologice, despre care am discutat deja. Așa de exemplu, celulele cultivate de mamifere, care sunt supuse catastrofei mitotice, devin ne-adezive, se rotunjesc, volumul celular se reduce, iar cromatina lor se agregă.

Fiind un proces antagonist mitozei, apoptoza se constituie într-un mecanism de reglare a homeostaziei celulare, a raportului mitoză/apoptoză și implicit a numărului specific de celule dintr-un țesut. Se consideră că în corpul uman sunt produse prin mitoză cca 100.000 de celule în fiecare secundă și cam tot atâtea mor prin apoptoză, (Vaux și Korsmeyer, citați de Gewies, 2003). Apoptoza contribuie atât la eliminarea celulelor în exces, cât și a celulelor care se dezvoltă anormal (care au, de exemplu, material genetic grav alterat și nereparabil), a unor celule potențial periculoase (cum ar fi celulele canceroase, celulele autoreactive ale sistemului imun, celulele infectate cu virusuri etc). Prin apoptoză se modelează forma unui organism pluricelular, sau a unor organe ale acestuia. Am amintit anterior că la vertebrate, de exemplu, pe parcursul dezvoltării membrilor apoptoza asigură eliminarea țesutului mezenchimal interdigital și contribuie la formarea degetelor (inhibarea morții acestor celule împiedică și formarea degetelor). Alte exemple de intervenție a apoptozei pe parcursul dezvoltării organismelor pot fi: regresia cozii la mormolocul de broască; dispariția la embrionul de găină a celulelor din partea posterioară a aripilor, pentru modelarea ulterioară a aripilor; moartea prin apoptoză a 131 din cele 1090 de celule somatice generate în cursul dezvoltării la viermele nematod hermafrodit *Caenorhabditis elegans* (al cărui adult numără 959 de celule), moartea celulară masivă care are loc pe parcursul dezvoltării timpurii a sistemului nervos (peste 50% din toți neuronii mor), dar și a majorității celulelor B și T (peste 95%) ale sistemului imun pe parcursul maturării lor (Gewies, 2003) etc.

În cazul țesuturilor somatice adulte la om, apoptoza este implicată în eliminarea celulelor în cursul refacerii țesutului epitelial, în atrofia prostatei și a cortexului adrenal datorită insuficienței hormonului trofic, în atrofia glandei mamare după lactație, în eliminarea limfocitelor B sau T la sfârșitul reacțiilor imunologice, în echilibrarea mitozei în țesuturile epiteliale din sân și endometru, în înlăturarea polimorfonuclearelor din țesuturile inflamate după terminarea răspunsului inflamator etc, (Moldoveanu și Popescu, 1999). Prin apoptoză sunt eliminate și celulele care au leziuni severe ale ADN-ului ce nu pot fi reparate, celulele autoreactive ale sistemului imun, celulele infectate cu virusuri etc. Unele disfuncții sau dereglări ale procesului de apoptoză pot conduce la cancer, la boli autoimune și la răspândirea infecțiilor virale, după cum apoptoza excesivă poate provoca tulburări neuro-degenerative, SIDA și boli ischemice (Gewies, 2003).

În majoritatea tipurilor de tumori maligne cunoscute s-a semnalat prezența apoptozei spontane, fără a se putea efectua aprecieri de ordin cantitativ (în cancer proliferarea celulară fiind un proces mult mai intens decât cel de apoptoză). S-a constatat totuși că genele supresoare de tumori și produșii acestora au capacitatea de a

induce apoptoza. Unele dintre aceste gene au atât capacitatea de a induce cancerul cât și apoptoza, tipică în acest sens fiind oncogenă *c-myc*. Sunt și situații în care apoptoza poate fi alterată sau încetinită, cum ar fi unele boli neuro-degenerative, hepatita, cardiopatia ischemică sau degenerativă, infecția cu HIV etc, ceea ce duce la tulburări funcționale importante ale unor țesuturi. Prin urmare, dereglarea procesului de apoptoză, fie în sensul intensificării lui (bolile neuro-degenerative și hematologice), fie a inhibării acestuia (procesele tumorale), poate duce la stări patologice.

Cum se face că o celulă, care uneori aparține unui grup de celule foarte asemănătoare cu ea, intră în apoptoză? Se apreciază că în cazul mamiferelor fenomenul s-ar datora:

- lipsei unor stimuli externi care asigură supraviețuirea;
- prezenței unor stimuli care determină apoptoza;
- dereglării unor mecanisme prin care celula își poate repara unele leziuni apărute la nivelul organitelor celulare sau a materialului nuclear, (Raff, citat de Dănăilă et al., 1999).

Potrivit unor cercetări, pentru supraviețuire, celulele au nevoie de factori de creștere (substanțe cu rol de hormoni trofici), pentru care ar exista o competiție între celule și în lipsa cărora celula poate intra în apoptoză. Ritmul de producere a acestor factori trofici într-un țesut influențează raportul mitoză/apoptoză și implicit numărul optim de celule în țesutul respectiv. S-a constatat, de exemplu, că în culturi de celule endometriale de șoarece sunt secretați în mod ciclic fie factori care controlează diviziunea celulară, fie factori ce controlează apoptoza, raportul dintre ei determinând oscilații zilnice ale numărului de celule în jurul unei valori care este relativ constantă pe termen lung, (Lynch, citat de Dănăilă et al., 1999). Homeostazia unor țesuturi și celule, cum ar fi celulele țesutului hematopoietic, ale cortexului suprarenal, celulele epiteliale ale prostatei, celulele neuronale în timpul dezvoltării lor etc, ar fi asigurată de semnalele transmise de factorii trofici sau de cei ce declanșează apoptoza, nefiind încă clar dacă acești factori au specificitate de țesut sau ei sunt asemănători în întregul organism. Comunicarea dintre celule prin intermediul mesagerilor chimici extracelulari, a unor stimuli mecanici proveniți din citoschelet etc, ar juca un rol foarte important în decizia unei celule de a intra în apoptoză.

Apoptoza spontană este întâlnită și în tumorile maligne, în special în jurul zonelor de necroză, factorii inductori fiind diverși și insuficient elucidați. Intrarea în apoptoză a unor celule tumorale poate fi un proces intrinsec acestora (activarea unor *antioncogene*), poate fi datorată factorului de necroză a tumorilor - TNF (citokină secretată de macrofagele activate), atacului limfocitelor T asupra acestor celule, poate fi indusă prin tratamentele chimioterapice etc, (Dănăilă et al., 1999).

5. Factori care induc și care inhibă apoptoza

5.1. Factori care induc apoptoza

Din cele prezentate anterior am reținut faptul că apoptoza unor celule este un fenomen fiziologic normal, care contribuie la homeostazia țesuturilor, la modelarea acestora și a organismelor vii, potrivit unor instrucțiuni (semnale) provenite din interiorul celulei, dar și din exteriorul ei (de la celulele învecinate). Apoptoza însă poate fi declanșată și sub acțiunea unor agenți externi de natură fizică și chimică, care provoacă în special alterări ale materialului genetic și indirect modificări ale

proceselor biochimice celulare (nu se știe dacă apoptoza ar putea fi indusă de agenții externi și prin acțiunea lor directă asupra proceselor biochimice din celule). Se pare că și în această situație decizia intrării în apoptoză a unei celule se ia tot pe baza semnalelor primite de la celulele învecinate, care au fost probabil „avizate” de leziunile provocate materialului genetic al celulei în cauză, (Dănăilă et al., 1999). Gama factorilor fizici, chimici și biologici care pot induce apoptoza este variată: radiațiile ionizante și neionizante, hipertermia, câmpurile electromagnetice de frecvență joasă, hipoxia, substanțele chimioterapice (metothrexatul, ciclosporina A, vincristina, cisplatina, majoritatea citostaticelor), medicamentele citotoxice, hormonii, interferonul, retinoizii, virusurile, unii anticorpi, limfocitele citotoxice etc. Se consideră că inducția apoptozei de către unii din factorii amintiți depinde în mare măsură de capacitatea lor de a influența activitatea genelor *p53* și *bcl-2*. În continuare vom discuta pe scurt acțiunea apoptotică a unora dintre acești factori.

Radiațiile ionizante și neionizante. S-a constatat că radiațiile ionizante, în doze mici și moderate (care nu periclitează supraviețuirea celulelor), se constituie într-un fel de triggeri (declanșatori) efectori ai apoptozei prin schimbările induse la nivelul ADN-ului celular. Se apreciază că produșii genelor *p53* (care au rol de monitorizare a integrității genomului celular) determină (la concentrații ridicate) oprirea ciclului celular în G_1 , procurând un timp mai îndelungat de intervenție a proceselor de reparație a ADN-ului lezat, iar în cazul în care aceste leziuni nu pot fi înlăturate, produșii genelor *p53* declanșează apoptoza. Existența unui astfel de mecanism a fost demonstrat în unele experiențe. Astfel, timocitele a căror gene *p53* au fost blocate, au rezistat la doze letale de iradiere, iar deblocarea acestor gene a determinat redobândirea capacității de apoptoză sub influența radiațiilor. S-a observat de asemenea că o concentrație sporită de produși ai genelor *p53* a indus apoptoza în tumorile derivate din timocite (Clarcke et al., 1993 și Yonish-Rouach et al., 1991 – citați după Dănăilă et al., 1999). Intrarea în apoptoză în urma iradierii depinde și de rata de proliferare specifică celulelor unui țesut, care crește odată cu această rată (cazul celulelor din criptele intestinale, ale celor din țesutul spermatic sau al limfocitelor), deși sunt situații în care radiațiile induc o frecvență ridicată a apoptozei fără să existe o asemenea legătură (cazul celulelor din glandele salivare sau lacrimale). În cazul iradierii terapeutice, frecvența apoptozei diferă de la o tumoră la alta și nu există o relație directă între radiosensibilitatea tumorii și nivelul apoptozei.

Și radiațiile neionizante (ultraviolete) au capacitatea de a induce apoptoza în țesuturile sau celulele care vin în contact direct cu acest tip de radiații. Potrivit unor informații prezentate de Dănăilă et al. (1999), prin iradierea UV a unei culturi de polimorfonucleare timp de 15 minute s-a indus moartea prin apoptoză a cca 70-90% din celule în interval de 4 ore de la iradiere. S-a constatat de asemenea că iradierea UV a unei culturi de celule leucemice a indus dispariția prin apoptoză a cca 50% din celule datorită alterării materialului nuclear, restul de celule afectate de acest fenomen având ca mecanism activarea *caspazei-3*. Așa cum se știe, radiațiile UV au capacitatea de a produce dimeri pirimidinici la nivelul ADN, blocând transcripția și translația ADN și probabil astfel se explică intrarea în apoptoză a celulelor afectate.

Hipertermia. S-a observat că tratamentele hipertermice moderate au calitatea de a induce apoptoza, deși mecanismul de acțiune rămâne obscur. Valoarea

temperaturilor la care se înregistrează un nivel ridicat al apoptozei depinde de la un țesut la altul, frecvența apoptozei fiind mai înaltă în cazul țesuturilor cu proliferare înaltă (țesuturile limfoide și tumorale, de exemplu). Țesuturile supuse acțiunii unor agenți fizici (inclusiv hipertermiei) prezintă un nivel crescut al proteinei *Bax* (pro-apoptotică).

Hipoxia. Hipoxia este un factor care poate induce atât apoptoza cât și necroza celulelor. Hipoxia însoțește frecvent tumorile care depășesc dimensiunea de 1-2 mm. Apoptoza apare ca fenomen cert în celulele tumorale hipoxice, dar hipoxia poate fi un factor care induce apoptoza și în celulele normale. S-a observat că inactivarea genei *p53* sau prezența în exces a proteinei Bcl-2 reduce frecvența de intrare în apoptoză a celulelor în caz de hipoxie. În zonele ischemice ale miocardului apoptoza indusă de hipoxie apare ca un factor distructiv, întrucât contribuie la eliminarea unor miocite, în timp ce distrugerea prin apoptoză a unor celule tumorale datorită hipoxiei în unele forme de cancer solid apare ca un mecanism de acțiune antitumorală al organismului, (Dănăilă et al., 1999).

Radicalii liberi. Nivelul radicalilor liberi din celulă interferează cu apoptoza. Potențialul redox din celulă influențează activitatea unor factori de transcripție. Investigațiile *in vitro* pe culturi de celule animale au arătat că speciile reactive de oxigen (ROS) pot induce apoptoza, după cum unii antioxidanți pot bloca acest proces. ROS pot provoca peroxidarea lipidelor, pot induce leziuni unor macromolecule (inclusiv ADN-ului), pot inactiva unele enzime, cu toate consecințele ce decurg din aceste reacții. Dacă unele din aceste leziuni nu pot fi anulate prin intervenția sistemelor reparatorii din celulă, atunci celula poate urma calea apoptotică. Speciile reactive ale oxigenului (radicalul superoxid, apa oxigenată, radicalul oxidril activ etc) au rol important în controlul unor procese biologice (pot activa expresia unor gene, pot influența răspunsul la citokine și proliferarea celulelor etc), de unde ideea că ele ar putea exercita rolul de molecule semnal în anumite condiții fiziologice, (Moldoveanu și Popescu, 1999).

Prezentăm în continuare unele din sistemele reparatorii ale leziunilor oxidative din celulă, ale căror dereglare poate induce apoptoza:

- *Tioredoxina* (TRX). Tioredoxinele sunt proteine redox de dimensiuni mici (12 kDa) prezente în toate organismele vii (bacterii, plante, mamifere etc). TRX este o oxido-reductază cu funcții antioxidante, care are în structura ei un motiv CXXC (cu două cisteine învecinate), cele două resturi de cisteină conferindu-i capacitatea de a reduce alte proteine. Enzima are numeroase substraturi, printre care și ribonucleaza, factori de coagulare, corion-gonadotropine, receptorul gluco-corticoid și insulina. Plantele dispun de un complex de șase tioredoxine, prezente în diverse compartimente celulare. Împreună cu *metionin-sulfoxid-reductaza*, TRX reactivează proteinele în care au fost oxidate resturile de metionină. Inactivarea tioredoxinei (prin oxidarea grupărilor -SH din molecula ei) poate duce la creșterea concentrației calciului în celulă (ROS pot ataca unul din resturile de metionină de la capătul C-terminal al *calmodulinei* și astfel să modifice pierderea capacității de activare a ATP-azei Ca^{2+} membranare). Or, dereglarea homeostaziei calciului în celulă poate determina activarea unor enzime (fosfolipaze, proteaze, transaminaze, endonucleaze etc), cu

consecințele ce decurg de aici. TRX este implicată și în reglarea unor molecule redox-sensibile, printre care *NF-kB* (*factorul nuclear kappa-B*), *API* (*activator protein-1*) și receptorul gluco-corticoid. Activarea NF-kB (asigurată prin fosforilarea subunității IκB din componența sa, la intervenția unei tirozin-kinaze) determină migrarea lui în nucleu, unde se leagă de o secvență (kappa-B) a ADN-ului. În realizarea acestei legături (ADN-NF-kB) intervine TRX și proteina *Ref-1* (*factorul redox 1*), care asigură reducerea restului de cisteină din structura NF-kB. Translocarea în nucleu a NF-kB este facilitată de intervenția agenților oxidanți, iar legarea lui la ADN necesită agenți antioxidanți. O serie de argumente arată că activarea factorului NF-kB se află sub controlul statutului redox: activarea lui directă de către apa oxigenată și peroxizii organici; activarea lui ca răspuns la acțiunea unor agenți citotoxici (care poate fi blocată de antioxidanți); inhibarea activării acestuia de către un număr mare de antioxidanți etc. S-a constatat că însăși funcția proteinei p53 poate fi reglată de către antioxidanți și ioni metalici, (Moldoveanu și Popescu, 1999). Faptul că tioredoxinele se pot deplasa dintr-o celulă în alta sugerează că ele ar putea fi implicate în fenomenul de comunicare la plante;

- *poli-(ADP-ribozil)-polimeraza (PARP)* este o enzimă prezentă în nucleul celulelor, cu rol în procesele de excizie și reparație ale ADN-ului. Enzima prezintă mai multe regiuni (domenii): un domeniu de legare la ADN, unul clivat de caspază, un altul de auto-modificare și un domeniu catalitic. Ea se activează ca răspuns la rupturi monocatenare (RM) induse ADN-ului de factori metabolici, chimici sau fizici și le semnalează sistemelor enzimatic implicate în reparația lor. În prezența unei astfel de leziuni ADN, domeniul de legare ADN al PARP se leagă la ADN și determină sinteza unui lanț de poly-(ADP)-riboză (PAR), acțiune de care este responsabil domeniul catalitic al enzimei. PAR reprezintă un semnal pentru intervenția enzimelor de reparație a ADN-ului lezat. Domeniul de modificare al PARP asigură eliberarea proteinei PARP de ADN după cataliză. După reparația ADN, are loc și degradarea lanțurilor PAR de către glicohidrolază. Această enzimă poate fi activată prin acțiunea ROS, care induc desfacerea helixului de ADN. Dacă ADN-ul nu poate fi reparat, intervine *apopaină* (caspaza-3) ce degradează PARP, iar degradarea PARP activează la rândul-i endonucleaze specifice care vor determina apoptoza celulei;

- *prezența NO*. S-a constatat că NO, care poate avea fie efect cito-toxic, fie cito-protector (funcție, se pare, de tipul de celulă), poate induce în unele țesuturi apoptoza, iar în altele s-o blocheze. NO poate inactiva unele enzime din mitocondrii, în special cele care conțin Fe, S și grupări tiolice în moleculă. Or, inactivarea enzimelor cu Fe și S poate conduce la eliberarea Fe, care poate participa la reacția *Fenton* (care reprezintă cataliza de către Fe a peroxidului de hidrogen cu formarea de radicali liberi hidroxil; reacție folosită practic în tratarea unor poluanți acvatici precum fenolii, formaldehida, unele pesticide etc), din care rezultă radicali liberi oxidril. NO poate concura cu oxigenul în legarea la centrul activ al citocrom-oxidazei, ceea ce conduce la reducerea energiei în mitocondrii și la eliberarea calciului (despre a cărei consecință am mai discutat). NO poate inhiba glicoliza și metabolismul energetic din mitocondrii, ceea ce atrage moartea celulei datorită depleției ATP. NO poate inhiba și sinteza ADN-ului (prin inhibarea ribonucleotid-reductazei) și în acest fel contribuie la moartea celulară. Proteina Bcl-2 are calitatea de a proteja celula de apoptoza indusă de NO. De altfel, unii consideră că NO ar fi moleculă semnal pentru expresia proteinei Bcl-2. În investigații efectuate pe

culturi de hepatocite s-a arătat că NO ar bloca activarea caspazei-3 (și astfel ar preveni apoptoza), fie prin S-nitrozilarea ei, fie prin intermediul guanozin-monofosfatului ciclic (GMPc), (Moldoveanu și Popescu, 1999).

Chimioterapicele. Este un fapt cert că apoptoza poate fi indusă de unele substanțe anticanceroase cum ar fi tamoxifenul și gluco-corticoizii, după cum este posibil ca și alte substanțe precum metothrexatul, vinblastina, etopozida, cisplatina etc, care determină apoptoza *in vitro*, să aibă această calitate și *in vivo*. Mecanismul prin care induc apoptoza aceste substanțe este neclar, dar se consideră că ele și-ar exercita acest efect prin influențarea genelor *bcl-2* și *p53*. S-a observat că stimularea sintezei de produși specifici genei *p53* crește receptivitatea celulelor tumorale pentru substanțele citotoxice, după cum pierderea sau deficiența funcției acestei gene sporește rezistența acestor celule la chimioterapie. Un rol asemănător ar avea și gena *bcl-2* prin producția ei specifici. Se pare că genele care induc apoptoza sunt capabile pe de o parte să genereze cancerul, iar pe de altă parte să inducă rezistența la terapia anticanceroasă. Diminuarea în timp a eficienței unor substanțe în terapia cancerului pare să fie legată de activarea unor gene anti-apoptotice (cum ar de exemplu *bcl-2*), după cum mutația genei *p53* poate de asemenea să determine ineficiența sau eficiența parțială a unor chimioterapice, (Dănăilă et al., 1999).

Hormonii. Modul cum influențează hormonii procesul de apoptoză este mai puțin cunoscut. S-a observat că în cazul atrofiei unor glande precum prostata și glandele suprarenale apoptoza are rolul ei. Gluco-corticoizii au capacitatea de a induce apoptoza în timocite și în celulele limfoamelor maligne. Mecanismul de acțiune pare a fi legat tot de activitatea genei *bcl-2*.

Factorii de necroză a tumorilor (TNF) și de creștere a nervilor (NGF)

TNF este o citokină secretată de macrofagele active, care-și exercită acțiunea prin intermediul a doi receptori aflați pe suprafața celulelor, receptori care au greutate moleculară diferită (75 și respectiv 55 kDa). Legarea TNF de acești receptori declanșează, în anumite condiții, o serie de procese celulare care se pot finaliza cu intrarea în apoptoză a celulei. TNF are un rol important în distrugerea celulelor tumorale și a altor tipuri de celule.

NGF este o citokină importantă pentru creșterea, menținerea și supraviețuirea unor neuroni țintă. Receptorii lui sunt situați pe suprafața unor celule, inclusiv a celulelor nervoase. NGF este un factor critic pentru supraviețuirea și întreținerea neuronilor simpatici și senzitivi, în lipsa acestui factor ei fiind supuși apoptozei. Se consideră că și NGF poate induce apoptoza, condițiile și mecanismul prin care realizează acest proces fiind încă insuficient cunoscute. NGF ar juca un anume rol în unele boli cardiovasculare (ateroscleroză, obezitate, diabetul de tip 2, sindromul metabolic), dar și într-o serie de tulburări psihiatrice (demența, depresia, schizofrenia, autismul, anorexia nervoasă etc).

Anticorpilor anti-antigenului Fas. Receptorul *Fas* (APO-1 sau CD95) face parte dintr-o mare familie de proteine (în care intră și TNF, NGF, unii receptori limfocitari

ca CD27, CD30, CD40), fiind o proteină trans-membranară receptor care poate induce apoptoza.

Retinoizii. Retinoizii sunt derivați ai vitaminei A, care au rol important în creșterea, diferențierea și dezvoltarea unor țesuturi, care pot manifesta însă activitate anticancerigenă și declanșa apoptoza în diverse tipuri de celule canceroase, această acțiune fiind legată se pare de activitatea caspazelor.

Limfocitele citotoxice. În cercetări efectuate pe culturi celulare s-a constatat că unele celule ca limfocitele T citotoxice, celulele NK (Natural Killer) și celulele K (Killer) pot induce apoptoza în celulele țintă. Un exemplu de acest gen îl reprezintă distrugerea de către limfocitele T citotoxice a celulelor infectate cu virusuri. S-a constatat de asemenea că substanțele care inhibă expresia genei *bcl-2* nu inhibă apoptoza provocată de limfocitele T citotoxice.

Infecțiile virale. S-a observat că unele infecții virale (în special infecția cu HIV) determină un nivel mai ridicat al apoptozei limfocitelor T neinfectate, reducerea numărului limfocitelor activate și diminuarea reacției imune.

Matrixul extracelular. Contactul (adeziunea) cu matrixul extracelular are un rol foarte important pentru evoluția normală, pentru creșterea, supraviețuirea și dezvoltarea a numeroase celule. Acest contact este asigurat de molecule speciale denumite *integrine*, prezente la suprafața acestor celule (blocarea acestor molecule cu ajutorul peptidelor determină pierderea aderenței celulelor și intrarea lor în apoptoză). Aceste integrine ar transmite totodată semnale specifice în interiorul celulei. Lipsa contactului unor celule la matrixul extracelular, poate determina blocarea ciclului de diviziune sau intrarea în apoptoză a celulelor în cauză. S-a constatat, de exemplu, că pierderea contactului cu matrixul extracelular face ca fibroblastele primare să aibă o sinteză redusă a proteinelor, iar ciclul lor celular să se blocheze în G₁, după cum celulele endoteliale și epiteliale primare aflate în această situație să intre rapid în apoptoză (degradarea matrixului extracelular face, de exemplu, ca în cursul involuției glandei mamare celulele epitelului mamar să intre în apoptoză). O caracteristică a celulelor tumorale este aceea că ele nu intră în apoptoză în urma detașării lor de matrixul extracelular. În acest caz, apoptoza s-ar realiza prin intermediul produșilor genelor *p53* sau *bcl-2*, (Dănăilă et al., 1999).

5.2. Factori care inhibă apoptoza

Potrivit datelor furnizate de Thompson (citată după Dănăilă et al., 1999) printre inhibitorii apoptozei figurează:

- a) factori fiziologici: factori de creștere, matrixul extracelular, ligandul CD-40, aminoacizi neutri, zincul, hormonii estrogeni și androgeni;
- b) factori farmacologici: inhibitori ai cistein-proteazelor, inhibitori ai calpainei, promotori tumorali;
- c) gene virale: *E1B* (de la adenovirusuri), *p35* și *IAP* (de la baculovirusuri), *Crma* (de la virusul variolei), *LMW5-HL* (de la virusul febrei suine africane) etc.

Un mecanism eficient de apărare a organismelor pluricelulare împotriva infecțiilor virale îl reprezintă apoptoza, proces care asigură odată cu moartea celulei și moartea virusului, evitându-se astfel propagarea infecției. Cum se știe, virusurile au capacitatea de a subordona procesele celulare pentru reproducerea lor, iar pentru supraviețuirea lor este necesară și supraviețuirea celulelor infectate și deci evitarea apoptozei de către acestea. Virusurile au dezvoltat diverse strategii pentru inhibarea morții celulare și a eliberării de citokine pro-inflamatorii de către celulele infectate înainte de a-și realiza ciclul de replicare și a fi astfel capabili de a infecta alte celule. În acest scop, unele virusuri au capacitatea de a sintetiza proteine care pot inhiba apoptoza celulelor infectate. Exemple de acest gen sunt reprezentate de: proteina virală *FLICE*, care împiedică transmiterea semnalului de transducție către enzimele efectoare ale apoptozei; proteina *E1B19K* (de la adenovirusuri) care, pentru a bloca semnalul pro-apoptotic al proteinei celulare *Bax*, interacționează cu aceasta; baculovirusurile (virusuri specifice insectelor) produc unele proteine cum sunt p35 și IAP, care inhibă caspazele (enzime efectoare ale apoptozei). S-a observat de asemenea că unele polizaharide (LPS) produse de bacterii pot inhiba apoptoza (în culturile de monocite, de exemplu), (Dănăilă et al., 1999).

Schimbările provocate unor factori de transcripție necesari apoptozei, prin mutația genelor specifice (cum ar fi gena *myc* sau *NUR77*), pot inhiba apoptoza. Sunt situații în care, prin stimularea receptorului TNF, nu are loc activarea caspazelor, ci activarea factorului de transcripție Nf-kB. Există de asemenea unele peptide care pot bloca receptorii Fas și TNF și inhiba în acest fel apoptoza.

Proteinele p35 și crmA. Proteina p35 este cunoscută pentru efectele ei anti-apoptotice și antioxidante (SAHDEV et al., 2010), fiind codificată de o genă specifică baculovirusului, AcMNPv. Această proteină este un inhibitor al MCP la diverse specii de animale (insecte, nematode, mamifere), ceea ce sugerează că interacționează cu un component conservat evolutiv al mașinării morții celulare, (Hay et al., 1994; Beidler et al., 1995; Xue și Horvitz, 1995). Proteina p35 are efect inhibitor asupra apoptozei indusă prin Fas și TNF și blochează clivarea proteolitică (indusă pe calea Fas sau TNF) a proteinei PARP (de la forma ei nativă de 116 kDa, la forma specifică apoptozei de 85 kDa), (Beidler et al., 1995). Proteina este capabilă să se lege la caspaze, să le cliveze și inactiveze, fiind un inhibitor eficient al caspazelor -1 la -8 (FAN et al. 2005), dar nu are efect inhibitor asupra *granzimei B*. Există preocupări de a utiliza capacitatea de reglare a apoptozei și pe cea antioxidantă a proteinei p35 în scop terapeutic. În combinație cu unele medicamente anticancer, ea ar putea să reducă rezistența celulelor tumorale și să prelungească acțiunea citotoxică a acestora, (Sahdev et al., 2010). Hisahara et al. (2000) au obținut șoareci transgenici care exprimă proteina p35 în oligodendrocite și au constatat că acestea sunt rezistente la apoptoza indusă prin TNF α , anticorpi anti-Fas și interferon gamma, iar șoarecii respectivi s-au dovedit rezistenți la encefalomielita autoimună indusă experimental cu mielin-glicoproteină.

Proteina *crmA* este o serpină (inhibitor de serin-proteaze), produs al virusului *cowpox* (CPV). Poxvirusurile sunt virusuri mari cu ADN dublucatenar, care se replică în citoplasma celulelor gazdă și sintetizează proteine care deviază răspunsul imun al gazdei, (Nathaniel et al., 2004). Proteina *crmA* are efect inhibitor asupra inflamației și