

PUNTOS DE VISTA

Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica

L. Conde de la Rosa, H. Moshage¹ y N. Nieto

Departamento de Medicina. División de Enfermedades Hepáticas. Facultad de Medicina Mount Sinai. ¹Centro de Enfermedades Hepáticas, Digestivas y Metabólicas. Universidad de Groningen. Centro Médico Universitario de Groningen. Groningen, Países Bajos

RESUMEN

El consumo agudo y crónico de alcohol aumenta la producción de especies de oxígeno reactivas (EOR) y potencia la peroxidación de los lípidos, las proteínas y el ADN. El mecanismo por el que el alcohol produce lesión celular sigue sin estar claro, pero se piensa que las EOR y los productos de la peroxidación lipídica intervienen de forma decisiva. Se ha señalado la intervención de muchas vías en la manera que tiene el etanol de inducir un estado de "estrés oxidativo", incluidos los cambios de estado redox, la producción de acetaldehído, el daño mitocondrial, las lesiones membranosas, la apoptosis, la hipoxia inducida por etanol, los efectos sobre el sistema inmunitario y la producción alterada de citocinas, el aumento de los niveles de endotoxinas y de activación de las células de Kupffer, la movilización del hierro, la modulación de la defensa antioxidante, especialmente del glutatión mitocondrial (GSH), la oxidación monoelectrónica del etanol a un radical 1-hidroxietilo y la inducción de la CYP2E1. Estas vías no son excluyentes entre sí y es probable que sean varios, ciertamente muchos, los sistemas que contribuyan a la capacidad que posee el etanol de inducir un estado de estrés oxidativo.

Palabras clave: Apoptosis. Muerte celular. Hepatocito. Hepatopatía alcohólica. Especies de oxígeno reactivas.

Conde de la Rosa L, Moshage H, Nieto N. Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. Rev Esp Enferm Dig 2008; 100: 156-163.

INTRODUCCIÓN

La hepatopatía relacionada con el consumo de alcohol puede clasificarse en tres categorías distintas: hígado gra-

Recibido: 25-10-07.
Aceptado: 31-10-07.

Correspondencia: Natalia Nieto. Department of Medicine. Division of Liver Diseases. Mount Sinai School of Medicine. Box 1123. 1425 Madison Avenue, Room 11-76. 10029 New York, EE.UU. e-mail: laura.condedelaroussa@mssm.edu

ABSTRACT

Acute and chronic alcohol consumption increases the production of reactive oxygen species (ROS), and enhances lipid peroxidation of lipids, proteins, and DNA. The mechanism by which alcohol causes cell injury is still not clear but a major role for ROS and lipid peroxidation-end products is considered. Many pathways have been suggested to play a role on how ethanol induces a state of "oxidative stress", including redox-state changes, acetaldehyde production, damage to mitochondria, membrane injury, apoptosis, ethanol-induced hypoxia, effects on the immune system and altered cytokine production, increased endotoxin levels and activation of Kupffer cells, mobilization of iron, modulation of the antioxidant defense, particularly mitochondrial glutathione (GSH), one electron oxidation of ethanol to 1-hydroxy-ethyl radical, and induction of CYP2E1. These pathways are not exclusive of one another and it is likely that several, indeed many, systems contribute to the ability of ethanol to induce a state of oxidative stress.

Key words: Apoptosis. Cell death. Hepatocyte. Alcoholic liver disease. Reactive oxygen species.

so, hepatitis alcohólica y cirrosis. El hígado graso, que se produce tras la ingesta prolongada de alcohol, es normalmente reversible con la abstinencia y no predispone a padecer ninguna forma crónica de enfermedad hepática, siempre que se mantenga la abstinencia o la moderación (1). La hepatitis alcohólica es una forma aguda de lesión hepática inducida por el alcohol cuyo espectro de gravedad va del desequilibrio asintomático de la bioquímica hepática a la insuficiencia hepática y la muerte. La aparición de una hepatitis alcohólica generalmente implica el consumo de una gran cantidad de alcohol durante un período de tiempo prolongado, a veces de años (2). La ci-

rosis supone la sustitución amplia del parénquima hepático normal por tejido fibroso junto con un remodelado insuficiente de la matriz extracelular, lo que da lugar a manifestaciones clínicas de hipertensión portal e insuficiencia hepática (3).

Los principales sitios en que se metaboliza el alcohol son el hígado y, en menor grado, el tubo digestivo (4). En el hígado, la alcohol-deshidrogenasa (ADH) y el citocromo p450 2E1 (CYP2E1) son las principales vías del metabolismo alcohólico. La ADH es una enzima del citosol hepatocitario que metaboliza el alcohol en acetaldehído (5). El CYP2E1 es una proteína de la membrana microsomal que convierte el alcohol en acetaldehído cuando los niveles de alcohol están lo bastante elevados como para saturar la ADH. El acetaldehído se transforma a su vez en acetato por efecto de una enzima de la matriz mitocondrial, la acetaldehído-deshidrogenasa (6).

La lesión hepática se produce a través de varias vías interrelacionadas. La ADH y la acetaldehído-deshidrogenasa provocan la reducción del NAD en NADH. La alteración del cociente NAD/NADH promueve el hígado graso mediante la inhibición de la gluconeogénesis y la oxidación de los ácidos grasos (7). El CYP2E1, que está regulado al alza en el consumo de alcohol crónico y resulta estabilizado por el propio alcohol, genera radicales libres a través de la oxidación del NADPH en NADP (8). Además, la exposición crónica al alcohol activa los macrófagos hepáticos para que generen factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que posteriormente empuja a la mitocondria a aumentar la producción de especies de oxígeno reactivas (EOR) (9). El estrés oxidativo induce la necrosis y apoptosis del hepatocito (10), ambas elevadas en el paciente alcohólico con pocos antioxidantes del tipo del glutatión (GSH) y la vitamina E (11). Las EOR promueven la peroxidación de los lípidos, lo que induce la inflamación y la fibrosis (12). La inflamación se inicia también por efecto del acetaldehído, que forma conjugados antigenicos al unirse de manera covalente con las proteínas celulares (13). Las primeras alteraciones de la hepatitis alcohólica a nivel histológico se localizan de manera predominante alrededor de la vena central. El alcohol genera un gradiente exagerado de hipoxia desde la vena porta hasta la vena central, lo que indica que la hipoxia inducida por la ingesta crónica de alcohol podría contribuir a la lesión hepática (14).

HEPATOCITOS Y PRODUCCIÓN DE EOR

El estrés oxidativo se debe a un desequilibrio entre los mecanismos prooxidantes y antioxidantes que conduce a la lesión celular y que parece implicado en enfermedades hepáticas tales como la hepatitis viral crónica, la hepatitis alcohólica, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la cirrosis y la colestasis crónica (15,16). Las EOR comprenden diversas especies, como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (HO).

Algunas de estas especies (por ejemplo, O_2^- y HO) son radicales libres, pues contienen electrones desemparejados, por lo que son extremadamente inestables; otras, como el H_2O_2 , son muy difundibles y relativamente estables. Las fuentes endógenas de EOR en los hepatocitos son el daño mitocondrial, la xantina-oxidasa, el metabolismo del citocromo P450, los peroxisomas y la NADPH-oxidasa.

Las fuentes de energía como la glucosa se metabolizan en el citoplasma inicialmente. Los productos se incorporan a las *mitocondrias*, que prosiguen con el catabolismo a través de vías metabólicas como el ciclo de la oxidación de ácidos grasos y la oxidación de aminoácidos (17). El resultado final de estas vías es la producción de dos donantes de electrones muy energéticos, el NADH y el FADH₂. Los electrones de estos donantes se transfieren a través de una cadena de transporte electrónico hasta el O_2 , que se ve reducido para formar agua (18,19). Este es un proceso *redox* de múltiples pasos que tiene lugar en la membrana mitocondrial interna (20-22). Las enzimas que catalizan estas reacciones tienen la notable habilidad de crear de manera simultánea un gradiente de protones a través de la membrana (23). Aunque el transporte electrónico es muy eficiente, un pequeño porcentaje de electrones se escapan de manera prematura al O_2 , dando lugar a la formación del radical libre O_2^- , que es tóxico (23). En condiciones normales, el O_2^- se difundirá apenas hacia el citosol y se verá sometido a dismutación para producir H_2O_2 , que es capaz de atravesar la membrana mitocondrial (23). Sin embargo, en caso de lesión hepática por daño de la membrana mitocondrial, el O_2^- puede difundirse hacia el citosol, desencadenando la cascada siguiente de reacciones mediadas por EOR (24).

La *xantina-oxidasa* es una enzima hidroxilante citosólica que contiene molibdeno y hierro y que interviene en la degradación de los nucleótidos del tipo de la purina. La xantina-oxidasa cataliza la oxidación de la hipoxantina en xantina y puede seguir catalizando la oxidación de la xantina en ácido úrico (25), generando EOR en el proceso.

Muchas vías se han señalado como responsables de la capacidad del etanol para inducir estrés oxidativo. Una vía central es la inducción del CYP2E1, miembro del citocromo P450, un sistema de oxidases de función mixta. El CYP2E1 tiene interés por su capacidad de metabolizar y activar muchos sustratos toxicológicos, incluido el etanol, en productos tóxicos más reactivos (12,26-30). Los niveles de CYP2E1 aparecen elevados en diversas condiciones fisiológicas y fisiopatológicas y tras el tratamiento alcohólico agudo y crónico. El CYP2E1 es también un eficaz generador de EOR, como el radical O_2^- y el H_2O_2 , y en presencia de catalizadores férricos produce potentes oxidantes, como el radical hidroxilo y el radical 1-hidroxietilo (31).

Los *peroxisomas* contienen enzimas oxidativas, como D-aminoácido-oxidasa y ácido úrico-oxidasa. Ciertas enzimas del peroxisoma quitan, mediante el O_2 , átomos de H a determinados sustratos orgánicos en una reacción oxidativa que produce H_2O_2 . La catalasa usa el H_2O_2 para

oxidar otros sustratos, incluidos los fenoles, el ácido fórmico, el formaldehído y el alcohol, eliminando así el H₂O₂ en el proceso (32). Esta reacción es importante en los hepatocitos, cuyos peroxisomas detoxifican varias sustancias tóxicas que ingresan en el torrente sanguíneo. Alrededor del 25% del etanol se oxida en acetaldehído de esta manera (33). Además, cuando un exceso de H₂O₂ se acumula en la célula, la catalasa lo convierte en H₂O mediante esta reacción. Una de las funciones principales del peroxisoma es la β-oxidación de los ácidos grasos, por la que estos se rompen por dos carbonos al mismo tiempo y se convierten en acetil-CoA, que se devuelve al citosol para usos futuros (34). La β-oxidación también puede producirse en las mitocondrias.

El complejo de la *NADPH-oxidasa*, aunque no se ha descrito en el hepatocito, sí está ampliamente expresado en los macrófagos, las células de Kupffer, las células estrelladas y los neutrófilos, elementos todos ellos que desempeñan papeles fundamentales en la hepatopatía alcohólica (HA) (35). El complejo de la NADPH-oxidasa está normalmente latente y se activa y ensambla en las membranas durante el estallido respiratorio. Genera O₂^{·-} al transferir electrones del NADPH del interior celular al otro lado de la membrana y acoplarlos al O₂ para producir O₂^{·-}. Las EOR también se pueden producir en los hepatocitos por sustancias exógenas, como toxinas ambientales, xenobióticos, radiación, luz ultravioleta e iones metálicos y por el metabolismo de fármacos.

El estrés oxidativo puede contrarrestarse por la defensa antioxidante del hepatocito, que induce mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos. Entre las defensas antioxidantes de tipo enzimático están: a) la *superóxido-dismutasa* (SOD), localizándose la SOD1 en el citosol y en el espacio intermembranoso mitocondrial, la SOD2 en las mitocondrias y la SOD3 en el medio extracelular, donde interactúa con los componentes de la matriz (36). Las tres isoformas dismutan el O₂^{·-} en H₂O₂ y O₂; b) la *catalasa* es una enzima que contiene hierro y que se encuentra en los peroxisomas; su función es eliminar el H₂O₂ generando H₂O y O₂ (37); y c) la *glutatión-peroxidasa* y *glutatión-reductasa*, que, empleando el cofactor NADPH, son capaces de descomponer el H₂O₂ al tiempo que oxidan el glutatión (37).

Los mecanismos de defensa antioxidante de tipo no enzimático son: a) el *glutatión* (GSH), un tripéptido (γ -glutamilcisteinilglicina) sintetizado en el citosol mediante un proceso bifásico que consume energía y que se distribuye por distintas organelas, como el retículo endoplásmico, el citosol y las mitocondrias. El glutatión se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, pues la enzima que lo pasa de su forma oxidada (GSSG) a su forma reducida (GSH), la glutatión-reductasa, es constitutivamente activa e inducible en caso de estrés oxidativo. De hecho, el cociente entre GSH y GSSG en el interior de las células se usa normalmente como medida de la toxicidad celular. El GSH detoxifica las EOR producidas en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La deplección del GSH mitocon-

drial puede comprometer la función mitocondrial y sensibiliza a la toxicidad inducida por distintos oxidantes, conduciendo a la muerte celular (38); b) las *proteínas fijadoras de metales* ayudan a que el hierro y el cobre permanezcan en situación no reactiva y eviten la formación de radicales hidroxilo. La transferrina y la lactoferrina se unen al hierro mientras que la albúmina se fija al cobre; y c) las *vitaminas* como la vitamina C (ascorbato), la E (α -tocoferol) y los carotínicos (precursores de la vitamina A) actúan como barreras de radicales libres (12,39). Los tocopheroles y los flavonoides inhiben la peroxidación actuando como barrenadores que rompen las cadenas de los radicales peróxido. Por último, otras moléculas, como la bilirrubina, la melatonina y el ácido úrico son antioxidantes naturales (40,41).

MUERTE HEPATOCITARIA EN LA HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA

En la hepatopatía aguda y crónica, los hepatocitos se ven expuestos a niveles crecientes de EOR, citocinas y ácidos biliares. Aunque los hepatocitos tienen una buena capacidad detoxificante, la sobreexposición a niveles altos de EOR puede desorganizar su situación *redox* dando lugar a la muerte celular (necrosis y/o apoptosis). La necrosis es un mecanismo pasivo en la depleción de ATP, rotura de la membrana plasmática y salida del contenido celular, lo que estimula la inflamación (42); en cambio, la apoptosis, o muerte celular programada (42-44), es un proceso activo caracterizado por hinchazón mitocondrial, condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y finalmente activación de las caspasas (45-47). La apoptosis representa una forma regulada de muerte celular que tiene importancia en procesos tales como la selección celular durante el desarrollo, las respuestas inmunológicas y la homeostasis. La regulación de la muerte celular apoptótica permite utilizar determinadas estrategias terapéuticas. Los modos más importantes de respuesta apoptótica en los hepatocitos estimulados por EOR son: a) la apoptosis mediada por receptores de muerte; y b) la apoptosis mediada por mitocondrias.

Apoptosis mediada por receptores de muerte

En la apoptosis mediada por receptores de muerte, los ligandos de muerte de las células efectoras, como el ligando Fas (FasL3, CD95, Apo1), el TNF- α o el ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL) se unen a los receptores de muerte expresados en la superficie de la célula objetivo. Tras la unión a estos receptores de muerte se reclutan las moléculas adaptadoras intracelulares, que pueden a su vez asociarse a las caspasas iniciadoras a través de interacciones con el dominio efectivo de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de caspasas, lo que lleva a su activación y pone en marcha la cascada de las caspasas, que finalmente conduce a la muerte celular.

Los hepatocitos expresan Fas (CD95) pero no ligando Fas. La expresión de Fas está muy aumentada en los hígados de los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (48) o en los de los ratones cargados de grasa (49). Además, determinados fármacos, el abuso del alcohol y la enfermedad de Wilson, que elevan la producción de EOR, hacen que se exprese el ligando Fas en los hepatocitos, lo que lleva a la apoptosis (50). Los hepatocitos expresan también el receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1), el receptor 2 de TRAIL (TRAIL-R2) y el receptor de tipo 1 del factor de necrosis tumoral (TNF α -R1) (51). A diferencia del Fas, el TRAIL-R1 y el TRAIL-R2, la señalización intracelular mediada por el TNF-R1 es más compleja, ya que activa señales tanto apoptóticas como de supervivencia. Los pacientes con EHNA tienen niveles hepáticos altos de ARNm de TNF- α y de expresión de TNF-R1 (52). Al activarse el TNF- α , la trimerización del TNF-R1 va seguida del reclutamiento de la proteína adaptadora llamada "proteína asociada al receptor de TNF con dominio de muerte" (TRADD). La TRADD recluta el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y es también capaz de activar vías de supervivencia como las del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y las proteína-cinásas activadas por mitógenos (MAPK). El FADD contiene un dominio efector de muerte que, a través de un complejo de señalización inductor de muerte (DISC), media en el reclutamiento de las caspasas 8 y 10, activando la cascada de señalización de muerte. La caspasa 8 activa está involucrada en la escisión y activación de la caspasa 3 efectora, la molécula ejecutora central, pues escinde diversas proteínas, desmantelando así importantes procesos celulares de tipo estructural y de reparación.

Mitocondrias y apoptosis

La liberación de proteínas tóxicas desde el espacio intermembranoso de las mitocondrias, desencadenada por la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, constituye un "punto sin retorno" en la mayoría de los casos de apoptosis. Miembros de la familia Bcl-2 controlan este proceso férreamente: al llegar las señales apoptóticas, las proteínas proapoptóticas Bcl-2, como la Bax y la Bak, se activan, dando lugar a una mayor permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (53-55). En cambio, los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, como el Bcl-2 y el Bcl-X_L, pueden evitar esto mediante su heterodimerización con las proteínas de tipo Bax. Otras proteínas proapoptóticas Bcl-2 que sólo contienen el dominio BH₃ (p. ej. Bad, Bid, Bim, Bmf y Noxa) actúan oponiéndose al efecto inhibidor de Bcl-2 o Bcl-X_L, o activando proteínas de tipo Bax mediante uniones directas (56).

Un segundo mecanismo de permeabilización de la membrana mitocondrial externa es la apertura de un poro de transición de permeabilidad en la membrana mitocondrial interna. Esto permite el paso de agua y moléculas

pequeñas (de hasta 1,5 kDa) a través del poro, lo que lleva a la tumefacción del espacio intermembranoso y la rotura de la membrana mitocondrial externa. La primera proteína liberada de las mitocondrias ante los estímulos apoptóticos es el citocromo *c*, un componente esencial de la cadena respiratoria. Al liberarse hacia el citoplasma forma, en presencia de ATP, el llamado "apoptosoma" junto con el Apaf-1 y la caspasa 9, desencadenando la clásica cascada apoptótica y conduciendo a la muerte celular por apoptosis (57-60). La función catalítica del citocromo *c* se ve salvaguardada por miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis, que a su vez están controladas por otras dos proteínas mitocondriales, la Smac/DIABLO y la OMI/HtrA2 (61). De esta manera, la OMI/HtrA2 interviene en la muerte celular dependiente de caspasas, pero también puede actuar como proteína efectora en la apoptosis de tipo necrosis. El factor inductor de apoptosis (FIA) es una proteína mitocondrial que desempeña un papel decisivo en la apoptosis; normalmente permanece en el espacio intermembranoso mitocondrial, donde ejerce una función de óxido-reductasa. De forma parecida al papel bifuncional del citocromo *c*, el FIA induce la muerte celular cuando se libera en el citosol; después se transloca al núcleo y desencadena, posiblemente junto con la endonucleasa G, la condensación de la cromatina periférica y la pérdida del ADN de alto peso molecular (50 kb). Los efectos letales del FIA están controlados por la proteína antiapoptótica llamada "proteína del choque térmico 70", que interactúa con el FIA y protege de sus efectos apoptóticos (61).

VÍAS DE SUPERVIVENCIA HEPATOCITARIA EN LA HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA

Entre las vías de señalización que se activan en respuesta a la lesión oxidante, las de la hemo-oxigenasa, la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), p38, PI3K y NF- κ B se consideran vías de supervivencia, mientras que la de la cinasa aminoterminal C-jun (JNK) se asocia normalmente a la apoptosis.

Vía de señalización del factor nuclear kappa B (NF- κ B)

El NF- κ B es un factor de transcripción heterodimérico y ubicuo que aparece secuestrado en el citoplasma por proteínas de la familia I κ B (62). El I κ B está regulado por un complejo proteico que comprende dos cinasas, IKK α e IKK β , ambas capaces de fosforilar el I κ B, y una subunidad reguladora IKK γ (NEMO). La fosforilación y degradación del I κ B libera el NF- κ B y expone una secuencia de localización nuclear, lo que lleva a la translocación del NF- κ B al núcleo. Una vez en el núcleo, el NF- κ B se une a los puntos de unión κ B en los promotores de los genes diana, induciendo su transcripción. El NF- κ B es activado por citocinas inflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β , el estrés oxi-

dativo (63), la endotoxina (LPS) (64), la proteína-cinasa C (PKC) y la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). La vía de señalización del NF-κB se ha descrito que antagoniza la muerte hepatocitaria al influir en el equilibrio entre señales pro- y antiapoptóticas. El NF-κB inhibe la acumulación de EOR inducida por el TNF-α que normalmente media en la activación prolongada de la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) y la muerte celular (65). Ciertamente, la inhibición de la actividad del NF-κB induce la apoptosis en los hepatocitos, lo que indica su papel en la transcripción de los genes antiapoptóticos (66).

Vías de señalización de las proteína-cinasas activadas por mitógenos (MAPK)

La cascada de las MAPK comprende una proteína-cinasa-cinasa-activada por mitógenos (MAPKKK), una proteína-cinasa-cinasa activada por mitógenos (MAPKK) y la MAPK. En la gran familia de las MAPK se han identificado tres subgrupos: la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), la MAPK p38 y la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), que se ha visto que se activan por efecto de las EOR y afectan a la supervivencia celular (67). La ERK1/2 y la MAPK p38 se han relacionado con la supervivencia celular, mientras que la JNK se ha vinculado con la muerte celular (10,68). El equilibrio entre las activaciones de ERK1/2, p38 y JNK es crucial para determinar el destino de la célula entre la muerte y la supervivencia. La inhibición de la activación de la JNK mediante inhibidores específicos o mutantes dominantes-negativos para JNK suprime la apoptosis.

Vía de señalización de la fosfoinositida-3-cinasa (PI3K)/Akt

La familia de la PI3-cinasa es una superfamilia que comprende tres clases distintas de enzimas vinculadas con la supervivencia celular. Las enzimas de la clase I se han clasificado y subdividido en dos grupos de PI3-cinasas: IA y IB. La subunidad catalítica de la clase IA interactúa con proteínas adaptadoras y está implicada en la activación por receptores de factores de crecimiento (p. ej. el receptor del factor de crecimiento epidérmico: EGF-R), mientras que la clase IB es necesaria para los sistemas de receptores acoplados a la proteína G (69). La PI3-cinasa de clase I reside principalmente en el citosol hasta que es reclutada por los complejos señalizadores activos de la membrana plasmática, donde están involucrados en la generación de fosfoinositidas 3'-fosforiladas que funcionan como intermediarios señalizadores en las cascadas de transducción de señales. Las dianas de PI3K, como la serina-cinasa Akt, también conocida como proteína-cinasa B, se han asociado a la inhibición de la apoptosis de diversas maneras (70,71). La vía de la PI3K/Akt transduce las señales de supervivencia a través

de procesos de fosforilación y regula factores pro- y antiapoptóticos tales como la BAD, la caspasa 9 y la IKK α . Se ha comunicado que la Akt activa la fosforilación de la ERK1/2 y el NF-κB e inhibe la de la JNK y la Bax, protegiendo así frente a la rotura mitocondrial y la apoptosis (72,73). Se ha descrito la comunicación cruzada entre las vías pro- y antiapoptóticas, como es el caso de las vías de la PI3K/Akt y de la JNK, que modularía el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celulares.

Señalización por la familia Src

Las proteína-tirosina-cinasas de la familia Src son proteínas reguladoras intermedias que desempeñan papeles importantes en la diferenciación, la motilidad, la proliferación y la supervivencia. La Src activa la vía antiapoptótica PI3K/Akt en las líneas celulares de los tumores de colon humanos (74). Además, la Src aumenta la expresión de Bcl-X_L en las células epiteliales del intestino de rata (75). El factor de crecimiento transformador β (TGF-β) regula el crecimiento del hepatocito, inhibiendo la proliferación e induciendo la apoptosis; también activa la vía PI3-k/Akt en los hepatocitos por un mecanismo dependiente del receptor de EGF y la actividad de c-Src (76).

Hemo-oxigenasa

La hemo-oxigenasa (HO) cataliza la oxidación del hemo para producir cantidades equimolares de hierro ferroso, monóxido de carbono (CO) y biliverdina, que se convierte rápidamente en bilirrubina por la acción de la NAD(P)H:biliverdina-reductasa. Se han descrito tres isoformas distintas de la HO (77). Estas isozimas son producto de distintos genes y difieren en su distribución tisular y propiedades moleculares. La isoforma HO-2 se expresa de manera constitutiva y está presente con niveles elevados en el cerebro y el testículo (78). La HO-3 tiene actividad catalítica y actúa como proteína fijadora de hemo (79). En cambio, la HO-1 está distribuida por todas partes y es muy inducible por diversos estímulos distintos, la mayoría asociados al estrés oxidativo (80). La HO-1 puede actuar como sistema de defensa inducible frente al estrés oxidativo; p. ej. en modelos de inflamación, isquemia-reperfusión, hipoxia y lesiones mediadas por hiperoxia (81). En el hígado, la inducción de la HO-1 protege de la lesión de isquemia/reperfusión (82,83) y la endotoxemia (84,85). Además, la sobreexpresión de HO-1 por transferencia génica se ha visto que protege frente a la hiperoxia inducida por lesiones pulmonares (86) y el daño hepático apoptótico de mediación inmunitaria en el ratón (87). Sin embargo, los mecanismos por los que la HO-1 media en la citoprotección no se han descubierto aún. Se han observado los efectos protectores de la biliverdina y el CO (10) y varios estudios indican que la biliverdina protege del es-

trés oxidativo actuando como antioxidante en diferentes modelos de lesión hepática (88,89).

A pesar de estos mecanismos de detoxificación tan eficientes, la sobreexposición a niveles elevados de EOR produce estrés oxidativo y muerte celular. En condiciones de estrés oxidativo, el modo de la muerte celular (apoptosis o necrosis) depende principalmente de la variedad de EOR y del tipo celular. En las hepatopatías crónicas, como las hepatitis alcohólica y viral (16,90,91), la EHNA (92-94) y la colestasis, los hepatocitos se exponen invariablemente al estrés oxidativo causado por las distintas EOR, lo que incluye daño celular y la posterior muerte hepatocitaria con pérdida de la función hepática. Por tanto, conocer mejor los mecanismos celulares que controlan la muerte de las células hepáticas es clínica y científicamente significativo para identificar los objetivos del desarrollo de nuevas terapéuticas con que tratar las enfermedades hepáticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Mundt B, Wirth T, Zender L, Waltemathe M, Trautwein C, Manns MP, et al. Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces hepatic steatosis in viral hepatitis and after alcohol intake. *Gut* 2005; 54 (11): 1590-6.
- Reuben A. Alcohol and the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23 (3): 283-91.
- Menon KV, Kamath PS. Managing the complications of cirrhosis. *Mayo Clin Proc* 2000; 75 (5): 501-9.
- Wilfred de Alwis NM, Day CP. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2007; 27 (1): 44-54.
- Lieber CS. Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34 (1): 9-19.
- Siegmund SV, Brenner DA. Molecular pathogenesis of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29 (Supl. 11): 102S-9S.
- Saheki T, Kobayashi K, Iijima M, Moriyama M, Yazaki M, Takei Y, et al. Metabolic derangements in deficiency of citrin, a liver-type mitochondrial aspartate-glutamate carrier. *Hepatol Res* 2005; 33 (2): 181-4.
- Cederbaum AI. Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol* 2003; 30 (2): 115-20.
- Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Mari M, Miranda M, et al. Oxidative stress: Role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 1998; 8 (1-2): 7-11.
- Conde de la Rosa L, Schoemaker MH, Vrenken TE, Buist-Homan M, Havinga R, Jansen PL, et al. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: Involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J Hepatol* 2006; 44 (5): 918-29.
- Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34 (1): 1-10.
- Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatol* 2002; 35 (1): 62-73.
- Heller JI, Crowley JR, Hazen SL, Salvay DM, Wagner P, Pennathur S, et al. p-hydroxyphenylacetaldehyde, an aldehyde generated by myeloperoxidase, modifies phospholipid amino groups of low density lipoprotein in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem* 2000; 275 (14): 9957-62.
- Venkatarman A, Shiva S, Davis AJ, Bailey SM, Brookes PS, Rley-Usmar VM. Chronic alcohol consumption increases the sensitivity of rat liver mitochondrial respiration to inhibition by nitric oxide. *Hepatol* 2003; 38 (1): 141-7.
- Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol* 2001; 121 (3): 710-23.
- Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterol* 2002; 122 (2): 366-75.
- Lang C, Schafer M, Serra D, Hegardt F, Krahenbuhl L, Krahenbuhl S. Impaired hepatic fatty acid oxidation in rats with short-term cholestasis: Characterization and mechanism. *J Lipid Res* 2001; 42 (1): 22-30.
- Packer L, Maguire JJ, Mehlhorn RJ, Serbinova E, Kagan VE. Mitochondria and microsomal membranes have a free radical reductase activity that prevents chromanoxyl radical accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159 (1): 229-35.
- Maguire JJ, Wilson DS, Packer L. Mitochondrial electron transport-linked tocopheroxyl radical reduction. *J Biol Chem* 1989; 264 (36): 21462-5.
- Degli-Esposti M, Ballester F, Timoneda J, Crimi M, Lenaz G. The oxidation of ubiquinol by the isolated Rieske iron-sulfur protein in solution. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283 (2): 258-65.
- Trumpower BL. New concepts on the role of ubiquinone in the mitochondrial respiratory chain. *J Bioenerg Biomembr* 1981; 13 (1-2): 1-24.
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985; 237 (2): 408-14.
- Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M, et al. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex I is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr* 2006; 38 (1): 33-42.
- Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134 (3): 707-16.
- Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des* 2005; 11 (32): 4145-51.
- Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. Increased expression of cytochrome P450 2E1 induces heme oxygenase-1 through ERK MAPK pathway. *J Biol Chem* 2003; 278 (32): 29693-700.
- Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. Heme oxygenase-1 protects HepG2 cells against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity. *Free Radic Biol Med* 2004; 36 (3): 307-18.
- Nieto N, Mari M, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1 responsiveness in the promoter of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit. *Hepatology* 2003; 37 (1): 96-106.
- Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277 (12): 9853-64.
- Mari M, Wu D, Nieto N, Cederbaum AI. CYP2E1-dependent toxicity and up-regulation of antioxidant genes. *J Biomed Sci* 2001; 8 (1): 52-8.
- Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicol Sci* 2006; 89 (2): 515-23.
- Datta NJ, Namasivayam A. In vitro effect of methanol on folate-deficient rat hepatocytes. *Drug Alcohol Depend* 2003; 71 (1): 87-91.
- Ceni E, Crabb DW, Foschi M, Mello T, Tarocchi M, Patussi V, et al. Acetaldehyde inhibits PPARgamma via H2O2-mediated c-Abl activation in human hepatic stellate cells. *Gastroenterol* 2006; 131 (4): 1235-52.
- Makkar RS, Contreras MA, Paintlia AS, Smith BT, Haq E, Singh I. Molecular organization of peroxisomal enzymes: Protein-protein interactions in the membrane and in the matrix. *Arch Biochem Biophys* 2006; 451 (2): 128-40.
- Kono H, Rusyn I, Uesugi T, Yamashina S, Connor HD, Dikalova A, et al. Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280 (5): G1005-12.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (3): 337-49.
- Chang P, Cheng E, Brooke S, Sapolsky R. Marked differences in the efficacy of post-insult gene therapy with catalase versus glutathione peroxidase. *Brain Res* 2005; 1063 (1): 27-31.
- Fernández-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: Transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204 (3): 263-73.

39. Nieto N. Ethanol and fish oil induce NFκappaB transactivation of the collagen alpha2(I) promoter through lipid peroxidation-driven activation of the PKC-PI3K-Akt pathway. *Hepatol* 2007; 45 (6): 1433-45.
40. Sudnikovich EJ, Maksimchik YZ, Zabrodskaya SV, Kubyshin VL, Lapshina EA, Bryszewska M, et al. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur J Pharmacol* 2007.
41. Abraham NG, Asija A, Drummond G, Peterson S. Heme oxygenase - 1 gene therapy: Recent advances and therapeutic applications. *Curr Gene Ther* 2007; 7 (2): 89-108.
42. Nieminen AL. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int Rev Cytol* 2003; 224: 29-55.
43. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157 (5): 1415-30.
44. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM. Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 1998; 78 (8): 893-913.
45. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281 (5381): 1312-6.
46. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002; 9 (3): 459-70.
47. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5 (11): 897-907.
48. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol* 2003; 125 (2): 437-43.
49. Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 2003; 39 (6): 978-83.
50. Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, et al. Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat Med* 1998; 4 (5): 588-93.
51. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004; 52 (6): 821-31.
52. Crespo J, Cayon A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34 (6): 1158-63.
53. Feldmann G, Haouzi D, Moreau A, Durand-Schneider AM, Bringuer A, Berson A, et al. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatol* 2000; 31 (3): 674-83.
54. Kirkland RA, Windelborn JA, Kasprzak JM, Franklin JL. A Bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death. *J Neurosci* 2002; 22 (15): 6480-90.
55. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 2001; 153 (6): 1265-76.
56. Rong Y, Distelhorst CW. Bcl-2 protein family members: Versatile regulators of calcium signalling in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 2007.
57. Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 1999; 274 (32): 22686-92.
58. Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 2000; 275 (9): 6067-70.
59. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91 (4): 479-89.
60. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90 (3): 405-13.
61. Belisario JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M, Sesso A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40 (8): 1011-24.
62. Mercurio F, Manning AM. NF-κappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 1999; 18 (45): 6163-71.
63. Flohé L, Brigelius-Flohé R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-κappa B activation. *Free Radic Biol Med* 1997; 22 (6): 1115-26.
64. Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-κappa B system: A key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278 (3): C451-62.
65. Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, et al. NF-κappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J* 2003; 22 (15): 3898-909.
66. Bellas RE, Fitzgerald MJ, Fausto N, Sonenshein GE. Inhibition of NF-κappa B activity induces apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 151 (4): 891-6.
67. Yu G, Peng T, Feng Q, Tyml K. Abrupt reoxygenation of microvascular endothelial cells after hypoxia activates ERK1/2 and JNK1, leading to NADPH oxidase-dependent oxidant production. *Microcirculation* 2007; 14 (2): 125-36.
68. Yoon SO, Yun CH, Chung AS. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 2002; 123 (12): 1597-604.
69. Foster FM, Traer CJ, Abraham SM, Fry MJ. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* 2003; 116 (Pt. 15): 3037-40.
70. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13 (22): 2905-27.
71. Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 1999; 401 (6748): 33-4.
72. Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001; 21 (3): 893-901.
73. Yuan ZQ, Feldman RI, Sussman GE, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: Implication of AKT2 in chemoresistance. *J Biol Chem* 2003; 278 (26): 23432-40.
74. Windham TC, Parikh NU, Siwak DR, Summy JM, McConkey DJ, Kraker AJ, et al. Src activation regulates anoikis in human colon tumor cell lines. *Oncogene* 2002; 21 (51): 7797-807.
75. Coll ML, Rosen K, Lameda V, Filmus J. Increased Bcl-xL expression mediates v-Src-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21 (18): 2908-13.
76. Murillo MM, del Castillo G, Sánchez A, Fernández M, Fabregat I. Involvement of EGF receptor and c-Src in the survival signals induced by TGF-β1 in hepatocytes. *Oncogene* 2005; 24 (28): 4580-7.
77. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006; 86 (2): 583-650.
78. Wunder C, Potter RF. The heme oxygenase system: Its role in liver inflammation. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003; 3 (3): 199-208.
79. Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, et al. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004; 336 (2): 241-50.
80. Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1: Redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4 (5): 749-58.
81. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signalling pathways: Regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-5 (1-2): 249-63.
82. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999; 104 (11): 1631-9.
83. Rensing H, Bauer I, Datene V, Patau C, Pannen BH, Bauer M. Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med* 1999; 27 (12): 2766-75.
84. Kyokane T, Norimizu S, Taniai H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 2001; 120 (5): 1227-40.

85. Dorman RB, Bajt ML, Farhood A, Mayes J, Jaeschke H. Heme oxygenase-1 induction in hepatocytes and non-parenchymal cells protects against liver injury during endotoxemia. *Comp Hepatol* 2004; 3 (Supl. 1): S42.
86. Otterbein LE, Kolls JK, Mantell LL, Cook JL, Alam J, Choi AM. Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J Clin Invest* 1999; 103 (7): 1047-54.
87. Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, et al. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatol* 2003; 38 (4): 909-18.
88. Fondevila C, Shen XD, Tsuchiya S, Yamashita K, Csizmadia E, Lassman C, et al. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatol* 2004; 40 (6): 1333-41.
89. Sass G, Seyfried S, Parreira Soares M, Yamashita K, Kaczmarek E, Neuhuber WL, et al. Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatol* 2004; 40 (5): 1128-35.
90. Wang T, Weinman SA. Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 (Supl. 3): S34-7.
91. Korenaga M, Wang T, Li Y, Showalter LA, Chan T, Sun J, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* 2005; 280 (45): 37481-8.
92. García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: Studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 1995; 48 (5): 825-34.
93. García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione: Hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 (Supl. 3): S3-6.
94. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; 6 (1): 1-28.