

## Mecanismos de muerte celular y relevancia en hepatología

J.C. Fernández-Checa

Unidad de Hepatología. Institut de Malalties Digestives. Hospital Clínic. IDIBAPS. Barcelona.  
Departamento de Patología Experimental. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.  
Barcelona. España.

### INTRODUCCIÓN

La muerte celular es un proceso dinámico que refleja la pérdida de una guerra estratégica entre factores de supervivencia y señales citotóxicas. Existen diversas formas de muerte celular según el tipo de célula, la apariencia morfológica de diversos compartimentos subcelulares y el estímulo que la induce, así como los mecanismos causales. Además de la apoptosis y la necrosis, la autofagia y la denominada catástrofe mitótica presentan características morfológicas propias, con presencia de autofagosomas o vacuolas autofágicas y de micronúcleos o multinucleación, respectivamente. Por otra parte, aunque la anoikis transcurre con características similares a la apoptosis, es inducida específicamente por la pérdida de enclaje de una célula a su soporte o a otras células, mientras que la degeneración walleriana o la cornificación (también conocida como queratinización) se han descrito en células del sistema nervioso y en la epidermis, respectivamente.

La apoptosis ha recibido especial atención entre los investigadores a partir de su redescubrimiento en 1972, debido a su relevancia en el desarrollo de diversas patologías. Desde entonces, el progreso en los últimos años en la identificación y caracterización de los mecanismos bioquímicos que la regulan ha sido espectacular. Esta forma de muerte celular está caracterizada por una condensación de la cromatina, degradación internucleosomal del ADN, reducción del volumen celular y mantenimiento de la barrera de la membrana plasmática, al menos al inicio del proceso, sin apenas modificación ultraestructural de compartimentos subcelulares. Por otra parte, la permeabilización por rotura de la membrana plasmática, con la consecuente liberación al medio extracelular de componentes celulares (enzimas, p. ej., ALT, AST, LDH) y la tinción nuclear con sondas vitales, normalmente excluidas en células viables, caracterizan la muerte necrótica o necrosis.

Si bien las caspasas (proteasas que se activan durante la apoptosis) determinan el fenotipo apoptótico con la degradación de la cromatina y el ADN, estas características también pueden ocurrir en ausencia de activación de las caspasas. Sin embargo, a pesar de estas distintas características morfológicas, la apoptosis y la necrosis comparten mecanismos comunes como la permeabilización de la membrana mitocondrial (PMM). En la apoptosis, la permeabilización de la mitocondria precede a la liberación desde el espacio intermembranal de proteínas proapoptóticas que activan las caspasas; en la necrosis, este proceso contribuye a la disfunción metabólica y la pérdida de adenosintrifosfato (ATP), lo que impide el ensamblaje del apoptosoma. Por tanto, la consecuencia final de la PMM (apoptosis respecto a necrosis) está determinada fundamentalmente por el estado energético de la célula y la concentración de ATP. Aunque la mitocondria es clave en el control de la muerte celular, otros compartimentos subcelulares –como los lisosomas, el retículo endoplásmico, la membrana plasmática y el núcleo– también la regulan, y se establecen vías de comunicación entre estos compartimentos y la mitocondria<sup>1</sup>.

En la presente revisión se analiza brevemente los mecanismos fundamentales de muerte celular, con especial detenimiento en la muerte inducida por los ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), dada la relevancia de la sobreproducción de TNF en hepatología. Un mejor conocimiento de estos procesos puede proporcionar estrategias eficaces para disminuir la muerte hepatocelular que contribuye al desarrollo de afecciones como la esteatohepatitis (alcohólica y no alcohólica o isquemia/reperfusión), mientras que, en el caso del carcinoma hepatocelular, el objetivo sería diseñar pautas para incrementar la muerte o disminuir la resistencia de las células tumorales a las actuales terapias.

### RUTAS INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA DE ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS

Las caspasas son una familia de proteasas especializadas que hidrolizan proteínas diana específicas en una secuencia

Correspondencia: Dr. J.C. Fernández-Checa.  
Unidad de Hepatología. Institut de Malalties Digestives. Hospital Clínic.  
Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España.  
Correo electrónico: checa229@yahoo.com

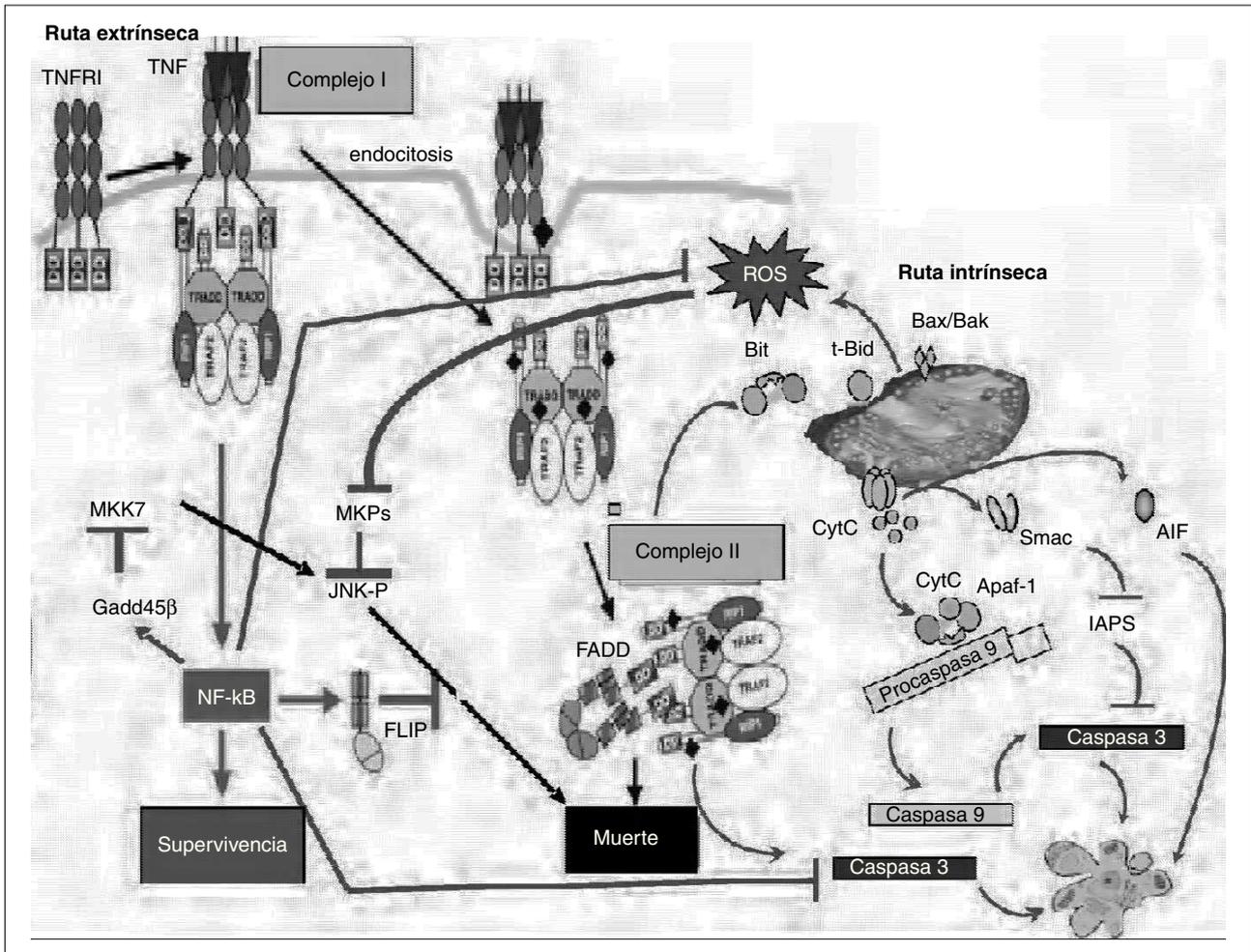


Fig. 1. Rutas intrínseca y extrínseca de activación de las caspasas y la señalización intracelular de TNF. La translocación de Bax y Bak a la membrana mitocondrial externa de la mitocondria causada por diversos estímulos (p. ej. estrés, daño al DNA, inducción de p53) induce la permeabilización de la mitocondria y la consecuente liberación al citosol de proteínas proapoptóticas como el citocromo c, que participa en el ensamblaje del apoptosoma y la activación de la caspasa 3, origen del fenotipo apoptótico. En ciertos tipos celulares (células tipo I), la unión del TNF al receptor TNFR1 induce una cascada de activación de caspasas por proteólisis controlada por la formación de sendos complejos con diferentes funciones. Mientras que la formación intracelular del complejo II estimula la activación de caspasa 8, que a su vez actúa en la procaspasa 3 y la activa, el complejo I formado en la membrana celular activa el NF-κB y promueve la supervivencia celular por la expresión de proteínas que contrarrestan diversas rutas proapoptóticas. En hepatocitos (y células tipo II), el complejo II y la activación de la caspasa 8 son insuficientes para activar la caspasa 3. En estas células, la caspasa 8 recluta la participación de la mitocondria (ruta intrínseca) a través de la proteólisis de Bid, cuyo fragmento tBid se transloca a la membrana externa y estimula la oligomerización de Bax/Bak y libera el citocromo c. Junto con esta proteína mitocondrial, también se liberan otras, Smac/DIABLO, AIF, que promueven la apoptosis por diferentes mecanismos. Junto con la activación de caspasas, el TNF también estimula la sobreproducción de ROS de origen mitocondrial, que a su vez favorece la activación sostenida de JNK, y contribuye a la muerte celular.

característica, que se encuentran normalmente inactivas en la célula en forma de zimógenos y se activan mediante la proteólisis controlada por otras caspasas<sup>2</sup>. Dependiendo de su acción sobre dianas determinantes del fenotipo apoptótico o en la activación de otras caspasas, éstas se clasifican en caspasas reguladoras o iniciadoras (*upstream*; p. ej., la caspasa 8) y caspasas ejecutoras (*downstream*; p. ej., la caspasa 3). La mitocondria es esencial en la regulación de la muerte celular. Dicha acción fue consolidada en 1996 cuando Wang et al describieron que el citocromo c activa la caspasa 3 en extractos citosólicos<sup>3,4</sup>. En trabajos posteriores se caracterizó el denominado apoptosoma mitocondrial, formado por la interacción del citocromo c libera-

do desde el espacio intermembranal de la mitocondria con el factor citosólico apaf-1, la procaspasa 9 y ATP. La formación de dicho complejo resulta en la activación de la caspasa 9, que a su vez, mediante una proteólisis controlada de la procaspasa 3, da lugar a su activación y actúa contra dianas específicas que determinan el fenotipo apoptótico (fig. 1). Así, las caspasas ejecutoras activan la ADNasa activada por caspasa (CAD) mediante la degradación e inactivación de su inhibidor constitutivo (ICAD), lo que da lugar a la degradación internucleosomal del ADN. Aunque esta acción constituye el paradigma de la apoptosis, la mitocondria libera otras proteínas que, como el citocromo c, se encuentran normalmente recluidas en el espacio inter-

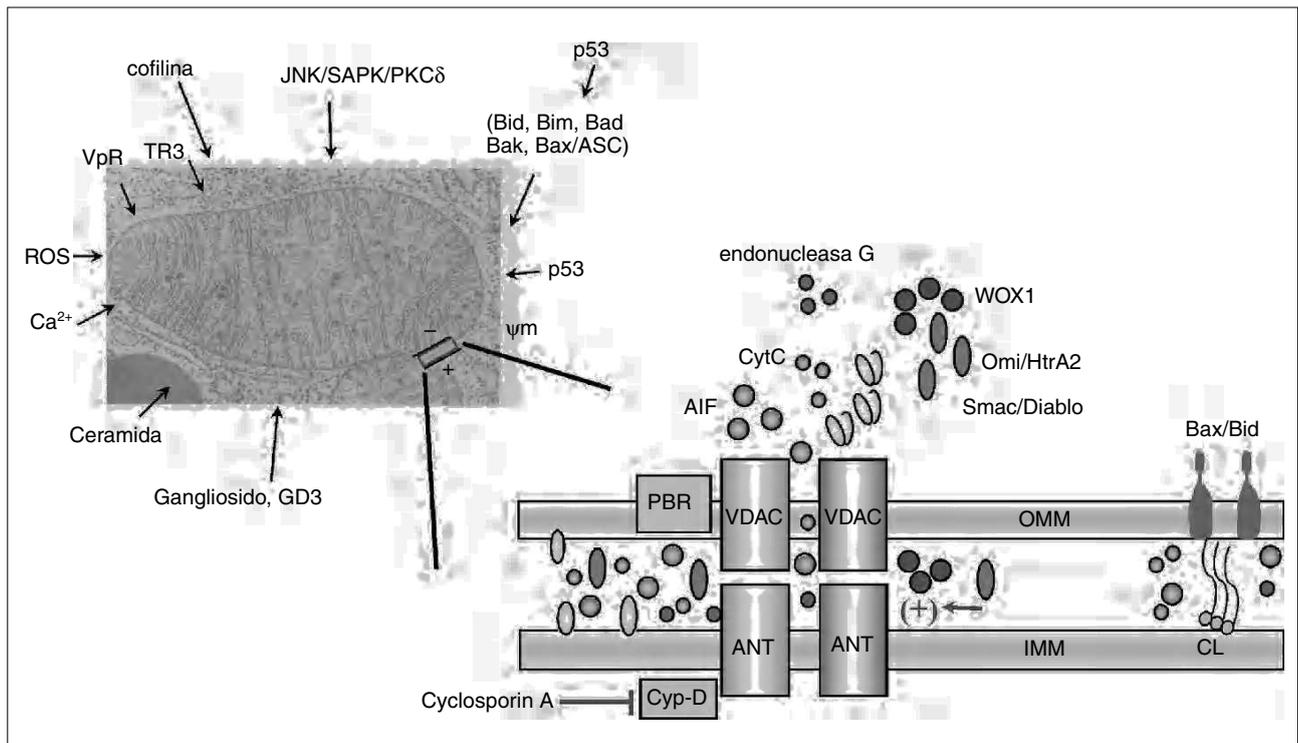


Fig. 2. Permeabilización mitocondrial. Múltiples estímulos actúan en la mitocondria y favorecen la liberación de las proteínas proapoptóticas del espacio intermembranal. Además de los miembros de bcl-2 con función proapoptótica (Bax/Bak/Bid), otras proteínas como factores de transcripción (TR3, p53), enzimas de señalización (JNK, PKCδ), proteínas virales (VpR), ROS, Ca<sup>2+</sup>, y lípidos como la ceramida y el gangliósido GD3 inducen la permeabilización mitocondrial. Además de citocromo c y Smac/DIABLO que activan las caspasas, otras proteínas también liberadas promueven la muerte celular independientemente de las caspasas, como AIF, Omi/HtrA2 y endonucleasa G. La caracterización de los inductores de la permeabilización mitocondrial y del mecanismo de liberación de proteínas mitocondriales es de relevancia en medicina y en hepatología, lo que podría permitir diseñar tratamiento más eficaces para enfermedades como la esteatohepatitis (alcohólica y no alcohólica), las hepatitis virales, la isquemia/reperfusión o el carcinoma hepatocelular.

membranal y promueven la muerte celular, como por ejemplo el factor de inducción de la apoptosis (AIF) y la endonucleasa G, que inducen la rotura del ADN independientemente de caspasas, Smac/DIABLO y Omi/HtrA2, que promueven la muerte celular mediante la inactivación de los denominados inhibidores de apoptosis (IAPs). La activación de las caspasas ejecutoras puede ocurrir mediante 2 procesos, denominados intrínseco y extrínseco. En el primero, señales generadas intracelularmente (p. ej., miembros de la familia del Bcl-2, Bax, Bak, Bid, Puma, Noxa) actúan en la mitocondria favoreciendo la PMM y la liberación de citocromo c, con la consiguiente activación de la caspasa 3. Por otra parte, cuando los ligandos de la familia del TNF (p. ej., TNF, Fas, TRAIL, etc.) se unen a sus correspondientes receptores, inducen una intrincada red de señalización que finalmente conduce a la activación de las caspasas reguladoras, como la caspasa 8, que puede ser suficiente, en ciertos tipos de células, para la activación de la caspasa 3 (fig. 1). Mientras que en células denominadas tipo I (p. ej., los linfocitos) la unión del TNF o Fas a sus receptores es suficiente para la activación de la caspasa 3 vía caspasa 8, en las células tipo II, como los hepatocitos, la activación de la caspasa 8 por estos ligandos no lo es, y se necesita la participación de la mitocondria. En este tipo de células las rutas extrínseca e intrínseca

colaboran en la activación de la caspasa 3. Este proceso se establece mediante Bid, uno de los miembros proapoptóticos de Bcl-2. La activación de la caspasa 8 por TNF induce una proteólisis parcial en Bid y genera un fragmento truncado de Bid (tBid), el cual experimenta una translocación a la mitocondria y promueve la oligomerización de Bax/Bak en la membrana externa de la mitocondria, lo que resulta en la PMM y la liberación de citocromo c, el ensamblaje del apoptosoma, la activación de la caspasa 3 y la apoptosis hepatocelular (fig. 1). Además de Bax/Bak, existe una variedad de agentes que convergen en la mitocondria y estimulan la liberación de proteínas proapoptóticas (fig. 2). Así, no sólo por la acción de ciertas proteínas, como proteínas virales (VpR), factores de transcripción (p53) o cinasas (JNK), sino también factores como el incremento de Ca<sup>2+</sup>, la generación de ROS y lípidos, como la ceramida y el gangliósido GD3<sup>5</sup>, interaccionan con la mitocondria e inducen la liberación de citocromo c, lo que da lugar a la activación de las caspasas.

### MECANISMOS DE PERMEABILIZACIÓN MITOCONDRIAL Y LIBERACIÓN DE CITOCROMO C

Si bien la PMM es esencial para la liberación del citocromo c al citosol, los mecanismos de este proceso no son

del todo conocidos. La membrana mitocondrial externa constituye una barrera física en la liberación mitocondrial del citocromo c en respuesta a estímulos apoptóticos, y su rotura es necesaria para este proceso. La evidencia actual indica la existencia de 2 mecanismos de rotura y/o permeabilización de la membrana mitocondrial externa. En el primero, factores como Bid o Bax, tras su translocación y oligomerización en la membrana mitocondrial externa, formarían poros para permitir la conducción del citocromo c al espacio citosólico. Dicho modelo es coherente con la estructura de Bid/Bax y su similitud estructural con porinas citotóxicas. Recientes estudios que han utilizado liposomas de composición semejante a la de la membrana mitocondrial han indicado la necesidad de la cardiolipina, un fosfolípido aniónico presente exclusivamente en la mitocondria, para la acción permeabilizante de Bid/Bax<sup>6</sup>. Una de las consecuencias de este modelo, aparte de la formación de poros de tamaño suficiente para la movilización de macromoléculas como el citocromo c o Smac/DIABLO, sería el mantenimiento de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial. Datos recientes indican la formación de canales de Bax en la membrana mitocondrial externa, necesaria para la apoptosis neuronal en un modelo de isquemia global en el cerebro, y como inhibidores sintéticos de dichos canales previenen la formación del apoptosoma mitocondrial sin alterar la translocación, inserción y oligomerización de Bax en la membrana externa<sup>7</sup>. A pesar de dichas observaciones, la naturaleza del canal que se formaría en la membrana mitocondrial externa para la liberación de citocromo c al citosol es desconocida. De hecho, una alternativa al canal de liberación de citocromo c por Bax sería la formación de canales lipídicos (ceramida, esfingosina y gangliósido GD3), que aumentarían progresivamente de tamaño en la membrana externa en respuesta a estímulos apoptóticos<sup>8-11</sup>. Por otra parte, la inducción de la denominada transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) constituye un modelo alternativo al de la formación de canales específicos en la membrana externa, coherente con múltiples observaciones experimentales<sup>1</sup>. La inducción de la MPT en la membrana interna mitocondrial permitiría la liberación de solutos hasta un peso molecular de 1.500 Da. Esta drástica alteración en la permeabilidad mitocondrial da lugar a la despolarización mitocondrial, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, la consecuente generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la disipación de gradientes iónicos, lo que resulta en un choque osmótico coloidal que culmina con la rotura de la membrana externa, que es incapaz de adaptarse al hinchamiento osmótico de la matriz mitocondrial, y da lugar a la liberación de proteínas del espacio intermembranar al citosol. Como se puede apreciar, las consecuencias en cuanto al ensamblaje del apoptosoma y la activación de las caspasas ejecutoras es equivalente en ambos modelos, si bien la despolarización mitocondrial sería una característica inherente a la inducción de la MPT, pero no así en el caso de la permeabilidad selectiva de la membrana mitocondrial externa. El análisis de las múltiples observaciones realizadas en diferentes contextos indica que am-

bos modelos coexisten y el predominio de uno sobre otro dependería del tipo de célula, el estímulo y su intensidad y/o prolongación. El proceso de la MPT está mediado por un complejo multiproteínico, cuya identidad sólo se conoce parcialmente, constituido en parte por proteínas mitocondriales adyacentes a los sitios de contacto donde las membranas interna y externa de la mitocondria interactúan. Algunos de los constituyentes de la MPT incluyen al translocador de nucleótidos de adenina (ANT), un transportador localizado en la membrana interna de la mitocondria que intercambia ADP por ATP, el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), localizado en la membrana externa de la mitocondria, el receptor periférico de benzodiazepinas que interactúa con VDAC y la ciclofilina D localizada en la cara interna de la membrana interna mitocondrial (fig. 2). La inducción de la MPT por los agonistas, como los ligandos de ANT, produce la despolarización de la mitocondria, generación de ROS, choque osmótico, rotura de la membrana externa con liberación de citocromo c al citosol y ensamblaje del apoptosoma. Por otra parte, los inhibidores de la MPT como la ciclosporina A, por su acción en la ciclofilina D, previenen la MPT y todas las consecuencias adversas esperables de la disfunción mitocondrial, incluidas la liberación de citocromo c y la activación de la caspasa 3. Una de las evidencias más sólidas a favor de este modelo de MPT ha resultado de la generación del ratón deficiente en ciclofilina D<sup>12,13</sup>. Dicho ratón muestra una resistencia a la muerte celular por isquemia/reperfusión en el hígado, el cerebro y el corazón que contrasta con la sensibilidad a la muerte hepatocelular inducida por Bax. Aunque una de las consecuencias de la inducción de la MPT es la sobreproducción de ROS secundaria a la perturbación de la fosforilación oxidativa, la generación de ROS mitocondrial induce la MPT y resulta en la liberación de citocromo c al citosol y la activación del apoptosoma<sup>14</sup>. El pretratamiento con antioxidantes previene la MPT inducida por el anión superóxido y la consecuente liberación de citocromo c y activación de caspasa 3. De igual forma, el uso de antioxidantes es eficaz en la protección hepatocelular contra la apoptosis/necrosis inducida por TNF<sup>15,16</sup>, de relevancia en diversas afecciones como la esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica y el daño hepático por isquemia/reperfusión.

## CONTROL ENERGÉTICO DE LA MUERTE CELULAR

Como se ha indicado anteriormente, la apoptosis y la necrosis son dos extremos de muerte celular con características morfológicas y bioquímicas propias. Sin embargo, ambas formas no son excluyentes y concurren frecuentemente en un determinado tipo de célula. Por ejemplo, la muerte hepatocelular inducida por TNF transcurre con condensación de la cromatina, activación de caspasas, degradación del ADN y externalización de fosfatidilserina (lo que sería coherente con una muerte apoptótica) y también con la permeabilización de la membrana plasmática y tinción con sondas vitales y liberación de enzimas al medio extracelular (coherente con la necrosis)<sup>15</sup>. Esto

implica la existencia de mecanismos comunes y de factores que controlan ambas formas de muerte celular. Como la activación de las caspasas contribuye, aunque no de manera exclusiva, a la apoptosis, factores que regulan dicha activación determinarían el equilibrio entre la apoptosis y la necrosis en respuesta a un determinado estímulo. En la ruta intrínseca, la activación del apoptosoma mitocondrial requiere la presencia de (d)ATP para el ensamblaje del complejo Apaf-1/procaspasa-9/citocromo c. Aunque el mecanismo del (d)ATP no es del todo conocido, la energía liberada de la hidrólisis del (d)ATP, con la consecuente generación de ADP, induce un cambio en la conformación y la oligomerización de Apaf-1 con la activación de la procaspasa 9 muy rápidamente ( $< 1 \text{ min}$ )<sup>17</sup>. En la ruta extrínseca (inducida por TNF o Fas), el grado de apoptosis depende de la concentración de ATP. Por lo tanto, la carga energética y la concentración de ATP de la célula en el momento en que se induce la ruta intrínseca determinarían si la célula muere por apoptosis o por necrosis. Otro punto en el que la concentración de ATP regula la apoptosis es en el transporte al núcleo de factores citoplásmicos como CAD<sup>17</sup>. Por otra parte, las caspasas poseen cisteínas en su centro activo y, por tanto, el entorno oxidativo de la célula puede controlar la actividad de las caspasas y, por consiguiente, de la apoptosis<sup>18</sup>. Esta característica tiene importantes implicaciones terapéuticas, y es fundamental determinar si cierto estímulo apoptótico induce o no un incremento de ROS, puesto que la inhibición de las caspasas sólo favorecería la muerte necrótica en vez de la apoptosis<sup>19</sup>.

#### **MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA DEPENDIENTES DE NF- $\kappa$ B.**

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción fundamental en la inflamación, la inmunidad y la supervivencia celular. En condiciones basales, el NF- $\kappa$ B está retenido en el citosol en su forma inactiva gracias a su asociación con su inhibidor endógeno I $\kappa$ B, que experimenta una rápida degradación en respuesta a múltiples estímulos, lo que resulta en la translocación al núcleo de sus miembros activos. Este proceso requiere la fosforilación de I $\kappa$ B por el complejo I $\kappa$ B cinasa (IKK), constituido por 3 subunidades, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y IKK $\gamma$  (también conocida como NEMO). A pesar de las similitudes estructurales y bioquímicas de las subunidades catalíticas de IKK $\alpha$  y IKK $\beta$ , ambas poseen funciones fisiológicas distintas. Mientras que IKK $\beta$  es esencial en la degradación de I $\kappa$ B, con la consiguiente activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a estímulos proinflamatorios, IKK $\alpha$  induce una ruta alternativa de activación consistente en el procesamiento proteolítico del precursor NF- $\kappa$ B2/p100, que participa fundamentalmente en la maduración de células B y la formación de órganos linfoides secundarios<sup>20</sup>. Además de su papel en el control de la inflamación y la inmunidad, el NF- $\kappa$ B induce la expresión de proteínas con función antiapoptótica. Por ejemplo, el ratón deficiente en p65, uno de los componentes vitales de NF- $\kappa$ B, muere durante el desarrollo embrionario debido a una destrucción masiva del hígado fetal<sup>21</sup>. Desde

estas observaciones iniciales, se ha reconocido que el NF- $\kappa$ B es un factor esencial en la inducción de múltiples genes antiapoptóticos que antagonizan diversas etapas de la cascada apoptótica, como por ejemplo Bcl-XL, Mcl-1, c-IAP1, c-IAP2, A1/Bfl1, GADD45 $\beta$ , o enzimas antioxidantes como Mn-SOD y la cadena pesada de la ferritina (FHC)<sup>3,22</sup>. La activación de NF- $\kappa$ B es esencial en la susceptibilidad hepatocelular a la muerte inducida por TNF. La señalización intracelular del TNF, y de otros miembros de la familia, como por ejemplo TRAIL o Fas, es un proceso complejo que incluye la interacción proteína-proteína y la formación de plataformas de señalización segregadas en distintos complejos que se inician tras la unión del TNF a su receptor de membrana TNFR1 (fig. 1). Mientras que la formación intracelular del complejo II, después de su disociación del TNFR1, es esencial para la activación de caspasas 8/10, el complejo I formado en la membrana plasmática induce la activación del NF- $\kappa$ B, que protege al hepatocito frente a las señales citotóxicas, de distintas maneras (véase fig. 1). El NF- $\kappa$ B es tan esencial en la supervivencia del hepatocito que su inhibición selectiva previa es suficiente para sensibilizar al hepatocito a la acción de los ligandos de la familia del TNF. Este mecanismo antiapoptótico del NF- $\kappa$ B contribuye a fenómenos de resistencia tumoral al tratamiento del cáncer. Algunas estrategias antitumorales de relevancia clínica (agentes quimioterapéuticos, radiación ionizante) activan el NF- $\kappa$ B en un breve lapso y evitan la muerte de las células tumorales<sup>23</sup>. Por tanto, elucidar el mecanismo de la muerte hepatocelular por TNF a pesar de la activación del NF- $\kappa$ B y prevenir dicho proceso es de gran interés y relevancia por sus implicaciones clínicas en situaciones como la esteatohepatitis, la infección viral o la isquemia/reperfusión.

#### **MUERTE HEPATOCELULAR Y RELEVANCIA EN HEPATOLOGÍA**

Los hepatocitos constituyen al menos dos tercios del hígado y su susceptibilidad a determinados estímulos, en particular al TNF, es de gran relevancia clínica. La sobreproducción de TNF tiene lugar y es fundamental en el desarrollo de diversas enfermedades hepáticas y, por tanto, comprender los mecanismos que desencadenan la muerte hepatocelular por esta citocina puede abrir la puerta a nuevas estrategias terapéuticas. Puesto que la muerte hepatocelular por TNF contribuye a la esteatohepatitis tanto alcohólica (EHA) como no alcohólica (EHNA) y la isquemia/reperfusión, el objetivo final es reducir la susceptibilidad del hepatocito al TNF. Por el contrario, en el caso del cáncer hepático y del carcinoma hepatocelular, el fin sería diseñar estrategias que permitiesen incrementar la muerte de las células tumorales o promoviesen su susceptibilidad a los actuales tratamientos.

#### **EHA Y EHNA**

Los mecanismos de EHA y EHNA no son del todo conocidos. Aunque la etiología primaria de estas 2 enferme-

dades es diferente, ambas transcurren con características histológicas casi idénticas y consistentes en la esteatosis hepática, la inflamación, la muerte hepatocelular con una marcada susceptibilidad al estrés oxidativo y la fibrosis que puede evolucionar a cirrosis y carcinoma hepatocelular. Se considera que la acumulación lipídica en el citoplasma de los hepatocitos, principalmente en forma de ácidos grasos libres y triglicéridos, es el primer paso en el desarrollo de EHA y EHNA. La lipogénesis y síntesis *de novo* de lípidos que ocurre en ambos casos (EHA y EHNA) son complejas. El alcohol y el acetaldehído en el caso de EHA<sup>24,25</sup> y la resistencia a la insulina y a la hiperrinsulinemia en el de EHNA promueven la activación de los factores de transcripción SREBP-1c y SREBP-2, que inducen el programa genético de síntesis *de novo* de ácidos grasos y colesterol, respectivamente<sup>26-28</sup>. Sin embargo, el progreso de EHA y EHNA más allá de la esteatosis normalmente no ocurre en ausencia de un segundo estímulo que promueva estrés oxidativo, inflamación, muerte hepatocelular y fibrosis. La sobreproducción de citocinas proinflamatorias (p. ej., TNF) y sus correspondientes receptores se han descrito en el desarrollo tanto de EHA como de EHNA<sup>29-32</sup>. En modelos experimentales de EHA, el consumo de alcohol induce una marcada susceptibilidad del hepatocito alcohólico al TNF<sup>33,34</sup> debido a la disminución del GSH mitocondrial (GSHm), descrita por primera vez en 1987<sup>35</sup> y posteriormente confirmada en diversos modelos de toxicidad por alcohol<sup>33,36-43</sup>. Además de la interacción proteína-proteína y la translocación de Bax/Bak a la mitocondria, el TNF genera ceramida por una activación de esfingomielinasas que contribuye a la generación de ROS y el estrés oxidativo mitocondrial<sup>15,16,44</sup>. La disminución de GSHm y la señalización de TNF promueven un entorno oxidativo en la mitocondria e inducen la peroxidación de la cardiolipina que favorece la acción permeabilizante de Bax en la membrana mitocondrial externa<sup>6,45</sup>. La disminución de GSHm por alcohol se debe a la acumulación de colesterol libre en la mitocondria, lo que impide el transporte de GSHm<sup>40,46</sup>. En el caso de EHNA, el mecanismo que desencadena la susceptibilidad del hepatocito graso al TNF y la contribución individual de cada lípido es desconocido. Recientemente hemos observado en modelos nutricionales y genéticos de esteatosis hepática caracterizada por un depósito predominante de triglicéridos, ácidos grasos libres o colesterol, que la acumulación de colesterol libre en la mitocondria determina la disminución de GSHm por un mecanismo similar al descrito en el caso de la EHA y determina la susceptibilidad del hepatocito al TNF<sup>47</sup>. Lo más sorprendente es que, a pesar de la susceptibilidad al TNF por la disminución de GSHm, el NF-κB no se desactiva. Sin embargo, los cambios prooxidativos en la cardiolipina mitocondrial ocurren antes de que NF-κB active los genes antiapoptóticos<sup>45</sup>. Por tanto, en el contexto de EHN y EHNA, las estrategias tendientes a frenar la síntesis y/o el transporte de colesterol a la mitocondria en conjunción con antioxidantes y/o precursores de GSH pueden ser de relevancia en la EHN y la EHNA al aumentar por el GSHm.

### Isquemia/reperfusión

El daño hepatocelular por isquemia/reperfusión está determinado por mecanismos multifactoriales intracelulares e intercelulares no del todo conocidos. Junto con la activación plaquetaria, infiltración de celulares proinflamatorias (linfocitos CD4+ y células de Kupfer), ROS, generación de ceramida o activación de NF-κB, se ha observado que la sobreproducción y señalización vía TNF, pero no de Fas, es fundamental para el daño por isquemia/reperfusión<sup>48</sup>. Puesto que la esfingomielinasa ácida es fundamental en la apoptosis inducida por TNF<sup>15,16</sup>, se ha observado que también lo es esfingomielinasa ácida (ASMasa) en el daño hepatocelular por isquemia/reperfusión<sup>49</sup>. Tras la reperfusión se ha observado una acumulación transitoria de ceramida debido a una activación temprana (15-30 min) de la ASMasa seguida (3-5 h) de la activación de la ceramidasa ácida en un modelo murino de isquemia/reperfusión. La eliminación por ARN de interferencia o la inhibición farmacológica de la ASMasa protegen parcialmente de la isquemia/reperfusión y previene la activación de JNK, una de las dianas de la ceramida, y la translocación de Bim a la mitocondria<sup>49</sup>. Por tanto, la ASMasa constituye un nuevo blanco en las estrategias terapéuticas contra el daño hepatocelular por isquemia/reperfusión, que puede ser de relevancia en situaciones como el trasplante hepático, los traumatismos, el choque hemorrágico o la cirugía hepática.

### Carcinoma hepatocelular

El carcinoma hepatocelular es uno de los cánceres más frecuentes y la tercera causa de mortalidad. Ello se debe a que la mayoría de los pacientes son diagnosticados en estadios intermedios o avanzados y a la falta de un tratamiento efectivo<sup>50</sup>. En parte este problema se plantea por la resistencia de las células tumorales a la muerte celular inducida por la terapia actual. Aunque la radiación ionizante y la quimioterapia activan mecanismos apoptóticos, sus consecuencias se contrarrestan por la activación de mecanismos de supervivencia dependientes de NF-κB inducidos por el propio tratamiento. Dado el papel fundamental de los ligandos de la familia del TNF en la apoptosis, la interrupción de las señales de dichos ligandos es fundamental en la carcinogénesis hepática. De hecho, en los pacientes con carcinoma hepatocelular que no expresan receptor para Fas, el desarrollo del tumor es más agresivo que los tumores que sí lo expresan<sup>51</sup>. Recientemente se ha descrito la inactivación de la caspasa 8 en el modelo murino de carcinoma hepatocelular por la metilación del promotor de la procaspasa 8, que se revierte por la inhibición de la ADN metiltransferasas y la desacetilación de las histonas<sup>52</sup>. La interrupción de la señalización de la caspasa 8 por los ligandos del TNF tiene además consecuencias adicionales en la carcinogénesis<sup>53</sup> y da lugar a una sobreactivación del NF-κB, lo que promovería la supervivencia/resistencia del tumor a la terapia<sup>54</sup>. Por tanto, la inhibición del NF-κB emerge como una diana atractiva para reducir la resistencia o aumentar la apopto-

sis de las células tumorales, particularmente, si la misma estrategia utilizada para la inhibición del NF- $\kappa$ B es además un inductor de apoptosis. En este sentido, el gangliósido GD3 tiene la capacidad de bloquear la translocación al núcleo del NF- $\kappa$ B<sup>23,55</sup>, a la vez que tras su interacción con la mitocondria induce la generación de ROS, la permeabilización mitocondrial, la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas<sup>14,15,19,23,39</sup>. Gracias a esta acción dual, el pretratamiento de líneas celulares de hepatoma humano con GD3 incrementa la apoptosis inducida por radiación ionizante y antraciclinas<sup>23</sup>, lo que sugiere que la expresión selectiva de GD3 en células tumorales podría ser una estrategia para el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Con este objetivo, hemos desarrollado vectores de expresión en los que el promotor de la GD3-sintetasa, la enzima de la síntesis de GD3 a partir de GM3, está flanqueada por elementos sensibles a la hipoxia (HIF). El cultivo de células de hepatoma humano (HepG2, Hep3B) en hipoxia (2% O<sub>2</sub>) induce la expresión de GD3 y sus cantidades tras su transfección con dicho vector<sup>56</sup>. El objetivo final de esta estrategia es aplicarlo en modelos experimentales de carcinoma hepatocelular y convertir el mejor aliado del tumor, la hipoxia, en el estímulo para inducir la expresión de GD3 y sensibilizar las células tumorales a la terapia actual.

#### AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud a la junta de la AEEH por la oportunidad de participar en el primer curso básico de la AEEH. Los trabajos de mi laboratorio referidos en esta revisión no habrían sido posibles sin el esfuerzo y el entusiasmo de los miembros de mi equipo (Dres. C. García-Ruiz, A. Morales, A. Colell, M. Mari y J.M. Lluís), a los que deseo reiterar mi más sincero agradecimiento por las múltiples y continuas discusiones en sesiones de laboratorio.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Lemasters JJ. Dying a thousand deaths; redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis *Gastroenterology*. 2005;129:351-60.
- Salvesen GS, Abrams JM. Caspase activation-stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene*. 2004;12:2774-84.
- Liu X, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell*. 1996;86:147-57.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479-89.
- Fernández-Checa JC. Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochim Biophys Res Commun*. 2003;304:471-9.
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 2002;111:331-42.
- Hetz C, Vitte PA, Bombrun A, et al. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J Biol Chem*. 2005;280:42960-70.
- Siskind L. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioener Biomem*. 2005;37:143-53.
- Siskind L, Flux S, Bui M, et al. Sphingosine forms channels in membranes that differ greatly from those formed by ceramide. *J Bioener Biomem*. 2005;37:227-36.
- Morales A, Colell A, Mari M, et al. Glycosphingolipids and mitochondria: role in apoptosis and disease. *Glycoconjugate J*. 2004;20:579-88.
- Garofalo T, Giammaroli AM, Misasi R, et al. Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. *Cell Death Differ*. 2005;12:1378-89.
- Baine CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role of mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005;434:658-62.
- Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, et al. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12005-10.
- Colell A, García-Ruiz C, Mari M, et al. Mitochondrial permeability transition induced by reactive oxygen species is independent of cholesterol-regulated membrane fluidity. *FEBS Lett*. 2004;560:63-8.
- García-Ruiz C, Colell A, Mari M, et al. Defective TNF- $\alpha$ -mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest*. 2003;111:197-208.
- Mari M, Colell A, Morales A, et al. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest*. 2004;113:895-904.
- Chiarugi A. "Simple but not simpler": toward a unified picture of energy requirements in cell death. *FASEB J*. 2005;19:1783-8.
- Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett*. 1997;414:552-6.
- García-Ruiz C, Colell A, París R, Fernández-Checa JC. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *FASEB J*. 2000;14:847-58.
- Karin M, Lin A. NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002;3:221-7.
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- $\kappa$ B. *Nature*. 1995;376:167-70.
- Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Clin Invest*. 2001;107:241-6.
- París R, Morales A, Coll O, et al. Ganglioside GD3 sensitizes human hepatoma cells to cancer therapy. *J Biol Chem*. 2002;277:49870-6.
- Lluís JM, Colell A, García-Ruiz C, et al. Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. *Gastroenterology*. 2003;124:708-24.
- You M, Crabb DW. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver: role of sterol regulatory element-binding proteins. *Alcohol*. 2004;34:39-43.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997;89:331-40.
- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004;114:147-52.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109:1125-31.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346:1221-31.
- Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001;34:1158-63.
- Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, et al. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology*. 1997;26:1530-7.
- Yin M, Wheeler MD, Kono H, et al. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology*. 1999;117:942-52.
- Colell A, García-Ruiz C, Miranda M, et al. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology*. 1998;115:1541-51.

34. Pastorino JG, Hoek JB. Ethanol potentiates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology*. 2000;31:1141-52.
35. Fernández-Checa JC, Ookhtens M, Kaplowitz N. Effect of chronic ethanol intake on rat hepatocyte GSH: compartmentation, efflux and response to incubation with ethanol. *J Clin Invest*. 1987;82:608-16.
36. Hirano T, Kaplowitz N, Tsukamoto H, et al. Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology* 1992;16:1423-7.
37. García-Ruiz C, Morales A, Colell A, et al. Feeding S-adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology*. 1995;21: 207-14.
38. Colell A, García-Ruiz C, Morales A, et al. Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology*. 1997;26:699-708.
39. Colell A, Coll O, García-Ruiz C, et al. Tauroursodeoxycholic acid protects hepatocytes from ethanol-fed rats against tumor necrosis factor-induced cell death by replenishing mitochondrial glutathione. *Hepatology*. 2001;34:964-71.
40. Coll O, Colell A, García-Ruiz C, et al. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology*. 2003;38:692-702.
41. Wheeler MD, Nakagami M, Bradford BU, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. *J Biol Chem* 2001;276:36664-72.
42. Zhao P, Slattery JT. Effects of ethanol dose and ethanol withdrawal on rat liver mitochondrial glutathione: implication of potentiated acetaminophen toxicity in alcoholics. *Drug Metab Dispos*. 2002;30:1413-7.
43. Zhao P, Kalhorn TF, Slattery JT. Selective mitochondrial glutathione depletion by ethanol enhances acetaminophen toxicity in rat liver. *Hepatology*. 2002;36:326-35.
44. Osawa Y, Uchinami H, Bielawski J, et al. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. 2005;280:27879-87.
45. Mari M, Colell A, García-Ruiz C, et al. Mitochondrial GSH depletion unmasks the apoptotic potential of TNF through oxidative changes in cardiolipin. En preparación.
46. Fernández-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204:263-73.
47. Mari M, Caballero F, Colell A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading contributes to the TNF-induced transition from steatosis to steatohepatitis. *Cell Met*. 2005. En revisión.
48. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*. 2002;122:202-10.
49. Llacuna L, Mari M, García-Ruiz C, et al. Critical role of acidic sphingomyelinase in murine ischemia reperfusion injury. *Hepatology*. 2006. En revisión.
50. Bruix J, Boix L, Sala M, et al. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. 2004;5:215-9.
51. Higaki K, Yano H, Kojiro M. Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissue. *Am J Pathol*. 1996;149:429-37.
52. Liedtke C, Zschemisch NH, Coir A, et al. Silencing of caspase 8 in murine hepatocellular carcinoma is mediated via methylation of an essential promoter element. *Gastroenterology*. 2005; 129:1602-15.
53. Peter ME, Legembre P, Barnhart BC. Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochim Biophys Acta*. 2005;1755:25-36.
54. Liu P, Kimmoun E, Legrand A, et al. Activation of NF-κB, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2002;37:63-71.
55. Colell A, García-Ruiz C, Román J, et al. Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor-κB dependent survival pathways. *FASEB J*. 2001;15:1068-70.
56. Lluís JM, Morales A, Fernández-Checa JC. HIF-mediated GD3 accumulation suppresses cancer therapy-induced NF-κB activation in hepatoma cells and in a murine model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2006. En revisión.