

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

Genética y hepatotoxicidad

M.I. Lucena^{a,c,*}, R. Cueto^a, C. Stephens^{a,c}, M.R. Cabello^{a,c}, M. Robles^{b,c} y R.J. Andrade^{b,c}; en representación del Grupo de Estudio de Hepatopatías Asociadas a Medicamentos

^aServicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga, España

^bUnidad de Hepatología, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga, España

^cCentro de Investigación Biomédica en Red: Enfermedades Hepáticas y Digestivas, CIBERehd

Genética y hepatotoxicidad

La hepatotoxicidad idiosincrásica (DILI) representa un auténtico desafío al proceso de desarrollo clínico de los medicamentos. Se estima que los fármacos son responsables de un 2-5% de las hospitalizaciones por ictericia, un 10% de los casos de hepatitis en adultos y un 13-17% de los casos de hepatitis fulminante¹. La clasificación del tipo de daño hepático se realiza, en ausencia de datos de biopsia, conforme a los resultados de laboratorio y de acuerdo con los criterios de la Conferencia Internacional de Consenso: hepatocelular, colestásico y daño mixto².

Dado que en el momento actual aún no se dispone de un método para diseñar moléculas libres de producir toxicidad orgánica, ni se han podido desarrollar métodos consistentes de cribado de moléculas hepatotóxicas, ni se dispone de modelos animales adecuados de DILI, y tampoco es posible predecir de manera fiable la seguridad de un medicamento desde los estudios clínicos de la fase de desarrollo, el mejor modelo de estudio sería el sujeto afectado³. No es de extrañar pues que el daño hepático idiosincrásico sea la causa más frecuente de retirada de medicamentos del mercado o de adopción de medidas reguladoras por las agencias sanitarias en los últimos 50 años⁴. Los grupos farmacológicos más frecuentemente involucrados son los antiinfecciosos (amoxicilina-clavulánico

es el agente individual responsable del mayor número de casos en estudios recientes), antiinflamatorios no esteroideos y antiepilepticos^{5,6}.

La hepatotoxicidad ha recibido hasta el momento actual una atención menor que otras enfermedades hepáticas y ello se debe a varias razones. En primer lugar, es una enfermedad de diagnóstico infrecuente, lo que impide al médico, incluso especialista en enfermedades hepáticas, acumular experiencia. La carencia de marcadores específicos de toxicidad en el contexto de una enfermedad que puede remediar cualquier otra enfermedad hepática aguda o crónica, explica que muchas incidencias queden sin caracterizar, y ello junto al hecho de que, actualmente, no es posible comprender los mecanismos de producción de la lesión en cada caso particular, lo que genera desconcierto y desaliento en el médico que tiene que enfrentarse a ella.

Hepatotoxicidad: ¿por qué no en todos los pacientes?

La enfermedad hepática tóxica puede ser producida por 2 mecanismos principales³:

- *Intrínseca*. Debido al potencial tóxico del fármaco o su metabolito, con una participación menor del huésped y, por tanto, predecible y reproducible en el animal de experimentación tras la administración del fármaco a dosis lo suficientemente elevadas para producir el daño. No obstante, la inmensa mayoría de los casos que se ven en clínica son reacciones impredecibles y, por tanto, *idiosincrásicas* y estrechamente dependientes de factores del huésped.

Al final del artículo se relacionan los hospitales y miembros del Grupo de Estudio de Hepatopatías Asociadas a Medicamentos.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lucena@uma.es (M.I. Lucena).

– *Inmunoalérgica.* La DILI se clasifica en *inmunoalérgica*, si se acompaña de manifestaciones que sugieren alergia farmacológica, como eosinofilia, exantema, fiebre, linfopenia o títulos detectables de autoanticuerpos no específicos de órgano (p. ej., antinucleares, antimúsculo liso). Estas reacciones tienden a tener un período de latencia corto, de 1 a 4 semanas, y en el caso de readministración inadvertida el daño aparece rápidamente. La mayoría de las lesiones colestásica/mixta y de daño crónico suelen tener una base inmune, siendo los colangiocitos las células diana. Cuando las manifestaciones de hipersensibilidad que habitualmente se evalúan se encuentran ausentes se habla, por exclusión, de un mecanismo de *idiosincrasia metabólico*. Estas reacciones son intrigantes desde un punto de vista fisiopatológico, ya que típicamente aparecen tras un tratamiento prolongado de meses (a veces de hasta 1 año) de duración (p. ej., ximelagatran), y la reexposición puede resultar negativa. Es interesante señalar que estas reacciones ocurren sobre una base de muchos sujetos que podrían desarrollar un daño hepático leve, manifestado por incrementos en la actividad sérica de ALT > 3 × LSN (1,0-10%) tras la administración del fármaco (p. ej., isoniazida, estatinas) y que, sin embargo, resuelven en muchos casos aún continuando con el tratamiento, un fenómeno denominado “tolerancia o cambio adaptativo”. Se podría asumir que el fracaso para adaptarse llevaría a una minoría de pacientes a desarrollar una hepatitis aguda con expresividad clínica (0,1-1,0%) y, finalmente, un subgrupo muy reducido de estos últimos evolucionaría hacia un fallo hepático fulminante (0,01-0,1%).

La distinción entre un mecanismo inmunoalérgico y otro idiosincrásico metabólico resulta a menudo más académica que real dado que ambos mecanismos en realidad pueden estar involucrados de forma simultánea. En cualquier caso, la rara ocurrencia de DILI pone de relieve que resulta de la interacción de factores de toxicidad potencial del fármaco, con factores de predisposición genética y factores ambientales. La reaparición de hepatotoxicidad en un mismo sujeto, a menudo bajo condiciones ambientales diferentes a las que hay en el episodio previo, subraya que los factores genéticos son los determinantes más importantes en la susceptibilidad a desarrollar hepatotoxicidad.

El mayor desafío pues es la identificación de sujetos susceptibles de desarrollar DILI. Los esfuerzos cooperativos son imprescindibles para identificar casos, realizar una caracterización fenotípica de calidad y recolectar muestras biológicas en las que poder efectuar estudios genómicos que posibiliten examinar la relación entre fenotipo y genotipo.

En los últimos años, distintos grupos están tratando de cumplir estos objetivos. En 1994 se fundó en España un grupo multicéntrico colaborativo, el GEHAM (Grupo Español para el Estudio de las Hepatopatías Asociadas a Medicamentos)⁵, para la identificación prospectiva de todas las sospechas de hepatotoxicidad, utilizando una metodología uniforme (<http://spanishDILI.uma.es>). Más recientemente, en 2000, en Estados Unidos, un grupo cooperativo formado por 5 instituciones académicas, el Drug Induced Liver Injury Network (DILIN) fue patrocinado por los National Institutes of Health (NIH) con el mismo propósito (<http://dilin.dcri.duke.edu/web>)⁶.

En el Reino Unido, el grupo DILIGEN está centrado en la investigación de la influencia genética de la toxicidad hepática causada por antiinfecciosos⁷. También en Europa está en marcha el proyecto Eudragene⁸ para identificar casos de reacciones adversas causadas por fármacos y recolectar muestras biológicas a través de los sistemas nacionales de comunicación espontánea de reacciones adversas de diversos países. Estos esfuerzos cooperativos están ayudando a crear una cultura farmacoepidemiológica en muchos clínicos, que les hace más sensibles al fenómeno, incrementando así las probabilidades de identificar casos; están permitiendo realizar estudios clínicos, vedados a unidades aisladas, tales como estudios de determinantes pronósticos y de historia natural de la enfermedad, y al mismo tiempo están poniendo de manifiesto la necesidad de establecer nuevos consensos en materia de definiciones y terminologías, criterios diagnósticos e instrumentos de causalidad, e integrar en la práctica clínica las herramientas necesarias para incrementar el grado de certeza en el diagnóstico de hepatotoxicidad, todo lo cual, en último término, promoverá la investigación y la comprensión de los complejos mecanismos involucrados en esta reacción adversa.

Tipos de estudios genéticos en hepatotoxicidad y sus limitaciones

Un objetivo ineludible en esta área de la investigación es la búsqueda de particularidades genéticas que expliquen la susceptibilidad y posibiliten predecir el fenómeno de forma fiable, y así evitar la retirada del mercado de un producto, por otra parte eficaz, que debería ir destinado únicamente a sujetos que no van a desarrollar toxicidad, avanzando en el paradigma de una terapéutica individualizada. Pero este conocimiento ganado va a facilitar también el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en nuevas dianas farmacológicas y el diseño de fármacos que carezcan de toxicóforos⁹.

Los avances en biología molecular y genética con la información detallada de las variaciones en el genoma humano que proporciona el Human Genome Project y el Human HapMap son el soporte para evaluar la contribución de variantes genéticas en la patogénesis, pronóstico y tratamiento de enfermedades complejas y se constituyen en una excelente herramienta para poder cribar efectos adversos.

Las variaciones más frecuentes en la cadena de ADN se denominan polimorfismos si, por definición, afectan a más del 1% de la población. La frecuencia de variantes genéticas en la población es superior a la aparición de hepatotoxicidad. Esto indica que la susceptibilidad a la aparición de un daño hepático tóxico es un proceso complejo, en el que múltiples mecanismos se encuentran implicados y, por tanto, con una influencia poligénica. Las variaciones genéticas individuales operan como “alelos de riesgo de susceptibilidad” o “modificadores” de las características del daño hepático (presentación clínica, evolución).

Los *estudios de genes candidatos* intentan establecer asociaciones entre un polimorfismo (o polimorfismos) de genes candidatos –seleccionados basándose en su papel en vías/procesos clave de la patogénesis de la enfermedad, mediante estudios con metodología caso-control–. Con este

método, la frecuencia de los polimorfismos estudiados se compara en la población de casos y controles para establecer si está asociado al desarrollo de la enfermedad. Es fundamental que las poblaciones en estudio sean similares con respecto a factores predictivos importantes como edad, sexo o exposición al fármaco de estudio. La selección del grupo control, pues, resulta esencial para el establecimiento de asociaciones con la metodología de estudio caso-control.

¿Cuál sería nuestra estrategia de búsqueda de genes candidatos? En los estudios de asociación la selección de genes candidatos se realiza basándose en la identificación de vías clave del proceso biológico y debe ser condición necesaria que los polimorfismos genéticos sean funcionales, esto es, conlleven alteraciones en la afinidad o función de la proteína sintetizada aboliendo, reduciendo o incrementando la actividad de la enzima. No obstante, estos estudios pueden, en ocasiones, ser fallidos, ya que se plantean basándose en un enfoque posiblemente sesgado de la hipótesis a trabajar.

Para contrarrestar esta limitación, los estudios amplios del genoma (GWA) analizan del orden de 500.000 a 1.000.000 de polimorfismos genéticos diferentes, ofreciendo un enfoque a priori que posibilita identificar variaciones genéticas no sospechadas que podrían contribuir a la predisposición a presentar hepatotoxicidad. En estos estudios, sin una hipótesis previa, se hace un barrido amplio de genes, muchos de los cuales sin relación conocida con la patogénesis de la enfermedad y, por tanto, pueden emergir nuevas asociaciones no sospechadas que amplíen los conocimientos mechanísticos. No obstante, variantes polimórficas poco frecuentes que no se encuentren incluidas en las actuales bases de datos públicas podrían pasar inadvertidas. Así, la identificación de estas variantes requerirá la secuenciación del genoma humano completo –bien cubriendo todo el genoma o exones principales–. El coste de esta tecnología es aún muy elevado¹⁰.

La realización de estudios genéticos en DILI presenta una serie de dificultades y desafíos por las siguientes razones: un amplio número de fármacos se relaciona con hepatotoxicidad. Estos fármacos representan un grupo muy heterogéneo y diverso en relación con propiedades químicas, efectos terapéuticos o dianas biológicas. La “firma” con la que un fármaco induce hepatotoxicidad (período de latencia y tipo de lesión relativamente constantes) debe ser contemplada con cautela, ya que con frecuencia dichas manifestaciones varían de un sujeto a otro. Además, las formas más graves de hepatotoxicidad (insuficiencia hepática aguda) son por fortuna relativamente infrecuentes¹¹. Dado que la ocurrencia de DILI es baja, las circunstancias previamente comentadas limitan nuestra capacidad para identificar un número suficiente de casos producidos por un mismo fármaco y poder así realizar estudios con suficiente potencia estadística. Finalmente, merece tenerse en cuenta que casos de lesión hepática incorrectamente atribuidos a fármacos diluirían la fuerza de las asociaciones encontradas.

La mayoría de las asociaciones genéticas en hepatotoxicidad se ha establecido en poblaciones que han utilizado fármacos concretos, presumiblemente bajo la hipótesis de que estas asociaciones van a ser específicas para cada fármaco. Aunque es una asunción válida, también es cierto

que la susceptibilidad genética podría ser común a un grupo diverso de fármacos. La principal limitación de este último enfoque es el diseño de las estrategias de agrupamiento de fármacos. Frecuentemente, se hacen basándose en categorías terapéuticas. La DILI es un proceso complejo y multifactorial que se asume que se inicia por un daño químico –formación de metabolitos reactivos/intermediarios– en los hepatocitos. Es importante señalar que la clasificación anatomicoterapéutica de fármacos no alberga los compuestos según estructuras químicas similares. Así, nimesulida, a pesar de ser un derivado sulfamídico, se encuentra dentro de la categoría de los antiinflamatorios no esteroideos y no se agrupa, por tanto, con los antibióticos sulfamidas. Una propuesta alternativa, más racional para la realización de estudios mechanísticos y genéticos, sería la agrupación de fármacos que comparten grupos funcionales o generasen metabolitos intermediarios similares. La bondad de este enfoque se ha comprobado recientemente¹².

Una vez seleccionados los genes/haplótipos candidatos y diseñado una sólida estrategia de reclutamiento, el apartado de análisis estadístico requiere especial consideración para minimizar los riesgos de un error tipo II (aceptar la hipótesis nula cuando es falsa) y un error tipo I (rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera). Los estudios deben tener un adecuado tamaño muestral que les confiera suficiente poder estadístico para detectar pequeños efectos (genotipo *odds ratio* [OR]) esperados en la enfermedad hepática. Puede anticiparse que el número de polimorfismos detectados que tiene una importante influencia en el desarrollo de toxicidad hepática (p. ej., OR > 5,0) es reducido y, además, explica sólo un pequeño porcentaje de la población afectada. Es más frecuente detectar polimorfismos de menor efecto (p. ej., OR < 2,0) en el desarrollo de enfermedades de herencia compleja, como la hepatotoxicidad. Se deben utilizar métodos estadísticos correctores para evitar la posibilidad de establecer falsas asociaciones debido al elevado número de variaciones genéticas que se estudia simultáneamente. Se utiliza la corrección de Bonferroni, donde el valor de *p* se divide por el número de alelos o subgrupos formados. En los GWA, el nivel de significación se fija típicamente en *p* = 10⁻⁷ a 10⁻⁸.

Es importante analizar la plausibilidad biológica de la asociación genética establecida basándose en el efecto funcional del polimorfismo determinado. Tras el hallazgo de una asociación entre un polimorfismo y hepatotoxicidad, es posible que la variante genética detectada no sea realmente la causante, sino que se encuentre en desequilibrio de unión con otros genes próximos que serían los responsables últimos del efecto.

Además, las asociaciones encontradas se deben replicar en otras cohortes bien controladas, y ya se han comentado las dificultades inherentes a reclutar un número adecuado de casos muy bien caracterizados.

Hepatotoxicidad idiosincrásica: asociaciones genéticas identificadas

Actualmente, no sería correcto considerar la DILI como una enfermedad huérfana, ya que se están destinando grandes esfuerzos al conocimiento de los mecanismos que subyacen en su patogénesis. Se considera que es una enfermedad

compleja, multifactorial, en los que el potencial tóxico del fármaco, factores genéticos y adquiridos, así como deficiencias en los procesos de adaptación que limitan la extensión del daño, determinan la susceptibilidad y hacen al individuo único en su capacidad de desarrollar DILI. Este tipo de reacciones no son dependientes de la dosis; sin embargo, para su producción debe haber una combinación apropiada (aunque deletérea) de factores de susceptibilidad con una dosis relevante en el tiempo. En concordancia con este argumento está el hecho de que es difícil encontrar ejemplos de hepatotoxicidad, incluso la inmunoalérgica, con fármacos administrados a dosis inferiores a 10 mg/día. De hecho, un estudio reciente ha puesto de manifiesto que la DILI y las incidencias de fallo hepático fulminante ocurren más frecuentemente con fármacos que se administran a dosis de 50 mg/día o superiores, en comparación con los que se administran a dosis inferiores¹³, lo que indirectamente sugiere que la probabilidad de DILI se reduciría drásticamente con fármacos potentes. Esta circunstancia refleja la falta de predicción que tiene la dosis administrada con respecto a las concentraciones reales a las que se expone el hígado, como consecuencia de una interacción farmacológica o de un deterioro de las vías de eliminación en un determinado sujeto.

Se acepta, desde un punto de vista mecanístico, que variaciones en bioactivación, detoxificación, transporte de los fármacos, así como la respuesta del sistema inmune innato y adquirido, una vez que la lesión se ha producido, y de los mecanismos de reparación y regeneración tisular, serían responsables de la aparición de DILI. Dado que todos estos procesos están bajo control genético y debido a la ausencia de modelos animales fiables en el momento actual, se hace necesario estudiar en los sujetos afectados los polimorfismos funcionales de los genes que controlan estos procesos.

En la tabla 1 se recogen las principales asociaciones halladas con polimorfismos de genes candidatos.

Procesos de metabolismo, detoxificación y transporte que determinan el grado de exposición celular del fármaco o metabolitos

Aunque el papel primordial del hígado en el metabolismo de los fármacos es la detoxificación, incrementar la hidrosolubilidad del compuesto para facilitar su excreción renal, en ocasiones también puede actuar en un proceso “toxicificador”. Así, una noción muy extendida en la patogénesis de la hepatotoxicidad es que el metabolismo oxidativo (fase I) de los fármacos –el citocromo P450 (CTYP) juega un papel crítico en los procesos de oxidación, aunque también podrían estar involucradas otras vías– generaría metabolitos reactivos que si no son conjugados efectivamente con los distintos sistemas enzimáticos detoxificadores (fase II) podrían producir un daño hepático. Más recientemente, se han identificado los transportadores de membrana (fase III), que jugarían un papel destacado en el control de la captación celular y excreción del fármaco activo o el producto detoxificado, contribuyendo en definitiva al grado de exposición celular a los metabolitos generados. Así, independientemente de si el compuesto tóxico (radicales libres que agotan el glutatión intracelular o compuestos electrofilicos) puede unirse irreversiblemente (por un enlace covalente) a

macromoléculas, principalmente proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, o alterar la función de organelas esenciales como la mitocondria y activar vías de muerte celular o, alternativamente, estos metabolitos reactivos puedan actuar como haptenos (formación de aductos entre el fármaco y las proteínas que actúan como *carrier* del fármaco) y despertar una respuesta inmune. Las proteínas haptenizadas son procesadas por las células presentadoras de抗ígenos y presentadas a las células T CD4+ o T *helper*, que desencadena una respuesta inmune celular (activación linfocitos T CD4+ y CD8+ citotóxicos) y humorala (activación de los linfocitos B con producción de anticuerpos) (fig. 1).

Tras la injuria química, los procesos iniciales de metabolismo y transporte de los fármacos/metabolitos determinan el grado de exposición al metabolito reactivo del hepatocito o los colangiocitos y resultan críticos.

Fase I

El contenido de CYP en el hígado es mayor en la zona centrolobulillar (zona 3). La necrosis centrolobulillar es un hallazgo histopatológico característico en la hepatitis aguda tóxica que bien podría indicar que las enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo de los fármacos juegan un papel importante en su patogénesis. Además, la generación de metabolitos reactivos se ha identificado en 13 de 21 (62%) fármacos retirados del mercado o con advertencias de hepatotoxicidad¹⁴. Así, los genes implicados en el proceso de metabolismo de los xenobióticos son candidatos atractivos en la búsqueda de polimorfismos que puedan explicar la susceptibilidad de algunos sujetos a presentar DILI.

El sistema del CYP comprende varias subfamilias (<http://medicine.iupui.edu/flockhart>). Una de las mejor estudiadas es la CYP2C, que constituye el 18% de la cantidad total de proteína CYP del hígado humano y que se caracteriza porque metaboliza aproximadamente el 20% de los fármacos disponibles en el mercado. Esta subfamilia es fuertemente polimórfica. Además, la hepatotoxicidad es un efecto adverso reconocido para fármacos sustratos del CYP2C9 y 2C19, como diclofenaco, leflunomida, troglitazona, ácido valproico y tetrabamato, entre otros. Por otra parte, en un estudio reciente se ha encontrado una relación directa entre el grado de metabolismo hepático de un compuesto y el riesgo de desarrollar hepatotoxicidad, particularmente acusado para los fármacos sustrato del CYP2C9¹⁵.

No obstante, la información acerca del vínculo entre polimorfismos CYP2C9 y CYP2C19 y riesgo incrementado de DILI era anecdótica, basándose en un número muy reducido de pacientes. Aithal et al¹⁶ estudiaron la influencia de los genotipos CYP2C9*2 y CYP2C9*3 en 24 pacientes con hepatotoxicidad por diclofenaco –sustrato prototípico de este citocromo– con hallazgos negativos. De manera similar, la distribución de las diferentes isoformas de CYP2C9 y CYP2C19 en una población amplia de pacientes con DILI¹⁷ ocasionado por fármacos que son sustratos de estas enzimas, no difirió de la población general y la presencia de alelos polimórficos de CYP2C9 y CYP2C19 (*2 y *3 que originan un fenotipo pobre metabolizador y pueden conducir a una reducción muy marcada en la actividad metabólica) no condicionó la aparición ni la expresión de la hepatotoxicidad. En realidad, un citocromo normofuncionante sería necesario para la generación de especies reactivas. En este sentido, es interesante seña-

Tabla 1 Factores genéticos asociados con la hepatotoxicidad idiosincrásica

Genotipo asociado	Fármaco	Efecto	Referencia
Citocromo P450 (fase I)			
<i>CYP2C9*2C19*2, *3</i>	Varios	Sin efecto	Pachkoria, 2007
<i>CYP2C9*2, *3</i>	Diclofenaco	Sin efecto	Aithal et al, 2000
<i>CYP2E1 c1/c1,</i>	Antituberculosos	Incremento DILI	Huang et al, 2003
<i>CYP2E1 *5 y *1B</i>			Vuilleumier et al, 2006
Enzimas de conjugación de fase II			
<i>GSTM1 nulo</i>	Antituberculosos	Incremento DILI	Huang et al, 2007
<i>GSTM1 nulo</i>	Carbamazepina	Incremento DILI	Ueda et al, 2007
<i>GSTT1-GSTM1 doble nulo</i>	Troglitazona	Incremento DILI	Watanabe et al, 2003
<i>GSTT1-GSTM1 doble nulo</i>	Tacrina	Desconocido	Simon et al, 2000
<i>GSTT1-GSTM1 doble nulo</i>	Varios	Incremento DILI	Lucena et al, 2008
<i>UGT2B7*2</i>	Diclofenaco	Incremento DILI	Daly et al, 2007
<i>UGT1A6-A528G</i>	Tolcapona	Incremento DILI	Acuña et al, 2002
<i>NAT2 acetiladores lentos</i>	Antituberculosos	Incremento DILI	Huang et al, 2002
<i>MnSOD 47C>T(Val16Ala)</i>	Varios, > antituberculosos	Incremento daño hepatocelular	Huang et al, 2007
<i>SOD2 Val16ala y GPX1 Pro198Leu</i>	Varios	Incremento DILI colestásico	Stephens et al, 2009
Transportadores			
<i>ABCB11(BSEP) 1331T>C</i>	Varios	Incremento daño hepatocelular	Andrade et al, 2008
<i>ABCB11(BSEP) 1331T>C</i>	Varios	Incremento daño colestásico	Lang et al, 2007
<i>ABCC2(MRP2) -24C>T</i>	Diclofenaco	Incremento DILI	Daly, 2007
<i>ABCC2(MRP2) 1549G>A, -24C>T, 334-49C>T, 3972C>T</i>	Varios, plantas	Incremento daño hepatocelular en población coreana	Choi et al, 2007
<i>ABCC2(MRP2)-1774delG</i>	Varios, plantas	Incremento daño colestásico/mixto	Choi et al, 2007
<i>ABCC2(MRP2) -24C>T, 1249g>A, 3563T>A, 4581G>A</i>	Varios	No asociación con DILI	Andrade et al, 2008
<i>MDR1(ABCB1) 3435C>T, 2677G>T/A</i>	Varios	Incremento DILI	Marzolini et al, 2004
Respuesta inmune			
<i>HLA DRB1*0701</i>	Ximelagatran	Incremento DILI	Kindmark et al, 2008
<i>HLA A*3303</i>	Ticlopidina	Incremento daño colestásico	Hirata et al, 2008
<i>HLA-B*5701</i>	Flucoxacilina	Incremento daño colestásico/mixto	Daly et al, 2009
<i>HLA DRB1*1501</i>	Amoxi-clavulánico	Incremento DILI	Hauteekete et al, 1999
<i>HLA DRB1*15, DQB1*06</i>	Varios	Incremento daño colestásico/mixto	Andrade et al, 2004
<i>HLA DRB1*07, DQB1*02</i>	Varios	Efecto protector daño colestásico	Andrade et al, 2004
<i>HLA DQB1*0201, DRB1*0701</i>	Antituberculosos	Incremento DILI	Sharma et al, 2002
<i>IL-10-627 AA/AC + IL-4-590 TT/CT</i>	Diclofenaco	Incremento DILI	Aithal et al, 2004
<i>IL-10-1082G/A, -819 C/T, -592 C/A</i>	Varios	Sin asociación con DILI	Pachkoria et al, 2008
<i>IL-4-590 C/A</i>		Haplótipo bajo/intermedio productor IL-10 menor eosinofilia y peor pronóstico	

BSEP: bomba de expulsión de sales biliares; DILI: daño hepático inducido por fármacos; GPX: glutatión peroxidasa; GST: glutatión S-transferasa; HLA: antígeno mayor de histocompatibilidad; IL: interleucina; MDR: multirresistencia a fármacos; MRP2: proteína 2 asociada a multirresistencia a fármacos; NAT2: N-acetiltransferasa; OATP: polipéptidos transportadores de aniones orgánicos; SOD: superóxido dismutasa; UGT: UDP-glucuroniltransferasa.

lar que en Taiwan pacientes homocigotos para el alelo salvaje del *CYP2E1* mostraron un incremento significativo del riesgo de hepatotoxicidad por isoniazida frente a los heterocigotos y homocigotos para el alelo *CYP2E1*5*, apareciendo como un factor de riesgo independiente tras haber sido ajustado por el genotipo acetilador y la edad¹⁸.

De hecho, es muy improbable que un incremento de actividad del CYP tenga una base genética, y así, la vulnerabilidad de un determinado sujeto al desarrollo de DILI podría resultar como consecuencia de deficiencias en los procesos detoxificadores o bien en los sistemas de transporte hepático de fármacos, los cuales determinarían el nivel de expo-

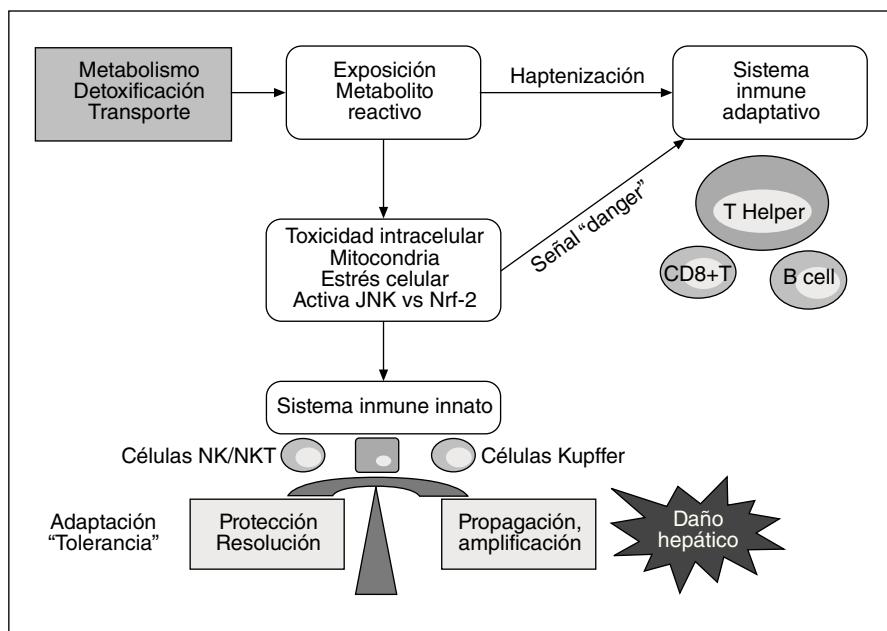


Figura 1 Vías de lesión celular y mecanismos de adaptación en el daño hepático inducido por fármacos.

sición al metabolito reactivo, aunque es difícil precisar qué proporción de las reacciones adversas hepáticas se debe a un proceso de bioactivación y cuáles son consecuencia de una fase II o de transporte alterada.

La complejidad de la biotransformación de xenobióticos sugiere que la anomalía en el metabolismo podría involucrar a varias vías de forma simultánea. La combinación de variantes polimórficas responsables de una mayor bioactivación del fármaco conjuntamente con un transporte canalicular disminuido se han identificado en la hepatotoxicidad por diclofenaco¹⁹. Recientemente, en 24 pacientes con hepatotoxicidad por diclofenaco se ha observado que portaban más frecuentemente que los controles variantes aleáticas anómalias de los genes *CYP2C8* y *UGT2B7* (que codifica la uridina glucuronil acyltransferasa), lo que determinaría la formación en exceso de acylglucurónidos tóxicos del fármaco, y del gen *ABCC2* que codifica el transportador MRP2, cuyo resultado sería la defectuosa eliminación de dichos metabolitos al canalículo biliar.

Fase II

La glutation S-transferasa (GST) es una importante familia de enzimas de fase II que desempeña un papel crucial en los mecanismos de detoxificación de fármacos y xenobióticos, previniendo la unión de metabolitos reactivos a proteínas celulares y catalizando la conjugación de compuestos electrofílicos a glutatión. Dos de las isoformas citosólicas de la GST (*GSTM1* y *GSTT1*) están ausentes en un importante número de individuos debido a una delección génica (alelos nulos). En el ser humano, la delección homocigótica conlleva, en general, una pérdida de la actividad enzimática.

El papel de las enzimas *GSTT1* y *GSTM1* en el desarrollo de hepatotoxicidad se ha investigado en diversos estudios independientes que involucraban fármacos como troglitazona²⁰ y tacrina²¹. Para comprobar la relevancia de estas enzimas como un mecanismo protector frente al desarrollo de hepatotoxicidad, estudiamos si una determinada reduc-

ción genética en la capacidad para detoxificar compuestos electrofílicos, como la esperada en individuos con genotipos nulos de la *GST T1* y *M1*, puede jugar un papel en la determinación del riesgo de DILI inducida por fármacos y su curso clínico. El estudio se llevó a cabo en 154 pacientes con un diagnóstico de DILI ocasionado por una amplia variedad de fármacos, y encontró que los portadores del genotipo nulo combinado *GSTT1-M1* tenían un riesgo de desarrollar DILI 2,70 veces superior a los no portadores, con una presencia de mujeres significativa en este grupo. Estos datos ponen de manifiesto que este genotipo nulo combinado podría desempeñar un papel como mecanismo general en la susceptibilidad a desarrollar DILI independientemente del fármaco involucrado y predominantemente en mujeres²².

La N-acetiltransferasa-acetilCoA (NAT), otra enzima de fase II, cataliza la biotransformación de una serie de arilaminas y compuestos hidracina (isoniazida, procainamida, sulfametozaxol y dapsona, entre otros). Esta enzima está codificada en 2 loci, uno codifica la *NAT1*, anteriormente conocida como la forma monomórfica de la enzima, mientras que el otro codifica la *NAT2* polimórfica. Se conocen 52 alelos diferentes para esta última isoforma²³, de los cuales *5, *6 y *7 son los de mayor importancia al mostrar diferencias importantes en la actividad metabólica de la *NAT2*. Estos polimorfismos en la *NAT2* son los responsables de las diferencias interindividuales en la capacidad de acetilar estos compuestos. Estudios epidemiológicos sugieren una asociación entre el fenotipo "acetilador" (acetiladores lentos, intermedios y rápidos) y el riesgo de desarrollar toxicidad hepática. Esta capacidad de acetilación *in vitro* se va reduciendo en función de los alelos *NAT2*4 > NAT2*7 > NAT2*6 > NAT2*5*²³.

La isoniazida, cuya principal vía metabólica es la *NAT2*, es el compuesto antituberculoso con mayor potencial hepatotóxico. Hasta la fecha, la relación entre el genotipo *NAT2*, el fármaco y el riesgo de desarrollar hepatotoxicidad no está del todo dilucidada. La mayoría de los datos publicados

sugiere que la ausencia de actividad de *NAT2* (acetiladores lentos) es un factor de riesgo para el desarrollo de DILI por isoniazida²⁴. En un estudio realizado en 224 pacientes chinos que recibían tratamiento antituberculoso, se observó que los que estaban en posesión del genotipo acetilador lento para *NAT2* tenían 4 veces más riesgo de desarrollar hepatotoxicidad por isoniazida²⁴. De esta forma, en los acetiladores lentos la vía de la hidrólisis directa de acetilisoniazida a acetilhidrazina se encontraría incrementada y la acetilhidrazina acumulada –al enlentecerse su degradación al metabolito inactivo diacetilhidrazina– se oxidaría mayoritariamente a través del CYP2E1 y permitiría la formación de intermediarios hidrazina hepatotóxicos. Esta hipótesis se confirmaría en el trabajo de Huang et al en población asiática, que observa en pacientes con genotipo homocigoto CYP2E1 c1/c1 un incremento del riesgo de hepatotoxicidad con una OR de 2,52. Cuando se combina con la información sobre estado acetilador el riesgo de hepatotoxicidad se incrementa de 3,94 en pacientes con genotipo CYP2E1 c1/c1 y estado acetilador rápido a 7,43 para pacientes con estado acetilador lento y CYP2E1 c1/c1 normofuncionante¹⁷. Habiendo cuenta de la importante variabilidad interétnica en la frecuencia de las variantes alélicas para *NAT2*²⁵, sería importante confirmar estos resultados en estudios amplios de población caucásica.

Fase III

La lesión colestásica, cuando se acompaña de una elevación de bajo grado de las transaminasas, y la lesión mixta sugieren un daño del epitelio biliar asociado a una lesión hepatocelular de menor entidad. En estas circunstancias, bien el metabolito reactivo o el conjugado presentan secreción canalicular y la exposición del epitelio ductular biliar a la toxicidad directa del metabolito o al despertar una respuesta inmune frente a las proteínas del ducto haptenizadas. Evidencia indirecta de la importancia de esta vía de lesión se ha obtenido en animales con deficiencia del gen *Mrp2* que no desarrollan daño colestásico por flucloxacilina y terbinafina²⁶.

Mientras que los transportadores ligados a la membrana basolateral (sinusoidal) son importantes en la regulación de la exposición de fármacos y toxinas, y determinan, por lo tanto, la cantidad de fármaco y/o metabolitos que llegan a la membrana canalicular, los transportadores de la membrana apical o canalicular son responsables del aclaramiento hepático de los fármacos, así como de la secreción de sales biliares y otros constituyentes de la bilis a través de la membrana canalicular del hepatocito a la bilis²⁷. La investigación de variaciones funcionales en la acción coordinada de los principales transportadores que son esenciales en los procesos de captación tisular y secreción biliar, abre pues una vía de enorme interés, tanto para la mejor comprensión de los complejos mecanismos que interrelacionan en la producción de daño hepático de origen tóxico como para la identificación de sujetos susceptibles.

Los transportadores de la membrana basolateral del hepatocito están representados por la superfamilia de polipeptídicos transportadores de aniones orgánicos (OATP) que facilitan el transporte de sales biliares conjugadas, esteroides, glucurónidos y cationes orgánicos. Numerosos fárma-

cos, como pravastatina, metotrexato, irinotecan o enalapril, entre otros, son sustratos de estos transportadores.

Recientemente, se ha observado que variaciones genéticas del transportador *OATP1B1* (521T/C) se asocian con importantes diferencias interindividuales en la disposición hepática de pravastatina y rosuvastatina²⁸. Estos hallazgos sugieren que el polimorfismo del gen que codifica para el transportador *OATP1B1* (*SLCO1B1*) es determinante en el grado de exposición hepática a estos fármacos y modifica sus características farmacocinéticas. Además, en un análisis amplio del genoma se han identificado estas variantes polimórficas del gen *SLCO1B1* relacionándolo con un incremento en el riesgo de desarrollar miopatías inducidas por estatinas²⁹.

La secreción de sales biliares y xenobióticos a través de la membrana canalicular del hepatocito está mediada por varios transportadores dependientes de ATP (*ATP-binding cassette* o ABC transportadores). Una expresión disminuida de los transportadores hepatocelulares podría influir críticamente en el tiempo de exposición a los metabolitos reactivos. Los más importantes dentro de este grupo son la bomba de expulsión de sales biliares (BSEP, *ABCB11*), la familia de multirresistencia a fármacos (MDR o glucoproteínas P) como MDR1 (*ABCB1*), MDR3 (*ABCB4*) así como la proteína 2 asociada a multirresistencia a fármacos MRP2 (*ABCC2*)³⁰.

Las diferencias genéticas interindividuales podrían ser las principales determinantes de la función y expresión de estos transportadores, originando, por tanto, una susceptibilidad individual al desarrollo de colestasis. De hecho, mutaciones en los genes *ABCB11* y *ABCB4*, que codifican los transportadores de la membrana canalicular BSEP y MDR3, son la causa de defectos en la excreción biliar y de una variedad de síndromes colestásicos que van desde la colestasis progresiva familiar en neonatos a la cirrosis biliar en adultos³¹. Por otra parte, se han descrito polimorfismos en estos 2 genes que se han asociado a la colestasis intrahepática del embarazo³² y pueden contribuir a incrementar el riesgo de desarrollar cirrosis biliar primaria y colangiopatías en humanos³³.

Choi et al³⁴ han encontrado en población coreana que variaciones genéticas en el gen promotor de MRP2 favorecen la susceptibilidad a la toxicidad hepática inducida mayoritariamente por preparados de herboristería y que, además, influencian la expresión del daño hepático de tipo colestásico o mixto en sujetos cuyo haplotipo de MRP2 era portador de la delección de una G en la posición –1774, mientras que el haplotipo portador de las variaciones –1549G>A, –24C>T, 334–49C>T y 3972C>T se asociaría a la lesión hepatocelular. En esta línea, se ha descrito el papel de las variantes genéticas de *ABCB11* (BSEP) y *ABCB4* en el desarrollo de daño colestásico de naturaleza tóxica producida por distintos fármacos en una cohorte de 23 pacientes, sin que se encontraran estas asociaciones en 13 pacientes con daño hepatocelular³⁵. La limitación principal de este estudio realizado en una cohorte muy reducida de pacientes con hepatotoxicidad causada por distintos agentes, y por tanto de escasa potencia estadística, es que realmente se desconoce si los polimorfismos genéticos de los transportadores hepáticos de fármacos actúan como un factor general de susceptibilidad al desarrollo de hepatotoxicidad y determinan la expresión de la lesión hepática en población caucásica.

En un estudio español en 188 pacientes con hepatotoxicidad por diversos compuestos y 219 controles, se evidenció que un polimorfismo no sinónimo en el exón 13 del gen *ABCB11* (que codifica la Bsep) ($1331T>C$), que conduce a un intercambio de valina por alanina en la posición 444, está sobrerepresentado en pacientes con daño hepatocelular (OR = 2,13; intervalo de confianza (IC) del 95%, 1,4-2,9; $P_c = 0,008$)³⁶. La presencia de, al menos, un alelo mutado (C) tiende a estar asociada con el fenotipo de baja expresión de BSEP en tejido hepático. Es interesante señalar que el grupo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos fue el que mostró un riesgo mayor (OR = 2,9; IC del 95%, 1,6-5,4; $P_c = 0,002$)³⁶. Modificaciones de la función de Bsep originadas por la presencia de polimorfismos genéticos en pacientes susceptibles pueden conducir a la acumulación intracelular de sales biliares tóxicas, situación que podría agravarse al administrar fármacos que a su vez inhiben al transportador Bsep.

En este estudio se exploraron también diferentes polimorfismos del transportador MRP2, no observándose diferencias en la distribución de los genotipos *ABCC2 C-24T*, *G1249A*, *T3563A* o *G4581A* con la población control, por lo que se podría concluir que no parece relevante el papel de los polimorfismos estudiados de *ABCC2* en la susceptibilidad a desarrollar DILI³⁶.

Resultados preliminares comunicados por el grupo DILI-GEN en el Reino Unido no muestran diferencias en la distribución de los diferentes polimorfismos de los transportadores MDR1, MDR3 y BSEP entre pacientes con daño hepático de tipo colestásico inducido por amoxicilina-clavulánico o flucloxacilina y población control³⁷.

Estrés celular y umbral de toxicidad mitocondrial

La mitocondria es la principal fuente de producción de energía en forma de ATP vía fosforilación oxidativa. Sin embargo, la cadena respiratoria mitocondrial produce también el anión superóxido (O_2^-), un radical libre altamente reactivo y citotóxico formado por la reducción parcial del oxígeno. La eliminación de este radical es efectuada por la enzima mitocondrial superóxido dismutasa, la cual contiene 1 átomo de manganeso como cofactor (*MnSOD*). Esta enzima está codificada por el gen *SOD2*, que contribuye a reducir el estrés oxidativo transformando el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 . La catalasa y glutatión peroxidasa 1 (*GPX1*) forman parte del sistema antioxidante de defensa celular y catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno a agua mediante la reducción del glutatión como cosustrato³⁸. Si los mecanismos de defensa antioxidante se ven comprometidos y/o se produce un incremento en el estrés oxidativo mitocondrial —que puede ser inducido por ciertos fármacos como diclofenaco, amiodarona, valproico, análogos de nucleósido³⁹—, ésta se constituye en un regulador crítico de la muerte celular mediante la oxidación de grupos sulfidrilos proteicos o la activación de vías de señalización mitocondrial de muerte celular. Así pues, la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo se encuentran íntimamente involucrados en la patogénesis de DILI, y la respuesta celular al estrés químico juega un papel determinante en la aparición del daño.

Una hipótesis emergente de considerable interés es el reconocimiento de un umbral de daño tóxico mitocondrial

basado en el modelo de estrés mitocondrial subclínico⁴⁰ (modelo de ratón heterocigoto *Sod 2+/-*), que lo hace más susceptible al daño oxidativo causado por fármacos al deplecionar el principal mecanismo de defensa antioxidante de la mitocondria. En consecuencia, factores genéticos que controlan los mecanismos de defensa mitocondrial así como su biogénesis pueden ser determinantes críticos para alcanzar el umbral que desencadene un daño hepático.

En un reciente estudio, pacientes caucásicos con daño hepático tóxico ocasionado por un amplio espectro de fármacos y portadores del genotipo *SOD2 Ala/Ala* (CC) o *GPX1 Leu/Leu* (TT) presentaban un riesgo incrementado de desarrollar el daño tipo colestásico/mixto¹². Es importante señalar que la mitocondria hepática es la principal organela productora de especies reactivas de oxígeno cuando los hepatocitos se exponen a los ácidos biliares⁴¹. Estos pacientes homocigotos para el alelo C mostraban, además, un riesgo mayor de desarrollar hepatotoxicidad cuando se administraban fármacos que se sabe que producen daño mitocondrial, o metabolitos intermediarios tipo quinona o epóxido (OR = 3,0; IC del 95%, 1,7-5,5; $P_c = 0,0008$) o electrofílicos como S-óxidos, diazenos (OR = 16,0; IC del 95%, 1,8-146,1; $P_c = 0,009$)¹².

Es de interés señalar que un estudio en 88 pacientes japoneses con toxicidad hepática por troglitazona no observó asociación entre el desarrollo de hepatotoxicidad y variaciones genéticas de la catalasa ni de la enzima *Sod1* (citosólica) mitocondrial, lo que sugiere que estas enzimas no tendrían un papel limitante en la eliminación del peróxido de hidrógeno generado²⁰.

Procesos de reparación y regeneración celulares

La integridad de las vías de adaptación puede ser un factor importante en la variabilidad individual a la aparición de daño. La adaptación puede ser consecuencia de la capacidad de la célula de contrarrestar los efectos de la exposición a metabolitos tóxicos, mediante la activación de factores de transcripción celular, como Nrf-2, que regula la síntesis de glutatión y otras enzimas detoxificadoras, o por la activación de los procesos de reparación y regeneración tisular⁴².

Respuesta del sistema inmune innato

El estrés celular origina también señales que estimulan en el organismo la participación de otras células del sistema inmune innato, particularmente células de Kupffer y *natural killer* (NK/NKT). La respuesta del sistema inmune determina la activación simultánea de 2 cascadas: una proinflamatoria, con la producción de citocinas y chemocinas como TNF (factor de necrosis tumoral), INF γ , FasL (fas ligando), que es contrabalanceada por la activación de interleucina (IL)-10, IL-6 y ciertas prostaglandinas que juegan un papel hepatoprotector. Del delicado balance en la producción de estos mediadores dependerá que la lesión inflamatoria inicial se resuelva (“adaptación”) o bien progrese a un daño hepático manifiesto. El sistema inmune innato se constituye así como un modulador esencial de la extensión e intensidad del daño hepático³.

Los modelos animales de hepatotoxicidad por paracetamol proporcionan datos que serían aplicables a la toxicidad idiosincrásica. El ratón *knockout* para IFNy, Fas o FasL es resistente a la toxicidad por paracetamol, mientras que los animales *knockout* para IL-10 e IL-6 presentan una susceptibilidad aumentada al daño hepático. Estos modelos ponen de manifiesto un hecho esencial, y es que en respuesta a la administración de dosis subtóxicas de paracetamol se pone en marcha una estimulación de la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias. Cuando la respuesta de citocinas antiinflamatorias se encuentra disminuida, el umbral para la aparición de daño hepático disminuye, y a la inversa⁴³.

Estos hallazgos sugieren la importancia que podría tener la existencia de variantes alélicas defectivas de determinadas citocinas inmunorreguladoras en la susceptibilidad a presentar DILI, probablemente como consecuencia de la incapacidad de adaptarse una vez iniciada la cascada de eventos que conducen a la lesión hepática. La IL-10 tiene una acción inmunsupresora, antiinflamatoria y antifibrótica. Curiosamente, los polimorfismos bajo productores de IL-4 e IL-10 no son más frecuentes en pacientes con DILI que en población control. Sin embargo, en un estudio⁴⁴, un polimorfismo bajo productor de IL-10 se asoció de forma significativa a la ausencia de eosinófilos en sangre periférica, y a evolución grave o fulminante, lo que sugiere que una vez iniciada la lesión, una respuesta Th2 disminuida podría favorecer la progresión de la inflamación y la necrosis hepáticas.

Sistema inmune adaptativo: complejo mayor de histocompatibilidad

De manera adicional a la activación del sistema inmune, que parece constituirse en un mecanismo modulador general para el desarrollo de hepatotoxicidad, algunos fármacos pueden originar un daño hepático por activación del sistema inmune adaptativo.

En la mayoría de los casos, la formación de derivados tóxicos a partir del metabolismo hepático del fármaco nativo se uniría covalentemente a constituyentes hepáticos provocando el daño de forma directa. En algunos sujetos predominaría una respuesta inmune frente a neoantígenos formados a través de la interacción de intermediarios tóxicos con las proteínas hepáticas. En este último supuesto deberían jugar un papel importante los antígenos de histocompatibilidad (HLA), ya que están implicados directamente en la presentación antigenica. Las proteínas hapteneadas son procesadas por las células presentadoras de antígenos y presentadas a las células T CD4+ o T helper, lo que desencadenaría una respuesta inmune celular (activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ citotóxicos) y humoral (activación de los linfocitos B con producción de anticuerpos)⁴⁵.

El complejo de histocompatibilidad mayor del huésped se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (5Mb). Comprende 150 genes, muchos de los cuales se han relacionado con enfermedades autoinmunes e inflamatorias, y más del 40% de las proteínas que codifica se relacionan con la respuesta inmune y señalización de los linfocitos T.

Los mecanismos que subyacen en la diferente expresión de lesión de la hepatotoxicidad por un fármaco determinado se desconocen actualmente. La edad avanzada y el sexo

masculino¹¹, así como determinados alelos HLA clase II parecen influenciar la probabilidad de que la hepatotoxicidad se exprese en forma colestásica/mixta⁴⁶. Contrariamente, el daño hepatocelular es más frecuente en sujetos más jóvenes y predominantemente del sexo femenino¹¹. Además, el sexo femenino se asocia a un mayor riesgo de evolución a fallo hepático fulminante⁵.

Amoxicilina-clavulánico es el antibiótico más ampliamente utilizado, representa la primera causa de hepatotoxicidad en las series europeas^{5,47} y americanas⁶, y supone el 17% de todas las hospitalizaciones por hepatotoxicidad en España⁵. El daño colestásico/mixto es la forma más frecuente de manifestación en las series publicadas, aunque curiosamente en España se presenta en un 36% de los casos como daño hepatocelular con predominio en sujetos menores de 60 años de edad¹¹.

Aunque el mecanismo de hepatotoxicidad por amoxicilina-clavulánico se desconoce, no obstante, 2 estudios independientes en Bélgica⁴⁸ y Escocia⁴⁹ que incluían un reducido número de pacientes, y utilizando técnicas genotípicas, encontraron una asociación entre la susceptibilidad a desarrollar hepatotoxicidad por amoxicilina-clavulánico y el haplotipo DRB1*1501-DQB1*0602. Más recientemente, un estudio en 27 pacientes españoles con hepatotoxicidad por amoxicilina-clavulánico y tipificación de baja resolución, detectó un incremento no significativo en DRB1*1501, pero mostró una frecuencia muy elevada de DQB1*06⁴⁶. Esta discrepancia en hallazgos se atribuyó al alto porcentaje de casos con expresión colestásica mixta de las series belga y escocesa. El análisis de los casos de amoxicilina-ácido clavulánico deriva de las asociaciones obtenidas en alelos HLA clase II en 140 pacientes españoles con hepatopatía idiosincrásica inducida por medicamentos, donde se obtuvo un aumento en la frecuencia de los alelos DRB1*15 y DQB1*06 en pacientes con daño hepático colestásico/mixto, y hubo igualmente una disminución en la frecuencia DRB1*07 y DQB1*02 en estos mismos pacientes⁴⁶. Ello indicaría que la influencia genética de los alelos HLA clase II en la lesión hepatotóxica influye en la expresión bioquímica del daño colestásico/mixto y, al mismo tiempo, sugiere que la mayoría de los casos de DILI con un daño tipo colestásico/mixto son de naturaleza inmunoalérgica.

Un estudio amplio del genoma en pacientes con hepatotoxicidad por ximelagatran –inhibidor directo de la trombina– encontró una frecuencia más elevada del alelo DRB1*0701 en 74 pacientes que habían desarrollado elevaciones de ALT durante el tratamiento con el anticoagulante, en comparación con 130 controles expuestos⁵⁰. Dado que la hepatotoxicidad por ximelagatran se manifiesta habitualmente como una hepatitis citolítica sin signos de inmunología, este estudio demuestra el potencial de los análisis amplios del genoma para identificar genes de susceptibilidad que no habrían sido seleccionados siguiendo una estrategia mecanística. Además, este caso subraya el papel destacado de la respuesta inmune como mecanismo crítico que modula el desarrollo de daño hepático tóxico.

Muy recientemente, el grupo DILIGEN en el Reino Unido ha encontrado en un estudio de análisis amplio del genoma una asociación entre los casos de hepatotoxicidad por flucloxacilina –fundamentalmente de carácter colestásico– con el alelo de clase I HLA-B*5701 que se encuentra en des-

equilibrio de unión con HLA-DRB1*0701⁵¹. Es interesante resaltar que el genotipo B*5701 se encuentra fuertemente asociado a la presentación de manifestaciones de hipersensibilidad graves tras la administración de abacavir⁵².

Los resultados del genotipado de alta resolución de los loci de HLA clase I (A, B y C) y de HLA clase II (DRB1, DQB1) de 57 pacientes españoles con hepatotoxicidad por amoxicilina-clavulánico han sido presentados en esta reunión de la AEEH⁵³. Se ha permitido identificar por vez primera que el alelo de clase I B*1801 tiene una gran influencia en el desarrollo de lesión de tipo hepatocelular, de mayor gravedad y peor curso evolutivo, y confirma el papel que el haplotipo DRB1*1501-DQB1*0602 juega en el desarrollo de la variedad colestásica/mixta.

Estos hallazgos deberán ser replicados en poblaciones pertenecientes a distintas etnias. Es interesante señalar que las diferencias en la frecuencia del alelo B*1801 –prácticamente inexistente en población norteafricana– podrían explicar las diferencias en el riesgo de desarrollar daño hepatocelular por amoxicilina-clavulánico observado entre poblaciones de distinta área geográfica.

Estas diferencias étnicas en la frecuencia alélica también se han comunicado para otros genes implicados en el transporte⁵⁴ o mecanismos de defensa celular¹² y, evidentemente, pueden modificar el comportamiento cinético de los fármacos y el nivel de susceptibilidad al desarrollo de reacciones hepatotóxicas.

En resumen, los avances en la compresión de los factores de riesgo que determinan las reacciones adversas a los fármacos y mejoran nuestra capacidad para predecir qué sujetos van a desarrollar con mayor probabilidad una reacción adversa a medicamentos, tendrá un impacto positivo en términos de salud pública, desarrollo de medicamentos y manejo del riesgo de toxicidad farmacológica una vez los fármacos alcancen el mercado farmacéutico.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Financiación

Beca de la Agencia Española del Medicamento y del FIS PS09/01384 y SAS PI-0082/2007.

El CIBERehd está financiado por el ISC III.

Relación de hospitales y miembros del Grupo Español para el Estudio de las Hepatopatías Asociadas a Medicamentos

- Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga (centro coordinador): R.J. Andrade, M.I. Lucena, M. García-Cortés, A. Fernández-Castañer, Y. Borraz, E. Uzurrun, M. Robles, K. Patchkoria, M.R. Cabello, E. García-Ruiz, J. Sánchez-Negrete, R. Cueto e I. Moreno.
- Hospital Torrecárdenas, Almería: M.C. Fernández, G. Pérez, R. Daza, M. Casado, J.L. Vega, F. Suárez, M. Torres, M. González-Sánchez y J. Esteban.

- Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla: M. Romero, M. Cuaresma, A. Rojas y E. Hoyas.
- Hospital de Mendaro, Guipúzcoa: A. Castiella y E.M. Zapata.
- Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona: R. Planas, J. Costa, A. Barriocanal, E. Montané, S. Anzola, N. López, F. García-Góngora, A. Borràs, E. Gallardo, A. Vaqué y A. Soler.
- Hospital Virgen de la Macarena, Sevilla: J.A. Durán, I. Carmona, A. Melcón de Dios, M. Jiménez-Sáez, J. Alanís-López y M. Villar.
- Hospital Central de Asturias, Oviedo: R. Pérez-Álvarez.
- Hospital Universitario San Cecilio, Granada: J. Salmerón y A. Gila.
- Hospital Costa del Sol, Málaga: J.M. Navarro y J.F. Rodríguez.
- Hospital de Sant Pau, Barcelona: C. Guarner, G. Soriano y E.M. Román.
- Hospital Puerta del Mar, Cádiz: F. Díaz.
- Hospital Morales Meseguer, Murcia: H. Hallal.
- Hospital 12 de Octubre, Madrid: T. Muñoz-Yagüe y J.A. Solís-Herruzo.
- Hospital Clínic, Barcelona: M. Bruguera.
- Hospital Marqués de Valdecilla, Santander: F. Pons.
- Hospital Xeral-Calde, Lugo: S. Ávila-Nasi.
- Hospital de Donostia, San Sebastián: M. García-Bengoechea.
- Hospital de Basurto, Bilbao: S. Blanco y P. Martínez-Odriozola.
- Hospital Carlos Haya, Málaga: M. Jiménez y R. González-Grande.
- Hospital del Mar, Barcelona: R. Solá.
- Hospital de Sagunto, Valencia: J. Primo y J.R. Molés.
- Hospital de Laredo, Cantabria: M. Carrascosa.
- Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife: M. Hernández-Guerra.
- Hospital de la Princesa, Madrid: J. Gisbert y M. Chaparro.
- Hospital Puerta de Hierro, Madrid: J.L. Calleja y J. de la Revilla.
- Hospital del Tajo, Aranjuez, Madrid: O. Lo Iacono.
- Hospital Miguel Pecette, Valencia: A. del Val.

Bibliografía

1. Ostapowicz G, Fontana RL, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med.* 2002;137:947-54.
2. Bénichou C. Criteria for drug-induced liver disorders. Report of an International Consensus meeting. *J Hepatol.* 1990;11:272-6.
3. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:489-99.
4. Bakke OM, Manocchia M, De Abajo F, Kaitin KI, Lasagna L. Drug safety discontinuations in the United Kingdom, the United States, and Spain from 1974 through 1993: a regulatory perspective. *Clin Pharmacol Ther.* 1995;58:108-17.
5. Andrade RJ, Lucena MI, Fernández MC, Peláez G, Pachkoria K, García-Ruiz E, et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology.* 2005;129:512-52.

6. Chalasani N, Fontana R, Bonkovsky MD, Watkins PB, Davern T, Serrano J, et al. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology*. 2008;135:1961-71.
7. Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, Shen Y, Pe'er I, Floratos A, et al. HLA-B*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nat Genet*. 2009;41:816-9.
8. Molokhia M, McKeigue P. EUDRAZENE: European collaboration to establish a case-control DNA collection for studying the genetic basis of adverse drug reactions. *Pharmacogenomics*. 2006;7:633-8.
9. Shah RR. Can pharmacogenetics help rescue drugs withdrawn from the market? *Pharmacogenomics*. 2006;7:889-908.
10. Daly A, Day CP. Genetic association studies in drug-induced liver injury. *Seminar Liver Dis*. 2009;29:400-11.
11. Lucena MI, Andrade RJ, Kaplowitz N, García-Cortés M, Fernández MC, Romero-Gómez M, et al. Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex. *Hepatology*. 2009;49:2001-9.
12. Andrade RJ, Martínez C, Ulzurrun E, García-Martín E, Stephens C, Peláez G, et al. Relevance of manganese superoxide dismutase (*sod2* val16ala) and glutathione peroxidase1 (*gpx1* pro-198leu) functional polymorphisms in patients with idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2009;50 Suppl: 1161A-2A.
13. Lammert C, Einarsson S, Saha C, Niklasson A, Björnsson E, Chalasani N. Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology*. 2008;47:2003-9.
14. Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol*. 2005;35:325-61.
15. Lammert C, Björnsson E, Niklasson A, Chalasani N. Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events. *Hepatology*. 2009. Epub ahead of print.
16. Aithal GP, Day CP, Leathart JB, Daly AK. Relationship of polymorphism in CYP2C9 to genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatitis. *Pharmacogenetics*. 2000;10:511-8.
17. Pachkoria K, Lucena MI, Ruiz-Cabello F, Crespo E, Cabello MR, Andrade RJ. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 are not related to drug-induced idiosyncratic liver injury (DILI). *Br J Pharmacol*. 2007;150:808-15.
18. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, et al. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*. 2003;37:924-30.
19. Daly AK, Aithal GP, Leathart JB, Swainsbury RA, Dang TS, Day CP. Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology*. 2007;132:272-81.
20. Watanabe I, Tomita A, Shimizu M, Sugawara M, Yasuno H, Koishi R, et al. A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;73:435-55.
21. Simon T, Becquemont L, Mary-Krause M, De Waziers I, Beaune P, Funck-Brentano C, et al. Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and tacrine hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;67:432-7.
22. Lucena MI, Andrade RJ, Martínez C, Ulzurrun E, García-Martín E, Borraz Y, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2008;48:588-96.
23. Agúndez JA, Golka K, Martínez C, Selinski S, Blaszkewicz M, García-Martin E. Unraveling ambiguous NAT2 genotyping data. *Clin Chem*. 2008;54:1390-4.
24. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Lai SL, Yang SY, et al. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*. 2002;35:883-9.
25. García-Martín E. Interethnic and intraethnic variability of NAT2 single nucleotide polymorphisms. *Curr Drug Metab*. 2008;9:487-97.
26. Iverson SL, Uetrecht JP. Identification of a reactive metabolite of terbinafine: insights into terbinafine-induced hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2001;14:175-81.
27. Pauli-Magnus C, Meier PJ. Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology*. 2006;44:778-87.
28. Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, et al. Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology*. 2006;130:1793-806.
29. Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, et al. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy—a genome-wide study. *N Engl J Med*. 2008;359:789-99.
30. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Eur J Physiol*. 2007;453:643-59.
31. Trauner M, Fickert P, Wagner M. MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Liver Dis*. 2007;27:77-98.
32. Meier Y, Zodan T, Lang C, Zimmermann R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, et al. Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of the 1331T>C polymorphism in the bile salt export pump. *World J Gastroenterol*. 2008;14:38-45.
33. Jacquemin E, De Vree JM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology*. 2001;120:1448-58.
34. Choi J, Ahn B, Yi J, Lee J, Lee J, Nam S, et al. MRP2 haplotypes confer differential susceptibility to toxic liver injury. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17:403-15.
35. Lang C, Meier Y, Stieger B, Beuers U, Lang T, Kerb R, et al. Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17:47-60.
36. Lucena MI, Crespo E, Ulzurrun E, Ruiz Cabello E, Borraz Y, Cueito R, et al. Role of polymorphic bile salt export pump (BSEP, ABCB11) and multidrug resistance associated protein 2 (MRP2, ABCC2) transporters in drug-induced liver injury. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2009;105 Suppl I:44-150.
37. Bhatnagar P, Day CP, Aithal G, Pirmohamed M, Bernal W, Daly AK. Genetic variants of hepatic transporters and susceptibility to drug induced liver injury. *Toxicology*. 2008;253:10A.
38. Boelsterli UA, Lim PLK. Mitochondrial abnormalities-A link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007;220:92-107.
39. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessaire D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*. 2002;65:166-176.
40. Boelsterli UA, Hsiao C-J. The heterozygous Sod2+/- mouse: modeling the mitochondrial role in drug toxicity. *Drug Discovery Today*. 2008;13:982-8.
41. Sokol RJ, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Kobak GE, Gumprecht E. Human hepatic mitochondria generate reactive oxygen species and undergo the permeability transition in response to hydrophobic bile acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;41:235-43.
42. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med*. 2009;30:29-41.
43. Bourdi M, Eiras DP, Holt M, Webster MR, Reilly TP, Welch KD, et al. Role of IL-6 in an IL-10 and IL-4 Double Knockout Mouse Model Uniquely Susceptible to Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Chem Res Toxicol*. 2007;20:208-16.

44. Pachkoria K, Lucena MI, Crespo E, Ruiz-Cabello F, López-Ortega S, Fernández MA, et al. Analysis of IL-10, IL-4 and TNF-alpha polymorphisms in drug-induced liver injury and its outcome. *J Hepatol.* 2008;49:107-14.
45. Utrecht J. Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future. *Chem Res Toxicol.* 2008;21:84-92.
46. Andrade RJ, Lucena MI, Alonso A, García-Cortés M, García-Ruiz E, Benítez R, et al. HLA class II genotype influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease. *Hepatology.* 2004;39:1603-12.
47. Lucena MI, Andrade RJ, Fernández MC, Pachkoria K, Peláez G, Durán JA, et al. Determinants of the clinical expression of amoxicillin-clavulanate hepatotoxicity: a prospective series from Spain. *Hepatology.* 2006;44:850-6.
48. Hautekeete ML, Horsmans Y, Waeyenberge CV, Demanet C, Henrion J, Verbist L, et al. HLA association of amoxicillin-clavulanate-induced hepatitis. *Gastroenterology.* 1999;117: 1181-6.
49. O'Donohue J, Oien KA, Donaldson P, Underhill J, Clare M, MacSween RN, et al. Co-amoxiclav jaundice: clinical and histological features and HLA class II association. *Gut.* 2000;47: 717-20.
50. Kindmark A, Jawaid A, Harbron CG, Barratt BJ, Bengtsson OF, Andersson TB, et al. Genome-wide pharmacogenetic investigation of a hepatic adverse event without clinical signs of immunopathology suggests an underlying immune pathogenesis. *Pharmacogenomics J.* 2008;8:186-95.
51. Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, Shen Y, Pe'er I, Floratos A, et al. HLA-B*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nature Genetics.* 2009;41:816-9.
52. Mallal S, Nolan D, Witt C, Massel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7 and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet.* 2002;359:727-32.
53. Stephens C, López-Nevot MA, Lucena MI, Ruiz-Cabello F, Ulzurrun E, Serrano A, et al. Influencia de los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) en la expresión fenotípica y evolución del daño hepático inducido (DILI) por amoxicilina-ácido clavulánico (AC). *Gastroenterol Hepatol.* 2010. En prensa.
54. Cueto R, Lucena MI, Crespo E, Ulzurrun E, Ruiz-Cabello F, Borraz Y, et al. Frequency of -24C>T polymorphism in the hepatic canalicular transporter ABCC2 gene in Spanish population. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2009;105 Suppl I:78 A.