



Gastroenterología y Hepatología

www.elsevier.es/gastroenterologia



XXXV CONGRESO ANUAL DE LA FUNDACIÓN/ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

Estrés oxidativo mitocondrial en patología hepática

A. Morales^{a,*}, M. Marí^a, A. Colell^a, C. García-Ruiz^a y J.C. Fernández-Checa^{a,b}

^aUnidad de Hepatología, Hospital Clínic, IDIBAPS-CIBEK, CIBEREHD, Departamento de Muerte y Proliferación Celular, IIBB-CSIC, Barcelona, España

^bResearch Center for Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

La mitocondria, principal productor energético de la célula, es a su vez reservorio de numerosas proteínas capaces de controlar la muerte celular. Los radicales libres, moléculas clave en el desarrollo de numerosas enfermedades hepáticas, y en particular el estrés oxidativo mitocondrial, se han demostrado determinantes en el control de la funcionalidad de este orgánulo, y en consecuencia de la viabilidad celular. El estrés oxidativo mitocondrial aparece en el curso de diversas hepatopatías y su control puede ser una estrategia eficaz para reducir el daño hepático causado por éstas. Por ello, la modulación de los valores mitocondriales de glutatión, principal defensa antioxidante mitocondrial, condiciona la respuesta del hígado frente a estímulos nocivos. Cambios en la estructura lipídica mitocondrial, especialmente en el colesterol libre o en el estado de oxidación de la cardiolipina, afectan la funcionalidad hepática. El conocimiento de los mecanismos involucrados y de la biología de los radicales generados contribuirá al desarrollo de futuras terapias específicas.

Introducción

Los radicales libres participan en la etiología de numerosas enfermedades hepáticas¹. En particular, los radicales generados en la mitocondria pueden comprometer su funcionalidad y alterar su estructura, y por contener este orgánulo proteínas inductoras de la muerte celular, condicionar la viabilidad celular². El estrés oxidativo, ya sea inducido por un incremento en la generación de radicales libres desde la mitocondria o por una disminución de los valores de las mo-

léculas o sistemas antioxidantes encargados de la protección de este orgánulo, emerge como un elemento clave en el desarrollo de patologías hepáticas, como la esteatohepatitis alcohólica o no alcohólica, la isquemia/reperfusion o incluso el cáncer. Por ello, el conocimiento de los mecanismos involucrados puede resultar de gran interés en el desarrollo de terapias efectivas.

La pérdida de funcionalidad mitocondrial puede comprometer la viabilidad celular

La cadena respiratoria mitocondrial, principal fuente generadora de energía celular, genera ATP a través del transporte de electrones a moléculas de oxígeno con su conversión a agua. Este proceso bioquímico no es totalmente eficiente, y parte del oxígeno es insuficientemente reducido, liberándose en forma de radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En determinadas situaciones patológicas este proceso se ve incrementado debido a la acción de moléculas que interaccionan con la cadena respiratoria o a cambios fisicoquímicos de la membrana mitocondrial que inducen desacoplamiento de las proteínas de la cadena respiratoria y una mayor generación de especies reactivas. La generación fisiológica de radicales es un proceso bien tolerado por la célula e incluso fundamental para la fisiología celular, permitiendo que los sistemas de eliminación se hallen en correcto funcionamiento y preparados para actuar frente a eventuales moléculas nocivas. Para mantener la funcionalidad de este orgánulo, la mitocondria elimina las especies oxidantes generadas durante el metabolismo aeróbico a través de la acción de enzimas antioxidantes, como la dependiente del manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) o la glutatión peroxidasa (GPx). En condiciones fisiológicas, la mitocondria contiene de 5 a 10 veces más O_2^- , un radical altamente oxidante, que el citosol. En estados patológicos

*Autor para correspondencia

Correo electrónico: amorales@clinic.ub.es (A. Morales).

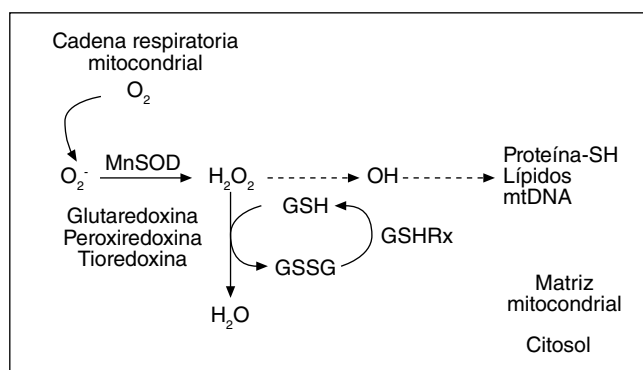


Figura 1 Generación mitocondrial de radicales libres y defensa antioxidante. La mitocondria es el principal productor celular de radicales libres. El radical superóxido generado desde la cadena respiratoria mitocondrial y sus derivados, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, deben ser eliminados por los sistemas antioxidantes mitocondriales para prevenir su interacción con proteínas, lípidos y ADN mitocondrial.

esto se incrementa considerablemente, siendo la MnSOD la principal enzima encargada de su transformación a H_2O_2 , una molécula de menor reactividad pero de mayor estabilidad. La mitocondria hepática carece de catalasa, por ello es importante la acción eficiente del sistema de eliminación de H_2O_2 para no permitir su transformación en el potente radical hidroxilo a través de reacciones de Fenton o Haber-Weiss, jugando el glutatión un papel clave en esta función (fig. 1).

Relevancia del glutatión en la defensa antioxidante mitocondrial

El principal sistema de eliminación de H_2O_2 en la mitocondria es el del glutatión, que a través de la peroxidasa dependiente de selenio GPx lo transforma en agua a costa de la oxidación del glutatión (GSH) a su forma GSSG, que posteriormente será reciclado a GSH por la enzima NADP-dependiente glutatión reductasa (GR). Otros sistemas, como los de las glutaredoxina, tioredoxina o peroxiredoxina, están presentes en la mitocondria participando en la eliminación y reciclaje tanto del H_2O_2 como de las proteínas oxidadas por su acción. Sin embargo, el sistema del GSH es, con diferencia, el sistema defensivo clave en la mayoría de patologías, tanto por sus altas concentraciones presentes como por su elevada afinidad a los radicales.

El GSH es un tripéptido compuesto de glutamato, cisteína y glicina que contiene un grupo tiol (-SH) reactivo frente a numerosas moléculas oxidantes, siendo la primera línea de defensa celular frente al estrés oxidativo^{1,2}. Su síntesis citosólica condiciona que para mantener su elevada concentración mitocondrial sea preciso su transporte a través de proteínas específicas. Se han descrito 2 sistemas, el del transportador del 2-oxoglutarato (OGt) y el transportador de los ácidos dicarboxílicos (DCT), como responsables de su transporte mitocondrial. En particular en el hígado, el OGt parece tener una mayor importancia, dependiendo su funcionalidad del estado fisicoquímico de la membrana mito-

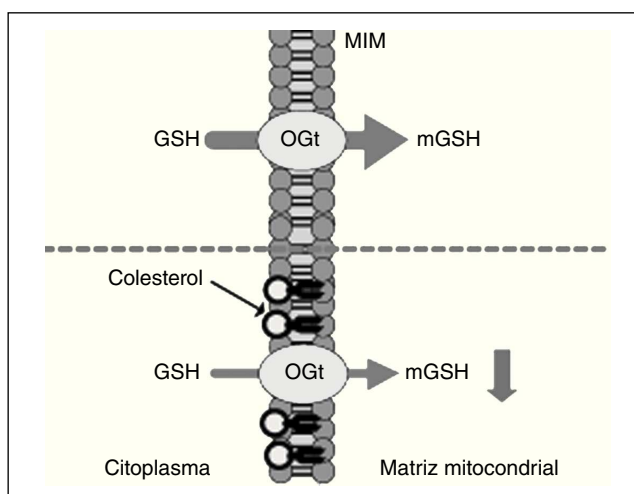


Figura 2 El transporte mitocondrial hepático de GSH depende de la conformación lipídica de la membrana mitocondrial. El descenso de la fluidez de la membrana interna mitocondrial (MIM), observado como consecuencia del aumento de los valores de colesterol en modelos de esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica, disminuye el transporte de glutatión desde el citosol a través del transportador de oxoglutarato (OGt).

condrial³. Así, por ejemplo, un descenso en la fluidez de la membrana mitocondrial, como el que ocurre al incrementarse la relación colesterol/fosfolípidos, el número de insaturaciones presentes en los ácidos grasos de los fosfolípidos en la membrana mitocondrial interna, o una menor relación PC/PE, disminuye la capacidad del transportador OGt e induce la disminución de la concentración de GSH mitocondrial (fig. 2).

La disminución de la defensa antioxidante mitocondrial conduce a muerte celular asociada a patologías hepáticas

Alteraciones lipídicas, como el incremento de los valores de colesterol o la disminución de determinados fosfolípidos, causan cambios estructurales y dinámicos (fluidez/rigidez) en la membrana mitocondrial de especial relevancia biomédica. En este sentido, incrementos en la rigidez de la membrana mitocondrial se han asociado a diferentes patologías, como la esteatohepatitis alcohólica⁴ o no alcohólica⁵, o incluso en patologías extrahepáticas, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer⁶. Así, por ejemplo, ya en estadios iniciales de NASH se observa un depósito de colesterol en la membrana interna mitocondrial que condiciona el transporte de GSH desde el citosol y provoca una disminución del GSH mitocondrial^{5,7}. Traspasado un umbral, cercano al 30-40% de los valores basales, el descenso del GSH mitocondrial puede condicionar la viabilidad del orgánulo, en especial si coincide con un segundo impacto (*second hit*) que provoque un incremento del estrés mitocondrial en condiciones de carencia de este sistema de eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando la pérdida de funcionalidad mitocondrial. De hecho, estudios realizados en modelos animales genéticos y nutricionales de esteato-

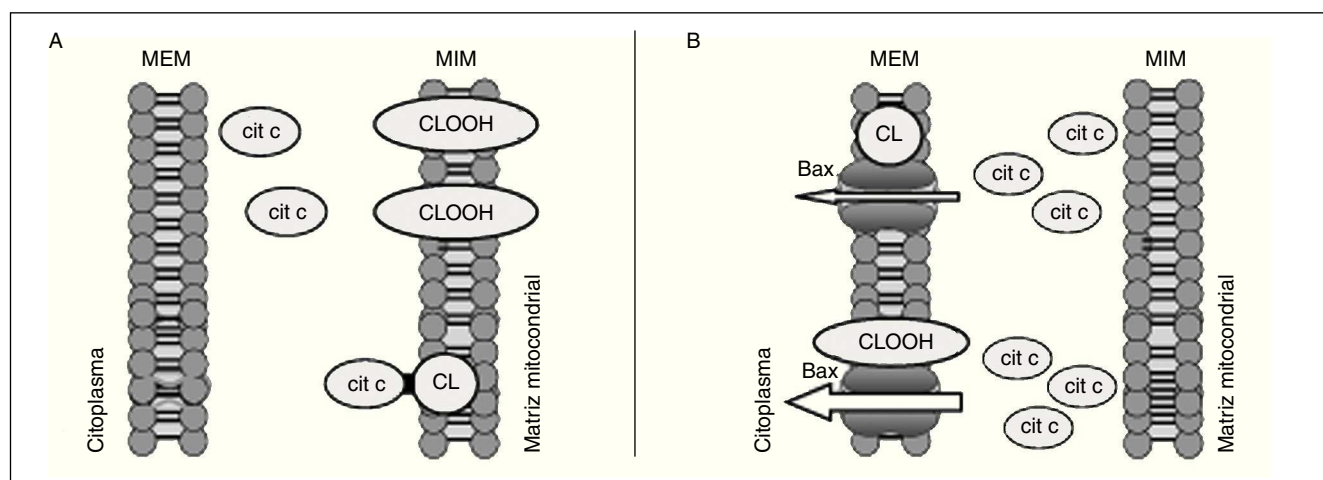


Figura 3 La oxidación de la cardiolipina (CL) mitocondrial sensibiliza la mitocondria mediante un mecanismo dual. La acumulación de radicales libres (ROS) mitocondriales causa la peroxidación de la cardiolipina (CLOOH), promoviendo la pérdida de funcionalidad mitocondrial a través de 2 mecanismos: *a*) favorece la liberación del citocromo c asociado a la membrana interna mitocondrial (MIM), y *b*) coopera con Bax en la formación de poros en la membrana externa mitocondrial (MEM) que permiten la liberación al citosol de proteínas inductoras de muerte celular como citocromo c.

hepatitis, han avalado la tesis que entre los diferentes lípidos acumulados en el hígado graso, es el colesterol quien tiene una mayor contribución al daño asociado a citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF) o Fas⁵. En este sentido, estas citocinas, que se hallan incrementadas en numerosas patologías hepáticas, en un contexto de incremento de colesterol mitocondrial y disminución de los valores de antioxidantes, pueden, a través del incremento de ROS mitocondriales, causar disfunción mitocondrial y muerte celular. Este daño mitocondrial parece realizarse a través de esfingolípidos proapoptóticos, como la ceramida o el gangliósido GD3^{8,9}, mediadores intracelulares del TNF y de otros estímulos nocivos para el hígado¹⁰. Así, los esfingolípidos, mediante su interacción con la cadena respiratoria mitocondrial, generan radicales libres que se ven incrementados en condiciones de disminución del valor mitocondrial de GSH^{11,12}.

Una de las moléculas que puede ser afectada por una disminución de los valores de GSH en un contexto oxidativo es la cardiolipina. La cardiolipina es un fosfolípido exclusivamente mitocondrial que condiciona la rigidez y estabilidad de la membrana mitocondrial, en especial de la membrana interna, que es la principal responsable del acceso de moléculas al interior de la matriz mitocondrial. La pérdida u oxidación de la cardiolipina disminuye su afinidad por el citocromo c y facilita su liberación mitocondrial, formación del apoptosoma y el desencadenamiento de la cascada de muerte celular del hepatocito. Adicionalmente, en condiciones de GSH disminuido, la presencia de cardiolipina peroxidada en la membrana facilita la creación de canales proapoptóticos por miembros de la familia de Bcl-2 como Bax¹³, incluso cuando otros sistemas de protección, como los de la peroxiredoxina o tioredoxina, son plenamente funcionales (fig. 3).

Diferentes compuestos químicos inducen estrés oxidativo mitocondrial y en condiciones de disminución de la defensa

antioxidante mitocondrial pueden resultar especialmente nocivos. Un caso paradigmático es el del paracetamol, cuya toxicidad puede verse muy potenciada en individuos que, como alcohólicos crónicos, puedan presentar una disminución selectiva de los valores de GSH mitocondrial¹⁴. De forma análoga, numerosos agentes quimioterapéuticos o la hipoxia inducen estrés mitocondrial¹⁵, y que en asociación con una disminución del GSH mitocondrial se convierten en potentes inductores de muerte, lo que podría tener un potencial interés terapéutico antitumoral. Más aún, estas observaciones son relevantes puesto que los tumores crecen en un entorno de cierta privación de oxígeno, y la hipoxia es capaz de producir un moderado incremento de radicales libres que activan rutas, como HIF-1 α o NF- κ B, que facilitan el desarrollo y progresión tumoral. Debido a ello, incrementar el estrés oxidativo se ha comprobado efectivo en el bloqueo de la activación de NF- κ B y, como consecuencia, impedir la inducción de sistemas proliferativos y/o de protección, entre ellos MnSOD o inhibidores de acción de caspasas, como cIAP¹⁶. En este sentido, compuestos que contribuyan a la disminución selectiva de la defensa antioxidante mitocondrial, y particularmente del GSH mitocondrial, pueden transformar el entorno hipóxico de proangiogénico y proliferativo a un contexto promotor de muerte celular en condiciones de sobreproducción de ROS (fig. 4). De hecho, combinando estrategias que dificulten una eficiente defensa antioxidante mitocondrial con la administración de quimioterapéuticos con interacción mitocondrial podría acrecentarse la toxicidad de la terapia antitumoral e incrementar su efectividad.

Conclusiones finales

La funcionalidad de la mitocondria hepática es crucial para preservar la viabilidad del órgano, jugando un papel clave los sistemas antioxidantes encargados de eliminar radicales li-

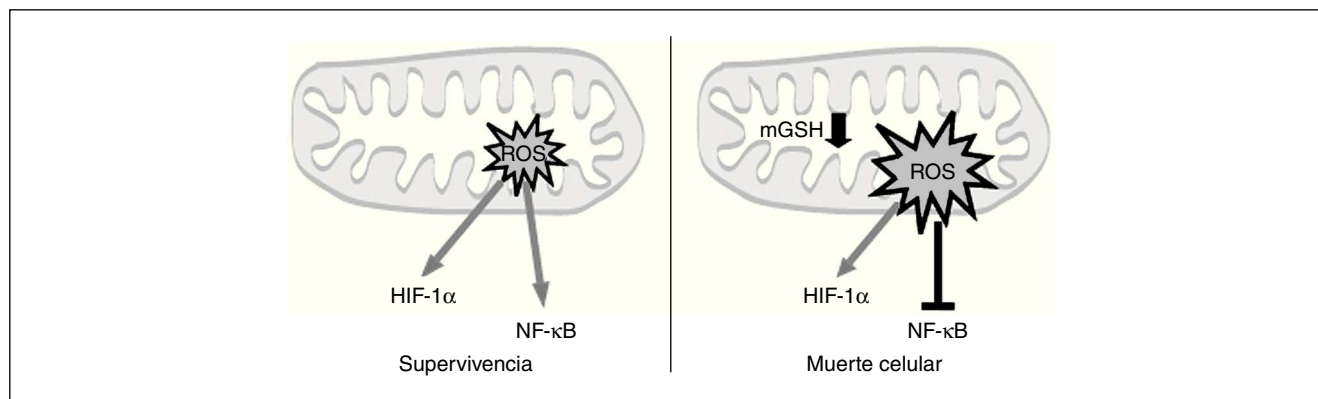


Figura 4 La disminución del GSH mitocondrial sensibiliza la célula tumoral a hipoxia y terapia antitumoral. La inducción de HIF-1 α y NF- κ B a través de radicales libres (ROS) generados por la hipoxia favorece la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Sin embargo, la disminución de los valores mitocondriales de glutatión conduce a una sobregeneración de radicales libres que sensibiliza la célula tumoral a través del bloqueo de la vía de supervivencia activada por NF- κ B. Análogamente, la disminución de la defensa antioxidante mitocondrial puede sensibilizar a agentes antitumorales que generen estrés oxidativo mitocondrial.

bres generados en la mitocondria, siendo el sistema del GSH la primera línea en esa defensa. Situaciones patológicas que incrementen la generación de oxidantes mitocondriales o que disminuyan la capacidad de eliminar radicales por parte de la mitocondria pueden poner en peligro la funcionalidad hepática, en especial si se producen en un contexto inflamatorio. Por otro lado, la sensibilización de las células tumorales a través de la disminución de su defensa antioxidante puede tener aplicaciones clínicas en el tratamiento del hepatocarcinoma. En resumen, el conocimiento del estado oxidativo mitocondrial específico de cada patología y de los mecanismos involucrados puede aportarnos nuevas claves para el desarrollo de futuras terapias para su tratamiento.

Bibliografía

- Mari M, Colell A, Morales A, García-Ruiz C, Von Montfort C, Fernández-Checa JC. Redox control of liver function in health and disease. *Antiox Redox Signal*. 2010. En prensa.
- Mari M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antiox Redox Signal*. 2009;11:2685-700.
- Coll O, Colell A, García-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology*. 2003;38:692-702.
- Colell A, García-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Ookhtens M, Rodés J, 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.
- Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballería J, Fernández A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*. 2006;4:185-98.
- Fernández A, Llacuna L, Fernández-Checa JC, Colell A. Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity. *J Neurosci*. 2009;29:6394-405.
- Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballería J, García-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol*. 2009;50:789-96.
- García-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, et al. Defective TNF- α -mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest*. 2003;111:197-208.
- Mari M, Colell A, Morales A, Pañeda C, Varela-Nieto I, García-Ruiz C, 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.
- Mari M, Fernández-Checa JC. Sphingolipids signaling and liver diseases. *Liver Int*. 2007;27:440-50.
- García-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernández-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem*. 1997;272:11369-77.
- 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.
- Mari M, Colell A, Morales A, Caballero F, Moles A, Fernández A, et al. Mechanisms of mitochondrial glutathione-dependent hepatocellular susceptibility to TNF despite NF- κ B activation. *Gastroenterology*. 2008;134:1507-20.
- Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem*. 2008;283:13565-77.
- Lluis JM, Buricchi F, Chiarugi P, Morales A, Fernández-Checa JC. Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- κ B via c-Src and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res*. 2007;67:7368-77.
- Lluis JM, Llacuna L, Von Montfort C, Bárcena C, Enrich C, Morales A, et al. GD3 synthase overexpression sensitizes hepatocarcinoma cells to hypoxia and reduces tumor growth by suppressing the cSrc/NF- κ B survival pathway. *PLoS One*. 2009;4:e8059.