

XXXIV CONGRESO ANUAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

Mecanismos de muerte celular y su relevancia clínica

M. Marí* y J.C. Fernández-Checa

Unidad de Hepatología y CIBEK, IMDiM. Hospital Clínic i Provincial, CIBEREHD, IDIBAPS, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, España

Introducción

El hígado es un órgano con una sorprendente capacidad regenerativa frente al daño. La regeneración hepática observada en respuesta a diferentes tipos de agresiones determina que incluso la extensa muerte hepatocelular observada tras un episodio agudo, como en el caso de una hepatitis viral, pueda llegar a resolverse completamente tras la eliminación del agente causante del daño. Por el contrario, en casos de lesiones menos graves pero que se prolongan en el tiempo puede producirse una regeneración incompleta o una fibrosis hepática, como consecuencia de un proceso inflamatorio y de reparación de tejido en respuesta a un daño hepático crónico.

Para el caso de la fibrosis hepática, la presencia de un componente de reversibilidad se inicia, en general, con la eliminación del daño hepático. Por lo tanto, la inhibición del estímulo causante del daño hepático emerge como un potencial tratamiento que no está dirigido únicamente a las enfermedades hepáticas agudas, sino también a las enfermedades hepáticas crónicas, incluso en sus estadios más avanzados. Pero la supresión del agente causante no siempre es posible, por lo que es crítico el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que conducen al daño hepático causado por un determinado estímulo para la actuación farmacológica y la aplicación del mejor de los tratamientos disponibles.

En la presente revisión se resumen los aspectos/mecanismos más relevantes que contribuyen al desa-

rrollo del daño hepático y su relevancia en enfermedades prevalentes hepáticas.

Apoptosis y necrosis en el hepatocito

El daño hepático se produce cuando la muerte celular excede la capacidad regenerativa del órgano. Afecta predominantemente al hepatocito como tipo celular más abundante en el hígado. En este escenario, la muerte hepatocelular coexiste con los fenómenos de reparación tisular, inflamación, regeneración y fibrosis. En este sentido, y pese a las diferencias en la causa del daño (p. ej., infección por virus de la hepatitis C, colestasis, esteatohepatitis, etc.), el tipo de muerte celular sigue generalmente 2 patrones diferenciados: apoptosis o necrosis¹. La *necrosis*, también denominada oncosis o necrosis oncocítica, resulta de la perturbación extrema del equilibrio celular. Durante la necrosis se observa una disminución drástica del contenido energético celular en forma de adenosina trifosfato (ATP), que resulta en el hinchamiento y la lisis del hepatocito, lo que conduce a la liberación masiva del contenido intracelular y a una inflamación secundaria. Por el contrario, la *apoptosis* representa la eliminación controlada de la célula mediante la ejecución de un programa regulado de muerte dependiente de ATP que, morfológicamente, conduce a un encogimiento celular, acompañado de condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. El proceso apoptótico afecta a determinadas células que deben ser eliminadas por el organismo por diferentes motivos (p. ej., por estar dañadas, senescentes, infectadas). La apoptosis no afecta necesariamente a células

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: monmari@clinic.ub.es (M. Marí).

contiguas ni a todas las células de un área tisular. Durante la apoptosis, la membrana celular no se destruye, lo que impide la liberación al espacio extracelular de su contenido y resulta en un proceso «silencioso» que minimiza la respuesta inflamatoria. Finalmente, el hepatocito apoptótico es captado en su totalidad por fagocitos, lo que impide que se produzca alarma en el resto del tejido. Los fenómenos morfológicos que caracterizan la apoptosis son debidos, fundamentalmente, a la acción de unas cisteinil-aspartato proteasas conocidas como caspasas². Las caspasas no digieren inespecíficamente todo el contenido celular (como podrían hacer, p. ej., las proteasas digestivas), sino que cortan sustratos celulares estratégicos, básicos para el mantenimiento de la estructura celular y las vías de supervivencia. Las caspasas se encuentran constitutivamente expresadas en las células y residen sobre todo en el citosol, en forma de zimógeno inactivo o «procaspasa», y se procesan a estado activo por proteólisis. Algunas caspasas son «iniciadoras» y otras «efectoras» del proceso catalítico, y actúan sobre las endonucleasas, que son las causantes directas de la fragmentación del ADN. Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por auto-proteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis, cualquiera que sea el estímulo.

En el hígado se ha observado que un mismo estímulo, en función de su duración e intensidad, puede resultar tanto en apoptosis como en necrosis, llegándose incluso a controversias sobre qué tipo de muerte celular predomina frente a un daño hepático concreto³. En la actualidad, sin embargo, se ha llegado al consenso de que apoptosis y necrosis representan los extremos opuestos de un proceso dinámico denominado *necroapoptosis*, donde el fenotipo de muerte celular seguido dependerá de otros factores celulares, como las concentraciones de ATP o el estado redox intracelular. Así, por ejemplo, si las concentraciones de ATP intracelulares se encuentran gravemente comprometidas, no se podrá formar el apoptosoma, complejo proteínico dependiente de ATP que permitirá la ejecución del programa apoptótico, y la célula morirá siguiendo un fenotipo necrótico⁴.

Los estímulos nocivos que conducen a la muerte celular son muy diversos: elevados valores de oxidantes en el interior de la célula, lesión del ADN por oxidantes, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterápicos, moléculas o ligandos que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico, etc. En función del estímulo iniciador que conduce a una muerte celular se han descrito 2 vías: la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca.

La vía *intrínseca* o *mitocondrial* se ejecuta en respuesta a estímulos externos, agentes tóxicos o daño en el ADN. En este proceso, las distintas vías de respuesta convergen en la mitocondria a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, que darán lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MME) y la consiguiente liberación de proteínas del espacio intermembrana, entre ellas, el citocromo C⁵. Esta proteína, una vez en el citosol, se asocia con Apaf-1 y la procaspasa-9, formando el llamado apoptosoma, complejo que permitirá la activación de la caspasa-9 y su actuación sobre las caspasas efectoras, como la caspasa-3⁶.

La vía *extrínseca* o de los receptores de muerte se activa cuando un ligando se une a sus correspondientes receptores. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: los receptores de muerte de la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR), que incluyen TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inducido de apoptosis relacionado con el TNF, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5).

Los receptores de muerte poseen un dominio intracelular en el C-terminal del receptor, denominado dominio de muerte (*death domain* [DD]). El miembro de los receptores de muerte más estudiado es el CD95 o Fas. La oligomerización del CD95 tras la unión de su ligando, FasL, es requerida para la transducción de la señal apoptótica. Un complejo de proteínas se asocia con el CD95 activado. Este complejo de señalización inductor de muerte, DISC (*death-inducing signalling complex*), se forma en los receptores trimerizados tras reclutar al adaptador FADD (*Fas-associated death domain*), que se une a través de su dominio efector de muerte DED (*death-effector domain*) al dominio de muerte del CD95, y de nuevo, por interacciones homólogas, recluta en el DISC a la procaspasa-8 (o previamente conocida como FLICE), que también contiene un DED. Después, la procaspasa-8 es activada proteolíticamente y la caspasa-8 activa (caspasa iniciadora) es liberada del DISC al citoplasma, formando un heterotetrámero de 2 subunidades pequeñas y 2 grandes⁷. La importancia de estas proteínas adaptadoras se ha demostrado, por ejemplo, en ratones dominantes negativos de FADD resistentes al daño hepático mediado por TNF o CD95⁸.

La caspasa-8 corta proteolíticamente varias proteínas de la célula, incluida la procaspasa-3 (caspasa ejecutora), que resulta en su activación y en la ejecución de la muerte celular. La inhibición de esta ruta es realizada por proteínas que contienen 2 DED y que se unen al complejo CD95-FADD, lo que impide el reclutamiento y la activación de la caspasa-8 (FLICE),

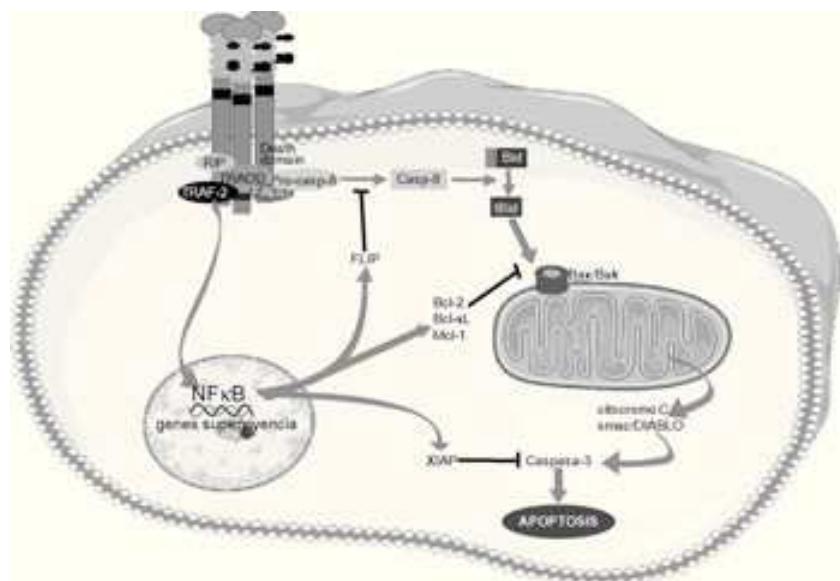


Figura 1 Reclutamiento de la mitocondria en la vía extrínseca a través de tBid en hepatocitos y protección mediada por NFκB.

de ahí el nombre FLIP para estas proteínas inhibidoras de FLICE (*FLICE-inhibitory proteins*)⁹.

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana, TNFR1¹⁰. Su dominio intracelular conecta en primer lugar con el adaptador TRADD (*TNF receptor associated death domain*), la unión de FADD a TRADD permitirá el reclutamiento y la activación de la caspasa-8 (fig. 1). A su vez, el receptor TNFR1, a partir del reclutamiento de TRAF-2 (*TNF receptor associated factor*), puede activar vías de supervivencia, como: *a*) la activación del factor de transcripción NF-κB, y *b*) la activación de la vía de señalización de MAPK.

En numerosos tipos celulares, *células del tipo I*, la vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial convergen en la activación de la caspasa-3. Sin embargo, en las *células del tipo II*, entre las que se encuentra el hepatocito, se ha observado que la vía extrínseca o de los receptores de muerte requiere la participación de la mitocondria a través de Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8, que en estas células no es capaz de inducir una suficiente activación de caspasa-3, media la truncación de Bid incrementando enormemente su actividad proapoptótica, que resulta en su translocación a la mitocondria y permeabilización mitocondrial, lo que promueve la liberación del citocromo C (fig. 1).

Por lo tanto, en el hepatocito, la mitocondria se posiciona como el orgánulo central en la inducción de muerte celular, tanto en la vía intrínseca como en la vía extrínseca y, por otra parte, la presencia o ausencia de ATP con frecuencia actuará como «interruptor» entre apoptosis y necrosis.

Permeabilización mitocondrial

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa es un proceso que permite la salida de proteínas proapoptóticas (citocromo C, Smac/DIABLO, etc.) del espacio intermembrana al citosol, lo que desencadena la muerte celular. Hay múltiples estudios que demuestran este proceso, pero el mecanismo exacto es aún objeto de debate. En la actualidad se barajan 2 hipótesis: la formación de canales autónomos por miembros de la familia de proteínas de Bcl-2¹¹ y la rotura no específica de la MME producida por el hinchamiento de la matriz mitocondrial interna (MMI)¹².

Permeabilización por proteínas de la familia Bcl-2

Este primer modelo considera la permeabilización mitocondrial como un proceso intrínseco de la membrana externa regulado por proteínas de la familia Bcl-2. Estas proteínas contienen, al menos, una de las 4 regiones conservadas denominadas dominios homólogos de Bcl-2 (BH1-BH4). Entre los miembros de esta familia, y en función de los dominios homólogos que contengan, hay tanto proteínas apoptóticas como antiapoptóticas. Así, los miembros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xW, Mcl-1 y A1/bfl-1) presentan los 4 dominios, mientras que entre los proapoptóticos se halla un grupo que carece del dominio BH-4 (Bax, Bak y Bok/Mtd) y otro que únicamente presenta el dominio BH3 (*BH3-only*) (p. ej., Bim/Bod, Bid, Bad, Noxa, Puma/Bbc3 y Hrk/DP5) (fig. 2).

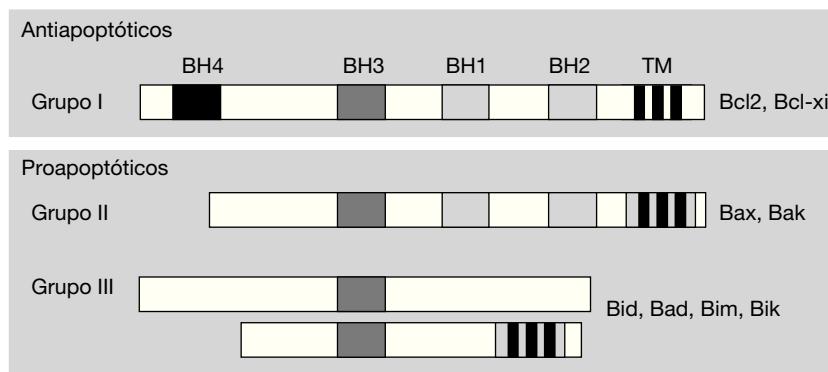


Figura 2 Miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia de Bcl2.

La mayoría de estas proteínas presenta un dominio C-terminal que les permite asociarse a membranas. La heterodimerización de las proteínas de la familia Bcl-2 parece ser crucial en la regulación de la permeabilización mitocondrial. Datos estructurales muestran que las proteínas antiapoptóticas presentan una cavidad hidrofóbica en su superficie que sería el sitio de unión para el dominio BH3 de los miembros proapoptóticos¹³, inhibiendo así la función de éstas.

La adición de Bax o Bak a Bid truncado (tBid, la forma activa de esta proteína), directamente en la mitocondria aislada permeabiliza la MME sin variar la estructura potencial de membrana ni su consumo de oxígeno. Las proteínas proapoptóticas Bax o Bak experimentan un cambio conformacional, de manera que su extremo N-terminal queda expuesto. Bax, que en general se encuentra en el citosol o débilmente unido a la mitocondria, se transloca a este orgánulo, oligomeriza y se inserta en la MME, lo que provoca su permeabilización. Estos eventos pueden ser activados por tBID o por otros miembros *BH3-only*, e inhibidos por las antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL¹². De esta forma, se justifica la presencia de proteínas del espacio intermembrana de importante peso molecular, como Smac/DIABLO (24 kD) en el citosol de las células apoptóticas debido a la capacidad de Bax para formar pores oligoméricos¹⁴.

Permeabilidad mitocondrial transitoria

El otro modelo para explicar la permeabilidad mitocondrial aboga por la formación de un poro multiproteínico que comprende el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y la ciclofilina D, además de otras proteínas, que actúan en los sitios de unión de la MME y la MMI¹⁵ (fig. 3). Experimentos *in vitro* muestran que la permeabilidad mitocondrial transitoria (PMT) ocurre bajo condiciones de estrés oxidativo, altas concentraciones de calcio o isque-

mia/reperfusión, lo que permite que solutos de bajo peso molecular (hasta 1.500 D) puedan atravesar la MMI¹². La apertura de este canal no específico permite el equilibrio entre los iones de la matriz y del espacio intermembrana, de manera que se disipa el gradiente de protones y se desacopla la cadena respiratoria. Además, se produce un hinchamiento mitocondrial (debido a la hiperosmolaridad de la matriz), el desplegamiento de la MMI (de mayor superficie que la MME a causa de sus crestas), lo que llevaría en último término a la rotura de la MME y a la liberación masiva de proteínas solubles y demás factores apoptóticos al citosol. Distintos autores apuntan que en este proceso se verían nuevamente implicadas proteínas de la familia Bcl-2, por lo que se regularía la permeabilización mitocondrial mediante una posible interacción con ANT o VDAC¹⁵.

Papel de los receptores de la muerte en enfermedades hepáticas

Los receptores de la muerte pertenecen a la familia TNF/factor de crecimiento nervioso y son esenciales para la inducción de muerte a través de ligando, es decir, para la activación de la vía extrínseca. Entre los miembros de esta familia TNF, CD95 (Fas) y TRAIL tienen un papel reconocido en el desarrollo del daño hepático.

TNF- α

Como hemos indicado con anterioridad, aunque los hepatocitos expresan los receptores TNFR1 y TNFR2, únicamente el receptor TNFR1 tiene el dominio de la muerte y, por lo tanto, es capaz de inducir el programa apoptótico. Se ha descrito que en la señalización inducida por TNF se observa una sobregeración mitocondrial de radicales libres que contribuye a su acción proapoptótica y favorece la activación continua de la cinasa de estrés JNK.

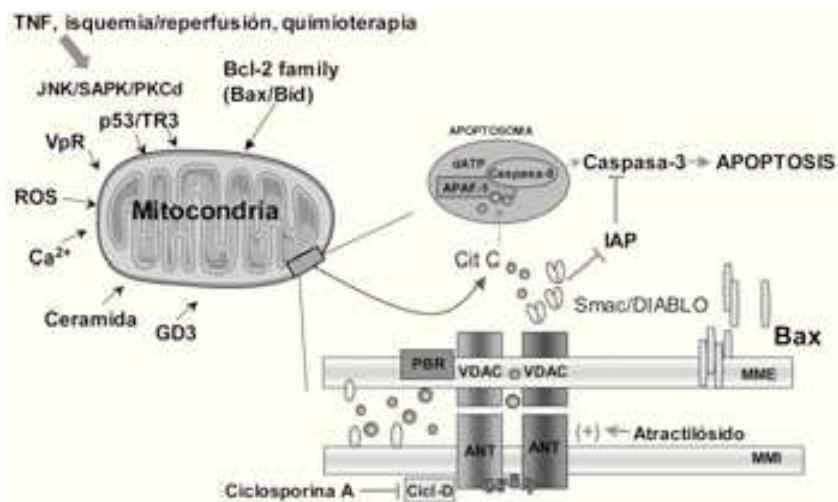


Figura 3 Poro de permeabilidad mitocondrial transitoria.

La particularidad de TNF, que claramente lo diferencia de CD95, es la capacidad de inducir efectos divergentes en un mismo tipo celular. Así, en el hepatocito, además de inducir muerte hepatocelular, es capaz de activar una vía de protección celular, la activación del factor de transcripción NF- κ B (fig. 1), estableciéndose un equilibrio entre supervivencia y apoptosis. En condiciones normales, la elevada resistencia del hepatocito a TNF muestra que este equilibrio se encuentra decantado hacia la activación de NF- κ B y, por lo tanto, a la generación de señales de supervivencia, mediante la expresión de proteínas antiapoptóticas (p. ej., c-FLIP, IAP, MnSOD, Gadd45 β), con capacidad de bloquear la activación de caspasas, la generación de radicales mitocondriales y la sobreactivación de JNK. Sin embargo, en condiciones patológicas en las que el hígado soporta un elevado estrés, o tras la inhibición de NF- κ B, la exposición al ligando TNF conduce a una muerte apoptótica. En la muerte hepatocelular mediada por TNF, el papel central de la mitocondria se ha puesto claramente de manifiesto puesto que, incluso en ausencia de inhibición de NF- κ B, la disminución selectiva de las concentraciones mitocondriales de su principal antioxidante, el glutatión (GSH), clave en la eliminación de H₂O₂ generado por la cadena respiratoria, sensibiliza a los hepatocitos al TNF¹⁶. Este hecho es de la mayor importancia, puesto que se ha demostrado en modelos experimentales que diferentes enfermedades hepáticas, como las inducidas por consumo crónico de alcohol, la esteatosis hepática¹⁷ o las insuficiencias hepáticas causadas por ciertos fármacos, como el acetaminofeno, conducen a una disminución selectiva del GSH en la mitocondria¹⁸.

Todo ello resulta del mayor interés, puesto que la participación de TNF se ha observado en numerosas hepatopatías. Así, por ejemplo, se ha hallado un au-

mento de las concentraciones TNF y TNFR1 en pacientes con daño hepático agudo inducido por acetaminofeno, esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica o hepatitis viral de tipo B. En el caso de la esteatohepatitis alcohólica, son numerosos los estudios que recalcan la importancia de TNF, y cabe destacar el hecho de que ratones deficientes en TNFR1 son resistentes al desarrollo de esteatohepatitis tras la ingesta crónica de etanol y que en pacientes se ha observado una correlación entre los valores circulantes de TNFR1 y la mortalidad a los 3 meses.

CD95 (Fas)

CD95 es activado por el ligando Fas (FasL), tanto en su forma soluble como unida a membrana. La muerte inducida por FasL conduce a la rápida eliminación de hepatocitos por las células NK, NKT y linfocitos T. La notable sensibilidad del hígado a Fas queda claramente demostrada al observarse que la inyección de un anticuerpo agonista de Fas en el ratón es capaz de inducir hepatitis fulminante en pocas horas. Las concentraciones de FasL están aumentadas en pacientes con daño hepático agudo causado por fármacos o acetaminofeno, observándose también un aumento del ligando y del receptor CD95 en enfermedades hepáticas crónicas, como en la colestasis y en el hígado esteatósico. De hecho, ratones deficientes en Fas muestran una disminución en la apoptosis hepatocelular y en la fibrosis tras la ligadura del conducto biliar¹⁹. Por otra parte, en el carcinoma hepatocelular se ha observado una disminución de CD95, debida a la pérdida del supresor tumoral p53, que comporta una resistencia a la apoptosis en respuesta al ligando Fas y una sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, características que hacen muy difícil la erradicación de este carcinoma.

TRAIL

Aunque la apoptosis mediada por el ligando TRAIL es una ruta bien caracterizada, a día de hoy se dispone aún de pocas pruebas científicas acerca del papel que desempeña este receptor en las enfermedades hepáticas. Esto es debido, en parte, a que los hepatocitos «sanos», tanto en *in vitro* como *in vivo*, son resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL debido a la ausencia de receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2, mientras que, por el contrario, se observa una expresión muy elevada en células del sistema inmune, como las NK activadas, y en células T CD4+ o CD8+. No obstante, se ha observado que hepatocitos «estresados» debido a una infección viral, una esteatohepatitis o por agentes genotóxicos muestran una sobreexpresión de TRAIL. De interés terapéutico es la observación de que tanto las células estrelladas hepáticas, principal tipo celular causante de la deposición de matriz extracelular durante la fibrosis hepática, como las células de hepatocarcinoma expresan los receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2. En este sentido, se están probando estrategias preclínicas encaminadas a «eliminar» de forma selectiva tipos celulares específicos a través de la señalización por los receptores de TRAIL. Sin embargo, recientemente, algunos de estos experimentos (p. ej., en células de adenocarcinoma ductales pancreáticas) han mostrado, como sucedió en su momento para el TNF-R1, la capacidad de TRAIL para inducir el factor de transcripción NF-κB, observándose, por lo tanto, una resistencia debida a TRAIL en lugar de inducción de apoptosis. En el caso del hígado, queda aún por determinar si estos tratamientos, dirigidos a los tipos celulares hepáticos capaces de señalizar a través de TRAIL, serán capaces de inhibir la fibrosis hepática y el crecimiento tumoral en pacientes²⁰.

Conclusiones

El conocimiento de los mecanismos implicados en la muerte hepatocelular, tanto crónica como aguda, constituye la antesala para diseñar estrategias terapéuticas dirigidas en la práctica clínica. En este contexto, la señalización a través de receptores de la muerte se halla implicada en numerosas enfermedades hepáticas. Sin embargo, su complejidad se encuentra acentuada cuando se tienen en consideración las diferentes poblaciones celulares implicadas en el proceso. Por lo tanto, futuras estrategias encaminadas a la activación/eliminación de la señalización apoptótica en un tipo celular concreto serán de gran interés terapéutico para el tratamiento de las enfermedades hepáticas.

Bibliografía

1. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*. 2006;43:S31-44.
2. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:383-424.
3. Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci*. 2002;67:322-8.
4. Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*. 1998;102-3:139-42.
5. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;112:481-90.
6. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apotosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*. 2001;26:390-7.
7. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003;10:45-65.
8. Schuchmann M, Varfolomeev EE, Hermann F, Rueckert F, Strand D, Koehler H, et al. Dominant negative MORT1/FADD rescues mice from CD95 and TNF-induced liver failure. *Hepatology*. 2003;37:129-35.
9. Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1-and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:17255-7.
10. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002;296:1634-5.
11. Green DR. At the gates of death. *Cancer Cell*. 2006;9:328-30.
12. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:63-7.
13. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644:83-94.
14. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*. 2000;7:1166-73.
15. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:67-71.
16. Marí M, Colell A, Morales A, Caballero F, Moles A, Fernández A, et al. Mechanism of mitochondrial glutathione-dependent hepatocellular susceptibility to TNF despite NF-κB activation. *Gastroenterology*. 2008;134:1507-20.
17. Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernández A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF-and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*. 2006;4:185-98.
18. Fernández-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204:263-73.
19. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology*. 1999;117:669-77.
20. Herr I, Schemmer P, Büchler MW. On the TRAIL to therapeutic intervention in liver disease. *Hepatology*. 2007;46:266-74.