



Iatreia

ISSN: 0121-0793

revistaiatreia@udea.edu.co

Universidad de Antioquia

Colombia

Ramírez Agudelo, María Elena; Rojas López, Mauricio

La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular

Iatreia, vol. 23, núm. 2, junio, 2010, pp. 166-177

Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180519015008>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular

María Elena Ramírez Agudelo,^{2,3} Mauricio Rojas López^{1,3}

RESUMEN

Con base en criterios morfológicos y bioquímicos se han definido tres clases de muerte celular: apoptosis, autofagia y necrosis. La primera es una muerte celular regulada, mediada principalmente por caspasas; en la autofagia ocurre formación de vesículas que se fusionan con vacuolas hidrolíticas para degradar organelas intracelulares alteradas. En cuanto a la necrosis, se la ha definido tradicionalmente por la ruptura de la membrana citoplasmática con salida del material intracelular lo que desencadena una reacción inflamatoria localizada; los mediadores pueden variar dependiendo del tejido: lipasas, proteasas y endonucleasas. Las actividades celulares intrínsecas y los eventos que preceden al colapso celular definen el tipo de daño. Pero el hecho de que los tres tipos de muerte celular puedan coexistir y la ocurrencia de necrosis incluso en presencia de ATP hacen pensar que esta es un evento menos pasivo y que hasta cierto punto se puede regular la inducción del daño. Las alteraciones en la estructura de proteínas y en la actividad de proteasas, lipasas y endonucleasas en presencia de sus cofactores, asociadas con los mecanismos intrínsecos de regulación celular permiten pensar que cada célula puede tener su propio arsenal para producir los eventos designados como necrosis (recientemente denominada parapoptosis). En este artículo se revisan algunas de las evidencias sobre la regulación durante la necrosis en diferentes modelos celulares.

Palabras clave

Apoptosis, Autofagia, Calcio, Calpaínas, Caspasas, Fosfolipasas, Mitocondria, Necrosis

SUMMARY

Necrosis, a regulated mechanism of cell death

Three types of cellular death have been defined by morphological and biochemical criteria: apoptosis, necrosis and autophagy. Apoptosis is a regulated cell death, mainly mediated by caspases; autophagy induces degradation of intracellular damaged organelles through the formation of vesicles that fuse with hydrolytic vacuoles. Necrosis has been traditionally defined by the rupture the cytoplasmic membrane with subsequent release of intracellular material, triggering localized inflammatory responses.

¹ Profesor, Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

² Estudiante de Maestría, Corporación Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³ Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética y Unidad de Citometría, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Mauricio Rojas López mrojaslop@hotmail.com

Recibido: marzo 25 de 2009

Aceptado: julio 10 de 2009

Intrinsic cellular activities and the events preceding cellular collapse are critical to determine the type of tissue damage. The fact that all three types of cellular death can coexist in any organ and tissue with different availabilities of ATP, suggests that necrosis can be conceived as an active event and that to some extent it may be regulated. Alterations in the structure of proteins and in the activity of different proteases, lipases and nucleases, indicate that each cell may have its own arsenal to trigger the events leading to necrosis. In this article we review some of the evidences on cellular regulation during necrosis.

Key words

Apoptosis, Autophagia, Calcium, Calpaines, Caspases, Mitochondria, Necrosis, Phospholypases

INTRODUCCIÓN

Históricamente, por criterios morfológicos y bioquímicos, se han definido tres clases de muerte celular: la apoptosis, la autofagia y la necrosis.¹⁻⁴ La apoptosis es una muerte celular regulada fisiológicamente, cuyos principales mediadores son proteasas denominadas caspasas; la autofagia¹ media la degradación de organelas intracelulares alteradas con formación de vesículas que se fusionan con vacuolas hidrolíticas.^{1,5-7} La necrosis se ha definido como la serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente salida de material intracelular lo que desencadena una reacción inflamatoria; algunos patólogos la definen como los eventos ulteriores a la muerte celular.^{1,2,8} Además, los fenómenos relacionados con la necrosis se fundamentan en la observación directa de los tejidos muertos, con tinciones que evidencian las huellas postrimeras de la muerte.^{1,4}

Se ha entendido la necrosis como una muerte celular no controlada que promueve reacciones inflamatorias en los tejidos circundantes y puede favorecer la diseminación de patógenos en un hospedero susceptible. Diferentes estudios la replantean como un fenómeno "esencial y anunciado", muestran que ocurre durante la ontogenia y que puede ser regulada por vías que no son tan entendibles como las de la apoptosis. Se ha descrito la necrosis inducida por deficiencias de ATP en la isquemia y cuando hay alteraciones de las funciones dependientes de oxígeno y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.⁸ Las

células bajo condiciones de anoxia quedan a expensas del suministro de energía a partir de la glicólisis, si es viable, y de la degradación de sustratos endógenos con mínimo consumo de ATP y de oxígeno.⁸ Esto reduce la actividad de la cadena transportadora de electrones y el pH intracelular, lo que generalmente está asociado a la acumulación de ácido láctico y a alteraciones en las bombas de hidrogeniones, desensamble de ribosomas y cese de la síntesis de proteínas.^{4,8-10}

No solo la isquemia puede causar deficiencias de ATP. Durante la reperfusión, y bajo condiciones de estrés, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por su sigla en inglés) y se afecta la estequiometría entre el oxígeno y los sustratos que generan ATP durante la oxidación, induciendo la modificación estructural de componentes endógenos. Tempranamente hay alteraciones en la transición de la permeabilidad mitocondrial como hiperpolarización y despolarización que llevan a la disminución del ATP y la aparición de la necrosis.^{11,12}

La entrada de calcio ocurre por alteraciones en el equilibrio iónico ulteriores al déficit de ATP. El calcio elevado favorece la actividad sostenida de enzimas que dependen de él como cofactor, y las alteraciones en la fuerza iónica y el pH modifican la capacidad de procesar los sustratos naturales y se puede favorecer la degradación inespecífica¹³ mediada por ATP-asas, proteasas, endonucleasas, exonucleasas y fosfolipasas. Estas últimas, aunque participan en la reparación, pueden lesionar la membrana celular.^{5,13-16} Las isoenzimas de la fosfolipasa A-2 (PLA2, por su sigla en inglés) constituyen otro grupo de enzimas que pueden estar activas independientemente de la presencia de ATP.¹⁷⁻²⁶ Algunas isoenzimas participan en la reparación de las membranas, pero las formas secretadas pueden mediar el daño de los fosfolípidos estructurales, causando pérdida de la integridad de la membrana. Se ha considerado que el aumento de las ROS también puede ser determinante en la inducción de necrosis. Las ROS tienen diferentes blancos celulares y pueden inducir muerte celular mediante daño del ADN y peroxidación de lípidos: esta última es el principal evento para la activación continua de las PLA2 dependientes de calcio.^{8,24}

El reconocimiento de las células necróticas o de sus fragmentos, así como la presencia de proteínas modificadas y de chaperonas, puede inducir una variedad de señales proinflamatorias en los monocitos,

macrófagos y células dendríticas. Además, la presencia de polimorfonucleares neutrófilos puede acelerar el daño tisular cuando estas células activen sus mecanismos efectores.^{5,8,14-16} Si no se controla adecuadamente, la necrosis contribuye a la persistencia de la inflamación y al daño del tejido como se observa en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y en el lupus eritematoso sistémico (LES).

Existen evidencias que muestran a la necrosis como un evento que puede ser regulado. Algunos la plantean como un accidente, pero ella ocurre durante el desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis; por ejemplo, la muerte celular de los condrocitos facilita el crecimiento de los huesos, y la de células epiteliales del colon humano facilita que alcance su volumen; pero también se asocia a los procesos inflamatorios crónicos de la poliposis adenomatosa,⁸ y además, en el cáncer, favorece la angiogénesis, el crecimiento tumoral y las metástasis al inducir la expresión de factores que propician la migración celular.²⁷ En el caso de la muerte de los condrocitos, se observan ruptura de la membrana citoplasmática, salida de material citoplasmico y presencia de ADN fragmentado en el citosol; todo ello hace que este tipo de muerte sea más compatible con necrosis pese a que hay actividad de las caspasas 3 y 9, lo cual sugiere que después de la iniciación de la apoptosis se puede desencadenar una necrosis secundaria, o que la misma *condroptosis* pueda constituir este tipo de muerte, salvo que en ella, y a diferencia de la necrosis, hay autofagia que permite la autoeliminación.²⁸ En esta revisión descriptiva y narrativa, con artículos disponibles en PubMed, se plantea la necrosis como un evento fisiológico *regulado*, pero la incapacidad de *regularla*, como en el caso de la apoptosis, es la que se asocia con enfermedades. Es conveniente entonces romper con algunas premisas, ya que la ausencia de gasto energético no es condición para que se inicie.

APOPTOSIS, AUTOFAGIA Y NECROSIS

Apoptosis

La apoptosis es un proceso activo en el que se consume ATP mediado primordialmente por *caspasas* (cisteinil-aspartato proteasas).^{1,2} Las caspasas se activan después de la permeabilización de la membrana mitocondrial, la activación de receptores con dominios de muerte capaces de reclutar procaspasas y la acumulación de proteínas

mal plegadas en el retículo endoplásmico.^{1,2} En cuanto a los cambios morfológicos, la apoptosis se caracteriza por condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo y del ADN, dando origen a los cuerpos apoptóticos que contienen material celular degradado.

La apoptosis es esencial para el desarrollo y homeostasis de los tejidos, participa en la respuesta inmune y en general en todos los procesos fisiológicos. A diferencia de la necrosis, en la mayoría de los casos la apoptosis no desencadena una respuesta inflamatoria. Algunos han acuñado el término *piroptosis* para definir la muerte celular debida a la activación de la caspasa 1, la cual está directamente relacionada con el procesamiento de las interleuquinas IL-1 β e IL-18.³ Los cuerpos piroptóticos están asociados con procesos inflamatorios pero no están claras las diferencias en el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos y los piroptóticos ni las consecuencias que esto tenga en la respuesta inmune.³

En condiciones normales, las células fagocíticas, sean concurrentes al sitio de la muerte o espectadoras presentes en el momento en que se produce reconocen y eliminan los cuerpos apoptóticos; en este proceso, la unión de dichos cuerpos a receptores que reconocen la fosfatilserina induce, en fagocitos mononucleares, activación M2, producción de citoquinas como la IL-10 y el TGF β que potencian las funciones de los mismos fagocitos, reclutamiento de fibroblastos y reconstrucción de la matriz extracelular,¹⁻³ lo que permite la reparación del tejido²⁹ y la activación de células B reguladoras.²⁹ Sin embargo, sensores de ácido úrico activan el inflamósoma en la necrosis secundaria previniendo la activación M2 y la de células reguladoras.³⁰

Autofagia

Es un proceso lento que inicialmente afecta a organelas y compartimentos celulares. Durante la autofagia algunas porciones del citoplasma quedan aisladas dentro de una vacuola de doble membrana y son digeridas por hidrolasas lisosomales.^{1,6,31,32} Este mecanismo es inducido en condiciones microambientales adversas limitantes de nutrientes y cuando se debe remover una organela con alteraciones funcionales.¹ Se acepta que la autofagia es el mecanismo que gobierna adaptaciones tisulares como la atrofia, en la que se reducen el volumen celular y la función del órgano.^{1,8} Hay dos tipos de autofagia: la microautofagia definida como la absorción del citoplasma dentro del lisosoma o de una vacuola, en el caso de

las levaduras. Aún no se ha caracterizado bien este tipo de autofagia en células animales ni se ha identificado cuáles son las proteínas que participan en ella. El segundo tipo es la macroautofagia, en la cual se presenta catálisis de proteínas como una estrategia de supervivencia en condiciones de baja disponibilidad de aminoácidos.^{1,33} Las vacuolas autofágicas se forman inicialmente a partir de las membranas del retículo endoplasmático que rodea una región del citoplasma. Esta estructura forma una doble membrana que se fusiona con endosomas tardíos y lisosomas, generando un autofagolisosoma, donde finalmente se degradan las proteínas u organelas que habían sido autofagocitadas.^{7,32,34} La acumulación de autofagosomas y autolisosomas es un marcador morfológico de la macroautofagia.

No está clara la relación entre apoptosis y autofagia pues aunque ambas son mecanismos desencadenados cuando la célula está en condiciones de estrés, no se sabe a ciencia cierta si presentan un vínculo funcional como se ha sugerido al considerar que cuando la célula no tiene sustratos para aprovisionarse de energía puede desencadenar la apoptosis.^{1,2,34} Se acepta que la autofagia previene o retarda la apoptosis mediante inducción de proteínas de tipo Bcl-2 (por la sigla en inglés de *B-cell lymphoma 2*).³⁵ La autofagia media la involución de estructuras atávicas en *Drosophila melanogaster*.^{6,31,36}

Necrosis

En la necrosis hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular.^{5,15} Desde el punto de vista morfológico se la ha definido como el espectro de cambios post mórtém en un tejido por la acción progresiva de enzimas propias de las estructuras lesionadas.¹⁵ El aspecto de las células necróticas resulta de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o heterolítica. Por microscopía electrónica se observan soluciones de continuidad en las membranas plasmática y las organelas y marcada dilatación mitocondrial con apariencia de grandes densidades amorfas. Los análisis histológicos evidencian células eosinófilas por la unión más fuerte de la eosina con las proteínas citoplasmáticas desnaturadas y por la pérdida de la basofilia del citoplasma debida a los ácidos nucleicos.

Los cambios nucleares se deben a la fragmentación inespecífica del ADN: entre ellos se han descrito: picnosis nuclear o pérdida de volumen, ligera condensación del ADN, aumento de la basofilia nuclear, llamada cariorrexis, y cariolisis cuando ya no se detecta estructura cromatínica.¹⁶ Algunos de estos cambios se pueden observar pre mórtém en las células apoptóticas. Las diferencias básicas entre necrosis y apoptosis, en las que se incluye la autofagia como evento desencadenante, se presentan en la tabla n.º 1.

Tabla n.º 1. Diferencias básicas entre apoptosis y necrosis

Característica	Apoptosis	Necrosis
Estímulo	Fisiológico	Fisiológico y patológico
Efecto	Selectivo sobre la célula	Afecta al tejido circundante
Reversibilidad	Hasta la activación de las nucleasas	Irreversible, hay sensibilidad entre tejidos
Actividad de endonucleasas	Temprana	Post mórtem
Morfología celular	Proyecciones digitiformes y cuerpos apoptóticos	Turgencia celular
Organelas	Turgencia tardía	Turgencia rápida
Núcleo	Cariorexis	Diversos patrones
Cromatina	Condensación periférica	Condensación ligera, lisis
Fragmentación del ADN	Internucleosomal organizada	Aleatoria
Remoción y fagocitosis	Antes de la lisis	Tardía e incompleta
Inflamación	Ausente, excepto piroptosis	Heterolisis, Hsp
Autofagia	Inicia la apoptosis	Ausente
Cicatrización	Ausente	Fibrosis
ATP	Dependiente de ATP	Disminuido
Calcio	Permeabilidad mitocondrial	Favorece la necrosis
Caspasas	Dependiente	Independiente

El fenómeno que inicialmente se consideró capital fue el agotamiento del ATP en un ambiente hipódico por isquemia prolongada, e incluso, en ambientes altamente oxidantes durante la reperfusión.^{5,13} El agotamiento del ATP altera el flujo de iones y se liberan y activan las enzimas propias de cada tipo celular. Los procesos ulteriores de autólisis o heterólisis celulares dependen de cuál haya sido su función en la vida y de la variada composición celular de un tejido.¹⁶ Puede haber incremento del calcio intracelular e inducir daños al citoesqueleto. Inicialmente la célula se ve como una estructura homogénea, luego presenta espacios vacuolados y el tejido necrótico muestra patrones distintivos según que predomine el catabolismo o la desnaturalización de las proteínas.⁸

Para adquirir el aspecto morfológico característico se requieren horas por lo que, al principio, no hay cambios detectables cuando, por ejemplo, sucede un infarto de miocardio o cerebral. Los cambios ultraestructurales se pueden observar 20 a 40 minutos después del evento. Las enzimas y los productos celulares liberados desde el miocardio pueden estar presentes en la sangre dos horas después pero las características histológicas clásicas de la necrosis solo aparecen 4 a 12 horas más tarde.³⁷ En el hígado isquémico, la lesión necrótica se acompaña de disminución de los fosfolípidos de la membrana, posiblemente por el incremento del calcio citosólico y la activación de fosfolipasas.^{8,15}

Cuando el patrón primario es la desnaturalización proteica se desarrolla la *necrosis de coagulación*; por ejemplo, en el infarto agudo del miocardio por la isquemia ocurre coagulación de las proteínas intracelulares y se sustituye la zona de necrosis por tejido fibroso. Si predomina la digestión enzimática, el resultado es la *necrosis de licuefacción*: se produce una autólisis rápida que licúa la zona necrosada. Es típica de las lesiones del sistema nervioso central y de la médula ósea, al igual que del cloroma leucémico.^{8,38-41} La *necrosis grasa* puede ser traumática o enzimática. Es traumática cuando se sobrepasa la capacidad de adaptación celular por un efecto mecánico. Y es enzimática cuando la producen lipasas y proteasas liberadas al intersticio, activadas en un lugar no apto, pero con abundante sustrato. En la pancreatitis, por la obstrucción del conducto de Wirsung, las enzimas pancreáticas se activan dentro del órgano.⁴² La necrosis grasa enzimática se puede iniciar por un

proceso de macroautofagia: se pierden las estructuras que definen las organelas y delimitan el contenido celular, hay actividad de la tripsina y se inicia una reacción en cadena que activa otras enzimas pancreáticas.^{17,42,43} En el proceso autofágico desempeñan un papel importante la quimotripsina y la elastasa, sobre todo la segunda de ellas, porque al hidrolizar las fibras de elastina del tejido conectivo, favorece la difusión del proceso lítico y contribuye a la destrucción de las paredes vasculares.⁴³ En la necrosis grasa, la lipasa y la colipasa median la liberación de ácidos grasos de cadenas largas e insaturadas con efectos tóxicos sobre las células acinares, endoteliales y epiteliales.^{28,37,43-46} La fosfolipasa A2 secretora facilita la destrucción de las membranas celulares y la necrosis parenquimatosa⁴² induciendo coagulación, cambios de volumen de las células, muerte celular, lesión vascular con hemorragias y fenómenos trombóticos, y la posible extensión del proceso a las estructuras peripancreáticas.⁴³

Posteriormente ocurren los fenómenos denominados humorales en los que la actividad de proteasa puede alcanzar el plasma: la PLA2 favorece la liberación de histamina por los mastocitos y la de mediadores celulares y solubles al retroperitoneo y a la cavidad peritoneal, activando los sistemas del complemento, kinin-kalcreína, coagulación y fibrinólisis. Las sustancias generadas, no todas bien conocidas, se asocian con el desarrollo de las complicaciones multiorgánicas que acompañan a las pancreatitis graves^{24,43} y a las formas miliares de tuberculosis.¹⁶ Desde cualquier punto de vista se exceden las posibilidades de una sola célula y se considera entonces como un evento asociado a órganos y estructuras subcelulares.^{8,46}

La *necrosis de caseificación* se produce típicamente en las áreas hipódicas. Un ejemplo es el granuloma tuberculoso en el que se observan imágenes macroscópicas y microscópicas de *caseum*.^{5,44} En los granulomas estructuralmente bien definidos las áreas necróticas “parecieran proveer *ex profeso* un medio para la disminución” de la tensión de oxígeno necesaria para limitar a la bacteria; sin embargo, cuando dichas áreas no están bien definidas, los granulomas terminan fusionándose porque las redes fibrosas pierden continuidad, lo que puede favorecer el daño y la disseminación de los microorganismos contenidos en ellos.¹⁶

Disminución de las reservas de ATP: la vía glicolítica

En varios modelos se ha descrito la importancia del ATP en la inducción de muerte celular: la línea celular linfocítica humana Jurkat⁴⁷ y las células B de ratón⁴⁸ sufren necrosis en ausencia de ATP al ser tratadas con anti-CD95⁴⁷ o con TNF- α ,⁴⁸ lo que se explica por el incremento de la ceramida. Esta sustancia induce la movilización de calcio en respuesta a factores de crecimiento, proliferación, senescencia y receptores apicales de muerte, entre otros.⁴⁹ En presencia de bajas concentraciones de ATP puede inhibir el complejo III de la cadena respiratoria y favorecer la producción de ROS y consecuentemente la necrosis.^{15,49} En la hipoxia y la anoxia, la generación de ATP por la vía glicolítica no solo resulta insuficiente para las demandas celulares, sino que causa acidificación,⁵⁰ que afecta la síntesis de proteínas y el transporte de moléculas en contra del gradiente.⁴⁷ La pérdida de ATP y la acumulación de ácido láctico favorecen la aparición de necrosis en un modelo murino de isquemia del miocardio.⁵⁰ Se considera que el pH bajo favorece la protonación proteica y que altera las interacciones con otras proteínas y el plegamiento de las recién sintetizadas, induce acumulación en el retículo endoplásmico y activa vías dependientes de la caspasa.¹²

Las ROS que no alcanzan a ser amortiguadas dañan los lípidos de las membranas mitocondriales, alterando la concentración de solutos en la mitocondria y la diferencia de potencial entre la matriz y el exterior (evento comúnmente denominado *transición de permeabilidad*), disminuyen el ATP y llevan a la necrosis.⁴⁹ Aunque esto se considera el preludio de la activación de la caspasa 9, y luego, de la cascada de las caspasas efectoras, se argumenta que las mismas ROS pueden inactivar oxidativamente las caspasas y las lipasas o afectar la oxidación de la cardiolipina y que podrían forzar la extrusión, o sea la salida forzada, del citocromo C, incluso del que está fuertemente anclado a la mitocondria.^{51,52} En algunos casos, incluso, la caspasa 3^{22,53} se ha asociado con la necrosis, pero su bloqueo no tiene efectos sobre la muerte necrótica inducida por *M. tuberculosis*.^{22,54}

Alteraciones funcionales de la bomba sodio y potasio y movilización de calcio como mediadores de la necrosis

Para restaurar el pH intracelular alterado por la baja de ATP durante la hipoxia, se favorece una bomba

contrasentido de Na⁺/H⁺, que aumenta la concentración neta de Na⁺ intracelular. Este aumento no se puede regular adecuadamente mediante la activación de la bomba ATP-asa Na⁺/K⁺, porque el ATP está disminuido, por lo que intervienen otros sistemas de transporte.^{15,55-57} Para regular la cantidad de iones de sodio, se inician su salida y la entrada de calcio a través del sistema de transporte contracorriente Na⁺/Ca²⁺,^{15,56} lo que lleva a un aumento del calcio intracelular, que tampoco puede ser regulado eficientemente por las mismas razones que se mantienen inactivas las bombas Na⁺/K⁺. La presencia de calcio con bajas concentraciones de ATP o las altas condiciones oxidantes observadas durante la reperfusión, pueden desencadenar apoptosis y necrosis.⁵⁴ El exceso de calcio induce alteraciones rápidas en la actividad de varios sistemas por ejemplo: contracción muscular, exocitosis de vesículas secretoras (ejemplo: de neurotransmisores), metabolismo del glucógeno, polimerización de actina, captación de glucosa, carga eléctrica de la membrana mitocondrial, regulación de calmodulina, PI3K.⁵⁸ Un aumento moderado de su concentración puede activar la apoptosis dependiente de la vía mitocondrial, mientras que un aumento continuo de la misma puede inducir necrosis por activación de proteasas, lipasas y endonucleasas dependientes de él.^{59,60}

Diferentes estudios relacionan el incremento del calcio con la inducción de necrosis. En células neuronales de *Caenorhabditis elegans* se induce necrosis a través del canal activado por la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico.⁶¹ El aumento del calcio favorece la apertura del poro de la membrana mitocondrial, lo que permite la salida del citocromo C el cual activa la apoptosis vía apoptosoma y caspasas^{59,60} o la necrosis, como se mencionó anteriormente, mediante enzimas de las que es cofactor. Sin embargo, según su concentración, el calcio puede ser efector.

El calcio puede desencadenar varios mecanismos concomitantes. En un estudio realizado en células tubulares renales tratadas con bradiquinina, vasodilatador que aumenta la acumulación de calcio libre en el citoplasma y la mitocondria, con disminución del ATP favorece la permeabilidad a las ROS y, por lo tanto, la peroxidación de lípidos propia de la necrosis.⁶²

ROS y necrosis

Además de la reperfusión, se pueden generar ROS por los siguientes mecanismos: absorción de energía

radiante, metabolismo enzimático de xenobióticos, reacciones metabólicas normales de reducción/oxidación, oxígeno en presencia de hierro y cobre que catalizan la formación de radicales libres mediante las reacciones tipo Fenton; además, se favorece la producción de óxido nítrico (NO) que puede actuar como radical libre o convertirse en peroxinitrito, que es altamente reactivo.^{63,64} Hay un amplio rango de efectos sobre la célula de estas especies reactivas de oxígeno: a bajas concentraciones pueden inhibir la muerte celular cuando se altera la función de los efectores de la misma; o, a altas concentraciones, promoverla cuando son los mediadores del daño.

Las ROS pueden iniciar el daño de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Rompen puentes disulfuro y hacen modificaciones cis-trans que promueven proteólisis ulteriores y modifican la estructura y función de proteínas. Favorecen la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, formando enlaces cruzados entre proteínas, la oxidación del citoesqueleto proteico, la fragmentación de proteínas y la necrosis de coagulación. Las ROS promueven la apertura del poro de transición mitocondrial por medio de la oxidación del grupo tiol del ANT (por la sigla en inglés de *adenine nucleotide traslocator*) y modifican los canales de calcio asociados al retículo endoplásmico y los de la membrana plasmática, aumentando así la concentración intracelular de calcio. Se las ha relacionado con ruptura de la cadena de ADN.^{65,66} Todos estos efectos hacen que tengan una participación clave en la muerte celular. En la figura n.º 1 se resumen los principales daños inducidos por las ROS.

ACTIVACIÓN DE ENZIMAS DEPENDIENTES DE CALCIO EN LA INDUCCIÓN DE NECROSIS

Fosfolipasas A-2 (PLA2)

Las PLA2 hidrolizan los fosfolípidos en la posición *sn*-2, liberando el grupo alquílico.²⁵ Tienen como sustratos específicos fosfolípidos que poseen un grupo iónico unido a un fosfato, como: fosfatidil colina (FC), fosfatidil etanolamina (FE), fosfatidil glicerol (FG) y fosfatidil serina (FS).⁶⁷ Los productos son un lisofosfolípido y un ácido graso. Uno de los principales ácidos grasos que se obtienen de la activación de las PLA2 es el araquidónico (AA), precursor de los eicosanoides y sustrato de enzimas como las ciclooxygenasas (COX) 1 y 2 y la 5-lipoxygenasa (5-LOX). Entre los eicosanoides, las prostaglandinas, los

tromboxanos y los leucotrienos actúan como segundos mensajeros y mediadores en la inflamación.^{17,26,68}

Existen diversas formas de clasificar las isoenzimas de las PLA2. Se agrupan principalmente según su centro catalítico, la dependencia de calcio, los sustratos, la localización celular y los puentes disulfuro.²⁵ Las PLA2 secretadas (sPLA2) poseen en el sitio catalítico los aminoácidos histidina y ácido aspártico.¹⁷ Las PLA2 citosólicas (cPLA2) y las independientes de calcio (iPLA2) tienen como centro catalítico una serina nucleofílica.^{20,21} La sPLA2 es una fosfolipasa secretada de bajo peso molecular (~18 kDa), con regulación alostérica y dependiente de calcio en concentraciones milimolares. Sus principales actividades son la reparación de la capa externa de la membrana celular y la liberación de ácido araquidónico (AA). No obstante, dado que no está restringida a un solo tipo de fosfolípidos, permite la generación de ácidos grasos diferentes.¹⁹ Se ha involucrado a la cPLA2 en los recambios de fosfolípidos en las caras internas de la membrana durante su remodelación.⁶⁹

La activación de las PLA2 dependientes de calcio ocurre por dos vías, una denominada apical, mediada por receptores que reconocen mitógenos y receptores de "patrones moleculares asociados a microorganismos".^{18,23,69} La otra vía de activación es la asociada con la isquemia, la reperfusión y, en general, el estrés oxidativo que induce el calcio requerido para la activación de la sPLA2. Estas PLA2, además de la movilización de calcio, requieren la activación concomitante de las MAPK (por la sigla en inglés de *mitogen activated protein kinases*) para mediar la liberación de AA.^{17,67} Más adelante, cuando las bombas iónicas dejan de funcionar y aumenta la concentración intracelular de calcio, se favorece la activación de cPLA2 que, junto con sPLA2, puede ser directamente responsable de los daños en la membrana celular.⁶⁹

Si además hay aumento de ROS y estrés oxidativo, los fosfolípidos con cadenas carbonadas poliinsaturadas son blancos de la peroxidación,²³ se inducen cambios conformacionales y se pierde la actividad intrínseca de la cPLA2 para reparar la membrana. En presencia de calcio la cPLA2 media la hidrólisis del fosfolípido dañado produciendo la liberación de un ácido graso peroxidado y un lisofosfolípido, el cual se queda en la membrana formando un espacio entre los fosfolípidos, para ser

posteriormente reparado por otras enzimas responsables de su realquilación.^{25,70} Cuando hay liberación de ácidos grasos peroxidados, estos actúan como agentes oxidantes que aumentan la cantidad de reacciones entre los fosfolípidos y los oxidantes preexistentes, con la consecuencia de incrementar el daño de la membrana celular.⁶³ Por ello se plantea que estas enzimas podrían ser mediadoras y propagadoras del daño de las membranas favoreciendo su ruptura independientemente de la presencia del ATP.

Proteasas

Las calpaínas son proteasas de cisteína dependientes de calcio, que se pueden dividir en dos subfamilias de acuerdo con las concentraciones de este ion necesarias para su activación: micromolares para las μ -calpaínas y milimolares para las m-calpaínas.^{5,15,44,61,63} Juegan un papel importante en la propagación, migración y muerte celular programada, y en la progresión del ciclo celular. Mediante la escisión de sus zimógenos pueden activar factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, quininas y proteínas proapoptóticas.⁶³

En el modelo de la isquemia, en el que no hay una regulación evidente del calcio, las calpaínas que se localizan en la membrana lisosomal pueden alterar su integridad y favorecer la liberación de catepsinas del lisosoma al citosol, que a su vez hidrolizan diferentes proteínas celulares, desencadenando necrosis.^{5,63} La participación de las calpaínas y las catepsinas en la inducción de muerte celular se ha evaluado en diferentes modelos.^{5,15,44,61,63} La degeneración neuronal por necrosis en *C. elegans* requiere proteasas reguladas por calcio, las calpain-proteasas (designadas como *Calpain 1-10; CAPN 1-10*) y las aspartil proteasas que son una familia más heterogénea; esto demuestra que en este modelo hay dos clases de proteasas involucradas en la necrosis, que son homólogas de las calpaínas y catepsinas en humanos, en los que pueden mediar la necrosis.¹⁰

El aumento de calcio por la pérdida del control de las bombas puede alterar la función de enzimas como las ATPasas, que al estar activadas sin limitar su cofactor contribuyen a la supresión o agotamiento brusco del ATP; además, favorece la actividad de fosfolipasas y media la activación de proteasas y de endonucleasas responsables de la fragmentación de la cromatina y del ADN.^{1,2,8,14,15,37,46}

NECROSIS Y SUS IMPLICACIONES EN EL SISTEMA INMUNE

Las células del sistema mononuclear fagocítico reconocen y fagocitan las células muertas, que son procesadas por enzimas hidrolíticas en el fagolisosoma, y sirven para el proceso de presentación antigenica. Mientras el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos induce la activación alternativa de los fagocitos, o sea, para producir mediadores que inhiben la inflamación,⁷¹ en la necrosis, además de ser un mecanismo de reconocimiento menos eficiente, da lugar a una respuesta inflamatoria localizada o sistémica. El reconocimiento de los productos de la necrosis ocurre después de la pérdida de la integridad de la membrana, lo cual indica que ya todos los componentes intracitoplasmáticos se encuentran en el medio extracelular y pueden inducir diversas respuestas en el tejido afectado; es así como las células necróticas pueden liberar ácido úrico que induce IL-1 β y proteínas de choque térmico como Hsp70 y Hsp90 (por la sigla en inglés de *heat shock proteins*). Hay señales por receptores de tipo Toll que reconocen lípidos y ácidos nucleicos modificados. Las células necróticas también pueden activar el factor nuclear kB (NF-kB, por la sigla en inglés de *nuclear factor*) en fagocitos mononucleares, neutrófilos y células dendríticas y estimular la producción de IL-6, IL8 y TNF- α . Las proteínas de choque térmico pueden inducir tanto la expresión de genes involucrados en la inflamación como la de genes reparadores de tejido como el *Factor de crecimiento endotelial vascular*.⁷² Como se ha mencionado, la necrosis se asocia con la patogénesis de enfermedades como EPOC, LES, degeneración neuronal, renal, hepática y pancreática, debidas a muchos agentes etiológicos, en las que es común encontrar alteraciones en la utilización de nutrientes y de oxígeno. También en enfermedades infecciosas como la tuberculosis cuyas lesiones necróticas pueden fusionarse y dar lugar a diseminación cuando se rompen los tabiques de fibrina.

CONCLUSIONES

La necrosis es un evento cuyas vías de señalización no parecen depender del esquema de mensajeros en respuesta a un ligando sino que pueden ir desde la regulación alostérica sobre enzimas efectoras hasta modificaciones estructurales que afecten su función y su especificidad de sustratos. Diferentes eventos pueden

desencadenarla y ya se empieza a replantear la supresión o agotamiento súbito del ATP como el fenómeno crítico inicial. Durante la reperfusión de los tejidos isquémicos, la peroxidación de los lípidos en presencia de Ca^{+2} puede inducir la hiperactivación de las sPLA₂, de proteasas y de endonucleasas. El Ca^{+2} modera un equilibrio sutil entre la reparación y la ruptura de las membranas celulares, así como el daño y la reparación del ADN. La oxidación, independiente del ATP, puede ser responsable de las modificaciones que llevan a coagulación y desnaturalización de proteínas, las cuales deben ser favorecidas por la disminución del pH que ocurre durante la glicólisis. Independientemente del ATP, la convergencia de señales antiapoptóticas y proapoptóticas inicia la necrosis durante infecciones como la inducida por *M. tuberculosis*.

Contrariamente a la idea primigenia esencial de la caída del ATP para activar la muerte, y la actividad enzimática observada post mórtem para generar las características secundarias de la necrosis sin inversión de ATP, esta puede iniciarse desde antes de la muerte celular como efecto de la acumulación de eventos deletéreos. La activación

de una u otra vía efectora dependerá de la función celular intrínseca *in vivo*. Así la especialidad funcional de una célula *in vivo* puede hacer, metafóricamente hablando, parte de las dagas requeridas para la ejecución de la muerte.

Por lo tanto, es necesario replantear la idea de que la necrosis solo se puede identificar por los cambios morfológicos y por la reacción inflamatoria localizada en el tejido. Ahora se conocen varios mediadores que pueden estar favoreciendo su aparición (figura n.º 1) lo que propicia el estudio y la exploración más detallados para la comprensión de este fenómeno celular y tisular que favorece la aparición de enfermedades degenerativas y la propagación de infecciones. En general, todos los tipos de muerte celular participan en procesos tanto fisiológicos como patológicos; todo depende del escenario biológico en el que tengan lugar o de las alteraciones que se den en la secuencia de eventos. Pueden, en un mismo ambiente coexistir, pues, concentraciones locales de diferentes mediadores generando las zonas de riesgo isquémico.

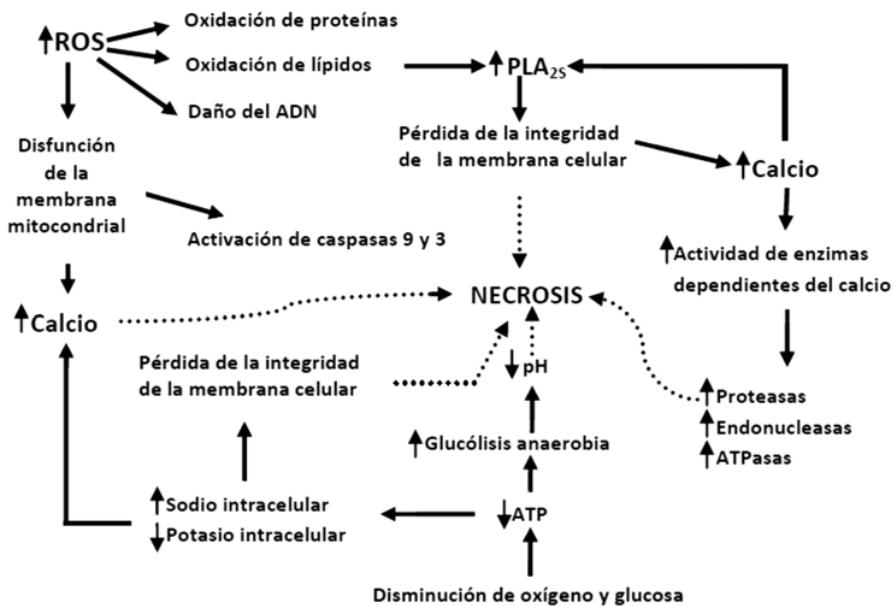


Figura n.º 1. Eventos celulares que pueden desencadenar necrosis. Las flechas punteadas indican la fase irreversible de necrosis. Las flechas negras gruesas indican las vías intermedias y la interacción con otras vías. Las flechas delgadas indican el aumento o disminución del intermediario. Los ROS pueden inducir daño en diversos blancos celulares, y promover daño indirecto y directo del ADN. La caspasa 3^{53,54} se ha asociado con la necrosis pero, probablemente, su efecto sobre las ATP-asas hace que después de iniciada la apoptosis se desvíe hacia la necrosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 1004-1010.
2. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2009; 16: 3-11.
3. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005; 73: 1907-1916.
4. Halestrap A. Biochemistry: a pore way to die. *Nature* 2005; 434: 578-579.
5. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 37-45.
6. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; 290: 1717-1721.
7. Mortimore GE, Poso AR. Lysosomal pathways in hepatic protein degradation: regulatory role of amino acids. *Fed Proc* 1984; 43: 1289-1294.
8. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. 2000. Robbins Patología Estructural y Funcional, 6^a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2000: 5-45.
9. Nakamura U, Iwase M, Uchizono Y, Sonoki K, Sasaki N, Imoto H, et al. Rapid intracellular acidification and cell death by H₂O₂ and alloxan in pancreatic beta cells. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 2047-2055.
10. Syntichaki P, Samara C, Tavernarakis N. The vacuolar H⁺-ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Curr Biol* 2005; 15: 1249-1254.
11. Skulachev VP. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 473-485.
12. Wochna A, Niemczyk E, Kurono C, Masaoka M, Majczak A, Kedzior J, et al. Role of mitochondria in the switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis. Studies on rho0 cells. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2005; 54: 127-138.
13. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Herman B. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997; 174: 159-165.
14. Vandenabeele P, Declercq W, Berghe TV. Necrotic cell death and 'necrostatins': now we can control cellular explosion. *Trends Biochem Sci* 2008; 33: 352-355.
15. Vanlangenakker N, Berghe TV, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med* 2008; 8: 207-220.
16. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 1208-1214.
17. Bahnsen BJ. Structure, function and interfacial allosterism in phospholipase A2: insight from the anion-assisted dimer. *Arch Biochem Biophys* 2005; 433: 96-106.
18. Caro AA, Cederbaum AI. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 364-375.
19. Cho W. Structure, function, and regulation of group V phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 48-58.
20. Dessen A. Phospholipase A(2) enzymes: structural diversity in lipid messenger metabolism. *Structure* 2000; 8: R15-R22.
21. Dessen A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 40-47.
22. Duan L, Gan H, Arm J, Remold HG. Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF-alpha in the induction of apoptosis of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Immunol* 2001; 166: 7469-7476.
23. Muralikrishna AR, Hatcher JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 376-387.
24. Perisic O, Fong S, Lynch DE, Bycroft M, Williams RL. Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1998; 273: 1596-1604.
25. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 1-19.
26. Yu BZ, Pan YH, Janssen MJ, Bahnsen BJ, Jain MK. Kinetic and structural properties of disulfide engineered phospholipase A2: insight into the role of

- disulfide bonding patterns. *Biochemistry* 2005; 44: 3369-3379.
27. Martín-Oliva D, Aguilar-Quesada R, O'Valle F, Muñoz-Gámez JA, Martínez-Romero R, García del Moral A, et al. Inhibition of Poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation during skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66: 5744-5756.
 28. Roach HI, Clarke NM. Physiological cell death of chondrocytes *in vivo* is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82: 601-613.
 29. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 14080-14085.
 30. Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun* 2007; 29: 303-309.
 31. Martin DN, Baehrecke EH. Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development* 2004; 131: 275-284.
 32. Mortimore GE, Poso AR. The lysosomal pathway of intracellular proteolysis in liver: regulation by amino acids. *Adv Enzyme Regul* 1986; 25: 257-276.
 33. Krick R, Muehe Y, Prick T, Bremer S, Schlotterhose P, Eskelinen EL, et al. Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 4492-4505.
 34. Sakai Y, Koller A, Rangell LK, Keller GA, Subramani S. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates. *J Cell Biol* 1998; 141: 625-636.
 35. Cardenas-Aguayo MC, Santa-Olalla J, Baizabal JM, Salgado LM, Covarrubias L. Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12: 735-748.
 36. Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci* 2006; 119 (Pt 2): 259-270.
 37. Reimer KA. The slowing of ischemic energy demand in preconditioned myocardium. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 793: 13-26.
 38. Konya A, Van Pelt CS, Wright KC. Ethiodized oil-ethanol capillary embolization in rabbit kidneys: temporal histopathologic findings. *Radiology* 2004; 232: 147-153.
 39. Cromeens DM, Price RE, Johnson DE. Pathologic changes following transurethral canine prostatectomy with a cylindrically diffusing fiber. *Lasers Surg Med* 1994; 14: 306-313.
 40. Burge SM, Ryan TJ. Punched-out porokeratosis. A histological variant of disseminated superficial actinic porokeratosis. *Am J Dermatopathol* 1987; 9: 240-242.
 41. Odaira C, Berger Z, Iovanna JL, Sarles H. Localized necrohemorrhagic pancreatitis in the rat after pancreatic interstitial trypsin injection. Regressive pseudochronic lesions. *Digestion* 1986; 34: 68-77.
 42. Scheppach W, Teschner M, Kirchner T, Schindler C, Franke S, Bodendorfer G, et al. [Acute pancreatitis and stomach wall necrosis caused by cholesterol embolisms]. *Dtsch Med Wochenschr* 1993; 118: 13-18.
 43. Baumann B, Wagner M, Aleksic T, von WG, Weber CK, Adler G, et al. Constitutive IKK2 activation in acinar cells is sufficient to induce pancreatitis *in vivo*. *J Clin Invest* 2007; 117: 1502-1513.
 44. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandebaele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 356-370.
 45. Mariadason JM, Rickard KL, Barkla DH, Augenlicht LH, Gibson PR. Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. *2000; J Cell Physiol* 183: 347-354.
 46. Barkla DH, Gibson PR. The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology* 1999; 31: 230-238.
 47. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 185: 1481-1486.
 48. Hetz CA, Hunn M, Rojas P, Torres V, Leyton L, Quest AF. Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J Cell Sci* 2002; 115: 4671-4683.
 49. Villena J, Henriquez M, Torres V, Moraga F, Diaz-Elizondo J, Arredondo C, et al. Ceramide-induced

- formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1146-1160.
50. Vogt AM, Ackermann C, Yildiz M, Schoels W, Kubler W. Lactate accumulation rather than ATP depletion predicts ischemic myocardial necrosis: implications for the development of lethal myocardial injury. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1586: 219-226.
 51. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 143-183.
 52. Kriska T, Korytowski W, Girotti AW. Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinate-treated tumor cells. *Arch Biochem Biophys* 2005; 433: 435-446.
 53. Perskvist N, Long M, Stendahl O, Zheng L. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol* 2002; 168: 6358-6365.
 54. Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 2000; 28: 285-296.
 55. Simon F, Varela D, Riveros A, Eguiguren AL, Stutzin A. Non-selective cation channels and oxidative stress-induced cell swelling. *Biol Res* 2002; 35: 215-222.
 56. Kuo TH, Tsang W, Wiener J. Defective Ca²⁺-pumping ATPase of heart sarcolemma from cardiomyopathic hamster. *Biochim Biophys Acta* 1987; 900: 10-16.
 57. Barros LF, Stutzin A, Calixto A, Catalan M, Castro J, Hetz C, et al. Nonselective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis. *Hepatology* 2001; 33: 114-122.
 58. Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 29: 1-14.
 59. McConkey DJ. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Scanning Microsc* 1996; 10: 777-793.
 60. McConkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells* 1996; 14: 619-631.
 61. Bianchi L, Gerstbrein B, Frokjaer-Jensen C, Royal DC, Mukherjee G, Royal MA, et al. The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation. *Nat Neurosci* 2004; 7: 1337-1344.
 62. Chiang WC, Chen YM, Lin SL, Wu KD, Tsai TJ. Bradykinin enhances reactive oxygen species generation, mitochondrial injury, and cell death induced by ATP depletion: a role of the phospholipase C-Ca(2+) pathway. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 702-710.
 63. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev* 2003; 83: 731-801.
 64. Hughes MN. Chemistry of nitric oxide and related species. *Methods Enzymol* 2008; 436: 3-19.
 65. Glukhov IL, Sirota NP, Kuznetsova EA. DNA damage in human mononuclear cells induced by bacterial endotoxin. *Bull Exp Biol Med* 2008; 146: 301-303.
 66. Celik H, Arinc E. Bioreduction of idarubicin and formation of ROS responsible for DNA cleavage by NADPH-cytochrome P450 reductase and its potential role in the antitumor effect. *J Pharm Pharm Sci* 2008; 11: 68-82.
 67. Murakami M, Kudo I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 3-35.
 68. Blamey CJ, Ceccarelli C, Naik UP, Bahnsen BJ. The crystal structure of calcium- and integrin-binding protein 1: insights into redox regulated functions. *Protein Sci* 2005; 14: 1214-1221.
 69. Lambert IH, Pedersen SF, Poulsen KA. Activation of PLA2 isoforms by cell swelling and ischaemia/hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; 187: 75-85.
 70. Chakraborti S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. *Cell Signal* 2003; 15: 637-665.
 71. Weigert A, Johann AM, von KA, Schmidt H, Geisslinger G, Brune B. Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate 3. *Blood* 2006; 108: 1635-1642.
 72. Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouazaz F, et al. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 2001; 166: 7128-7135.