

## Apoptosis y autofagia en las células estrelladas. Un nuevo potencial de los tocotrienoles en reducir la fibrogénesis asociada a la pancreatitis crónica

Alejandro Ropolo, María I Vaccaro

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Acta Gastroenterol Latinoam 2007;37:259-262

### Los tocotrienoles inducen apoptosis y autofagia en células estrelladas de páncreas de rata a través de una vía de muerte mitocondrial

Rickmann M, Vaquero EC, Malagelada JR, Molero X. Tocotrienols induce apoptosis and autophagy in rat pancreatic stellate cells through the mitochondrial death pathway. *Gastroenterology* 2007;132:2518-2532.

#### Resumen

**Objetivo:** la eliminación selectiva de células estrelladas pancreáticas (PSC) activadas a través de la inducción de su propia muerte programada es un objetivo de interés terapéutico en pacientes con pancreatitis crónica. En este trabajo se investigaron los efectos de los tocotrienoles sobre la muerte de PSC activadas. **Materiales y métodos:** PSC activadas y quiescentes, y células acinares de páncreas de rata fueron tratadas con diferentes derivados de la vitamina E,  $\alpha$ -tocoferol,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocotrienoles, y una fracción rica en tocotrienoles de aceite de palma. **Resultados:** la fracción rica en tocotrienoles (TRF), pero no  $\alpha$ -tocoferol, redujo la viabilidad de PSC activadas mediante el establecimiento de un programa de muerte, independiente de la regulación del ciclo celular. Las PSC activadas murieron por apoptosis, como fue indicado por un incremento en la fragmentación de ADN y la activación de caspasas, y a través de autofagia, como demostró la formación de vacuolas autofágicas y la acumulación de LC3-II. En

contraste con los  $\alpha$ -tocoferoles, la TRF causó una intensa y sostenida despolarización de la membrana mitocondrial y una gran liberación de citocromo c. La inhibición de caspasas con zVAD-fmk suprimió la apoptosis inducida por tocotrienoles pero amplificó la autofagia. Sin embargo, el bloqueo del poro de transición de permeabilidad mitocondrial con ciclosporina A abolió completamente los efectos letales de los tocotrienoles sobre las PSC. La inducción de muerte por tocotrienoles fue restringida a las PSC activadas, ya que no causó apoptosis ni en las PSC quiescentes ni en las células acinares. **Conclusiones:** los tocotrienoles gatillan selectivamente la muerte de PSC activadas actuando sobre el poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Los hallazgos revelan un nuevo potencial para los tocotrienoles en reducir la fibrogénesis asociada a la pancreatitis crónica.

#### Introducción

A continuación se describen y comentan los resultados más relevantes del trabajo seleccionado. Se provee también una sintética explicación actualizada del mecanismo y significado de la autofagia.

La pancreatitis crónica conlleva a un compromiso severo de la función pancreática a través de un proceso fibrogénico dinámico en el cual una matriz celular anómala reemplaza al tejido pancreático normal. La enfermedad tiende a ser una condición progresiva y algunas veces dolorosa involucrando tanto una insuficiencia exocrina como endocrina. Hasta el momento ningún tratamiento ha demostrado ser efectivo para poner fin al proceso fibrogénico o mejorar el curso de la enfermedad. La identificación de las células estrelladas pancreáticas (PSC) como el

**Correspondencia:** María I Vaccaro  
Paraguay 2155 (1121). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.  
Tel: 5950 9500 - int 2127  
E-mail: mvaccaro@fmed.uba.ar

principal tipo celular responsable de la expansión de la matriz durante la fibrogénesis pancreática<sup>1,2</sup> ha incrementado las posibilidades de una intervención terapéutica para la pancreatitis crónica. En el páncreas normal las PSC quiescentes almacenan vitamina A y expresan ciertos citofilamentos. Durante una respuesta no específica a la agresión, las PSC "sienten" el daño y se transdiferencian a un fenotipo parecido a los miofibroblastos, con una alta proliferación y con producción de matriz (PSC activadas). Si la actividad formadora de matriz no cesa después que la reparación pancreática ha finalizado, la fibrogénesis continuará hasta que el páncreas sea completamente destruido.

La persistencia aberrante de las PSC activadas en páncreas durante una agresión crónica es reconocida como un paso clave en la fibrogénesis pancreática.<sup>1,2</sup> Este hallazgo abrió un nuevo campo en la terapéutica de la pancreatitis crónica que busca reducir la supervivencia de las PSC activadas. Aunque la mayoría de los esfuerzos han sido dirigidos a suprimir la activación de las PSC, existe buena evidencia de que la "promoción" de la muerte de las PSC activadas sería una estrategia racional para las terapias antifibrogénicas.<sup>3,4</sup>

Si bien no existen muchos estudios sobre el potencial antifibrogénico de los tocotrienoles, el reconocimiento de estas isoformas de la vitamina E como moléculas anticancerígenas tanto *in vitro* como *in vivo*,<sup>5,6</sup> condujo a los autores a proponer la hipótesis de que estas moléculas podrían frenar a las PSC activadas. Aunque las PSC no son células cancerígenas, su fenotipo transdiferenciado les otorga características de células transformadas. Debido a esto, los autores proponen que el estatus activado convertiría a las PSC en posibles víctimas de la citotoxicidad de los tocotrienoles.

Los tocotrienoles están presentes en las fibras de arroz, los granos de cereal, y son particularmente abundantes en el aceite de palma. En este estudio, además de las diferentes isoformas del tocotrienol, se examinó una fracción rica en tocotrienoles (TRF) extraída de aceite de palma crudo. Esta fracción rica en tocotrienoles también contiene cerca de un 10 % de  $\alpha$ -tocoferol. El  $\alpha$ -tocoferol fue también incluido en los ensayos de comparación debido a que su uso extensivo ha llevado a las engañosas conclusiones acerca de los efectos terapéuticos de la vitamina E. Además, su uso clínico como antifibrogénico no ha generado gran entusiasmo, a pesar de que el  $\alpha$ -tocoferol o sus derivados sintéticos han demostrado con-

vincentes efectos antifibrogénicos en cultivos de células estrelladas pancreáticas<sup>7</sup> y hepáticas,<sup>8</sup> así como en modelos animales de fibrosis pancreática<sup>9</sup> y hepática.<sup>10</sup>

Los tocotrienoles poseen propiedades no abarcadas por el tocoferol, como su habilidad para inducir apoptosis en células cancerígenas.<sup>11</sup> En este trabajo los autores demuestran que los tocotrienoles del aceite de palma claramente reducen la viabilidad de las PSC en una manera dependiente de la dosis y el tiempo. Este efecto citotóxico contrasta con la ineffectividad del  $\alpha$ -tocoferol, el cual no causó ninguna disminución de la viabilidad celular aún después de aumentar la dosis o extender la incubación hasta 3 días. Estos datos confirman las diferencias críticas entre tocotrienoles y el  $\alpha$ -tocoferol, y prueban la citotoxicidad de los tocotrienoles sobre las PSC activadas. Este efecto citotóxico de los tocotrienoles no fue asociado a una disminución de la proliferación de las PSC activadas, sino a la puesta en marcha de un programa de muerte celular.

La mitocondria integra las señales de muerte que coordinan y deciden el destino de una célula. Un evento clave en este proceso es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, la cual causa la liberación de factores que residen en el espacio intermembrana mitocondrial y promueve la muerte celular por apoptosis mediada por activación de caspasas. En este estudio los autores muestran que los tocotrienoles activan la vía mitocondrial de apoptosis, como lo indica la dramática pérdida del potencial transmembrana mitocondrial, la liberación de citocromo c y la subsiguiente activación de caspasa-9 y caspasa-3. Sin embargo, la supresión de la actividad de las caspasas utilizando un inhibidor específico, zVAD-fmk, que es suficiente para prevenir la apoptosis, no fue capaz de evitar la muerte celular inducida por los tocotrienoles. Esto sugiere que vías alternativas de muerte celular independientes de caspasas pueden estar participando del mecanismo celular de respuesta a los tocotrienoles.

*Uno de estos mecanismos es la muerte mediada por autofagia. La autofagia está caracterizada por el secuestro de porciones de citoplasma y organelas en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que finalmente adquieren características lisosomales. La autofagia ha sido relacionada con una gran variedad de procesos patológicos como enfermedades neurodegenerativas, tumorigénesis y pancreatitis aguda. La autofagia ha sido clasificada como una forma alternativa*

*de muerte celular programada y se la llamó muerte celular programada tipo II para diferenciarla de la apoptosis tipo I. El marcador utilizado por los autores para identificar autofagia fue la detección de LC3-II, una proteína que se asocia específicamente al autofagosoma. La muerte celular por autofagia toma lugar en células en las que la apoptosis fue bloqueada mediante el uso de inhibidores.<sup>14</sup> También se describió recientemente que ante una injuria oxidativa, la célula puede utilizar la autofagia para remover la mitocondria dañada y el ADN mitocondrial mutado.<sup>15</sup> En consecuencia, la autofagia podría no sólo ser una causa de muerte, sino también un mecanismo de defensa celular.*

Cuando los autores bloquearon la activación de caspasas en células estrelladas tratadas con tocotrienoles hubo un claro incremento de muerte autofágica, como fue evidenciado por la aparición de vacuolas autofágicas y la acumulación de LC3-II. Al estudiar el mecanismo por el cual los tocotrienoles inducen la muerte de las PSC activadas, los autores encontraron que el tratamiento con tocotrienoles causó permeabilización de la membrana mitocondrial, evento intracelular que media la muerte celular programada. El mecanismo que conduce a esta permeabilización es la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. La apertura de este poro resulta en la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial, en la hinchazón del espacio de membrana intermitocondrial, y en la ruptura de la membrana mitocondrial externa.<sup>16</sup> En este trabajo se presenta suficiente evidencia que permite postular que la muerte de las células estrelladas inducida por los tocotrienoles ocurre como consecuencia de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, debido a que el inhibidor de la apertura de este poro, la ciclosporina A, impidió la ejecución de cualquier modalidad de muerte celular ante el tratamiento con tocotrienoles (apoptosis y autofagia).

Otra propiedad fundamental de la fracción rica en tocotrienoles, que se resalta en este trabajo, es su especificidad para actuar sobre PSC activadas. Los tocotrienoles no tuvieron acción proapoptótica cuando las PSC transdiferenciadas fueron reprogramadas a un fenotipo quiescente o cuando células acinares diferenciadas se expusieron a los mismos. Estos hallazgos son consistentes con los reportes que evidencian que los tocotrienoles actúan como moléculas proapoptóticas en células tumorales, pero no en células no neoplásicas.<sup>5</sup>

Finalmente, los autores confirmaron que los efectos citotóxicos de los tocotrienoles sobre las PSC activadas son reproducidos individualmente por el  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocotrienoles derivados del aceite de palma. Cuando fueron ensayados por separado, la potencia y eficacia de estos tocotrienoles purificados fueron mayores si los comparamos con la fracción rica en tocotrienoles extraída del aceite de palma. Es para destacar que el  $\alpha$ -tocotrienol no demostró ser efectivo en provocar la muerte de las PSC activadas.

Los datos presentados en este trabajo demuestran el potencial antifibrogénico de los tocotrienoles naturales debido a su habilidad para inducir la desaparición controlada de PSC activadas sin dañar el tejido. Además, los resultados ubican a la mitocondria como el blanco preferencial en las PSC activadas para desarrollar nuevas terapias antifibrogénicas específicas. También se puede destacar la importancia de seleccionar los apropiados isómeros de la vitamina E para estudios futuros en pacientes con pancreatitis crónica.

## Referencias

1. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 1998;43:128-133.
2. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol* 1999;155:1087-1095.
3. Wright MC, Issa R, Smart DE, et al. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances resolution of fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2001;121:685-698.
4. Oakley F, Meso M, Iredale JP, Green K, Marek CJ, Zhou X, May MJ, Millward-Sadler H, Wright MC, Mann DA. Inhibition of  $\kappa$ B kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerates recovery from liver fibrosis. *Gastroenterology* 2005;128:108-120.
5. Srivastava JK, Gupta S. Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:447-453.
6. Wada S, Satomi Y, Murakoshi M, Noguchi N, Yoshikawa T, Nishino H. Tumor suppressive effects of tocotrienol in vivo and in vitro. *Cancer Lett* 2005;229:181-191.
7. Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Naidoo D, Wilson JS. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118:780-794.

8. Chojkier M, Houglum K, Lee KS, Buck M. Long- and short-term D- $\alpha$ -tocopherol supplementation inhibits liver collagen  $\alpha 1(I)$  gene expression. *Am J Physiol* 1998; 275:1480-1485.
9. Houglum K, Venkataramani A, Lyche K, Chojkier M. A pilot study of the effects of d- $\alpha$ -tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997;113:1069-1073.
10. Brown KE, Poulus JE, Li L, Soweid AM, Ramm GA, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR. Effect of vitamin E supplementation on hepatic fibrogenesis in chronic dietary iron overload. *Am J Physiol* 1997;272:112-116.
11. McIntyre BS, Briski KP, Gapor A, Silvester PW. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;224: 292-301.
12. Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 2004;23:2766-2773.
13. Jaattela M, Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2003;4:416-423.
14. Mills KR, Reginato M, Debnath J, Queenan B, Brugge JS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:3438-3443.
15. Rodríguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2463-2472.
16. Crompton M, Virji S, Doyle V, Jonson N, Ward JM. The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp* 1999;66:167-179.