



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN
TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD**
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DEL SISTEMA INMUNE Y LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL
DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS.
BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES**

Alejandro Cueto Sánchez

Mayo, 2023

Directores:

María Isabel Lucena González

Camilla Stephens

Tutor/a

María Isabel Lucena González





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Alejandro Cueto Sánchez

 <https://orcid.org/0000-0001-5861-9250>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña ALEJANDRO CUETO SÁNCHEZ

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: PAPEL DEL SISTEMA INMUNE Y LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS. BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES

Realizada bajo la tutorización de MARIA ISABEL LUCENA GONZÁLEZ y dirección de MARÍA ISABEL LUCENA GONZÁLEZ Y CAMILLA STEPHENS (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARÓ QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 16 de ENERO de 2023

Fdo.: ALEJANDRO CUETO SÁNCHEZ Doctorando/a	Fdo.: MARÍA ISABEL LUCENA GONZÁLEZ Tutor/a



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Fdo.: MARIA ISABEL LUCENA GONZÁLEZ

CAMILLA STEPHENS
Director/es de tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es

D^a. María Isabel Lucena González,

**Catedrática de farmacología de la Facultad de Medicina de la
Universidad de Málaga**

D^a. Camilla Stephens,

**Investigadora posdoctoral del departamento de Farmacología de la
Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga**

CERTIFICAN Que D. Alejandro Cueto Sánchez

**ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi dirección los datos
clínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada:
“Papel del sistema inmune y la microbiota intestinal en el daño
hepático inducido por fármacos. Búsqueda de nuevos
biomarcadores”, que considero tiene el contenido y rigor científico
necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que
nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.**

**Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes,
expido el presente certificado en**

Málaga 16 de enero 2023.

Directores

María Isabel Lucena González

Camilla Stephens

Tutora

María Isabel Lucena González

Fuentes de financiación de esta tesis doctoral:

El estudiante predoctoral fue financiado con un contrato *cofinanciado por el Instituto de Salud Carlos III, con código de expediente IFI18/00047, en virtud de Resolución de 12 de noviembre de 2018 de la Directora del Instituto de Salud 'Carlos III', O.A., M.P. por la que se conceden contratos i-PFIS: doctorados IIS-empresa en ciencias y tecnología de la salud de la convocatoria 2018 de la Acción Estratégica en Salud 2013–2016 y por el Programa Operativo de Empleo, Formación y Educación del Fondo Social Europeo para el período 2014-2020 «El FSE invierte en tu futuro»*

Este contrato se realizó en colaboración de la empresa DestiNA Genomics SL bajo la supervisión de Salvatore Pernagallo y Juan José Díaz Mochón.

Proyectos que han servido de financiación para elaborar este estudio doctoral:

- PI16/01748: Análisis de la respuesta inmunitaria adaptativa y los receptores implicados en el "immune-checkpoint" en el desarrollo y gravedad de la hepatotoxicidad. Influencia de la microbiota intestinal.
Investigadores principales: MI Lucena
Entidad/es financiadora/s: Instituto de Salud Carlos III
Fecha de inicio: 01/01/2017
Fecha de fin: 31/12/2029
Cuantía total: 151.915,5 €
- PI18/00901: Análisis de metabolómica y panel de biomarcadores en pacientes con hepatitis aguda. Búsqueda de un test diagnóstico en hepatotoxicidad.
Investigadores principales: M Robles
Entidad/es financiadora/s: Instituto de Salud Carlos III
Fecha de inicio: 01/01/2019
Fecha de fin: 30/06/2023
Cuantía total: 68.970 €
- PI19/00883: Análisis de las poblaciones linfocitarias inmunoreguladoras en hepatotoxicidad mediante citometría de masas (CyTOF): detectando la huella dactilar inmunológica de la hepatotoxicidad inducida por fármacos.
Investigadores principales: MI Lucena, C Stephens
Entidad/es financiadora/s: Instituto de Salud Carlos III
Fecha de inicio: 01/01/2020
Fecha de fin: 30/06/2024
Cuantía total: 93.170 €
- P18-RT-3364: Exosomas, respuesta inmunitaria y su modulación por la microbiota intestinal en la identificación de biomarcadores mecanísticos y pronósticos en hepatotoxicidad.
Investigadores principales: MI Lucena, C Stephens
Entidad/es financiadora/s: Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI)
Fecha de inicio: 14/11/2020
Fecha de fin: 31/3/2023
Cuantía total: 140.352 €

Artículos publicados durante el tiempo del estudio doctoral:

Cueto-Sanchez A, Niu H, Del Campo-Herrera E, Robles-Díaz M, Sanabria-Cabrera J, Ortega-Alonso A, Garcia-Cortes M, Gonzalez-Grande R, Jimenez-Perez M, Ruiz-Cabello F, Andrade RJ, Lucena MI, Stephens C. *Lymphocyte Profile and Immune Checkpoint Expression in Drug-Induced Liver Injury: An Immunophenotyping Study.* *Clin Pharmacol Ther.* 2021 Dec;110(6):1604-1612. doi: 10.1002/cpt.2423. Epub 2021 Oct 3. PMID: 34543448.

Este artículo mereció un comentario acompañante realizado por el profesor Paul B Watkins, Profesor de Medicina, Profesor de Toxicología y Profesor de Terapéutica Experimental en la Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill:

Watkins PB. *Liver Injury Due to Drugs and Viruses: Mechanistic Similarities and Implications for AAV Gene Therapy.* *Clin Pharmacol Ther.* 2022 Oct;112(4):751-753. doi: 10.1002/cpt.2500. Epub 2021 Dec 15. PMID: 34910298.

Cueto-Sanchez A, Niu H, Alvarez-Alvarez I, López-Longarela B, Del Campo-Herrera E, Ortega-Alonso A, Garcia-Cortes M, Pinazo-Bandera J, Sanabria-Cabrera J, Diaz-Mochón JJ, Lucena MI, Andrade RJ, Stephens C, Robles-Díaz M. *Evaluation of diagnostic and prognostic candidate biomarkers in drug-induced liver injury versus other forms of acute liver damage.* *Br J Clin Pharmacol.* 2023 Mar 25. doi: 10.1111/bcp.15724. Epub ahead of print. PMID: 36965054

Cueto-Sanchez A, Di Zeo-Sanchez DE, Segovia-Zafra A, Matilla-Cabello G, Bodoque-García A, Lucena MI, Villanueva-Paz M. *Immunophenotyping to improve the mechanistic understanding of idiosyncratic drug-induced liver injury: clinical implications and future directions.* *Explor Dig Dis.* 2023;2:56–76. <https://doi.org/10.37349/edd.2023.00018>

Cueto-Sanchez A, Niu H, Alvarez-Alvarez I, Del Campo-Herrera E, Rodriguez-Diaz C, Ortega-Alonso A, Garcia-Cortes M, Pinazo-Bandera J, Sanabria-Cabrera J, Robles-Díaz M, Lucena MI, Andrade RJ, Stephens C. *Intestinal microbiota in patients with drug-induced liver injury: an exploratory study.* (pendiente de mandar a publicar).

Trabajos presentados a congresos durante el tiempo del estudio doctoral:

Título del trabajo: 588 - GUT MICROBIOTA COMPOSITION IN PATIENTS WITH DRUG-INDUCED LIVER INJURY COMPARED TO OTHER FORMS OF ACUTE LIVER INJURY AND HEALTHY CONTROLS.

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Niu H; Alvarez-Alvarez I; Rodriguez-Diaz C; Bodoque-Garcia A; Di Zeo-Sánchez D; Ortega-Alonso A; Garcia-Cortes M; Robles-Diaz M; Lucena MI; Andrade RJ; Stephens C.

Nombre del congreso: 19th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology

Fecha de celebración: 02/07/2023

Fecha de finalización: 07/07/2023

Entidad organizadora: British Pharmacological Society and International Union of Basic and Clinical Pharmacologists (IUPHAR)

Título del trabajo: CO023- ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS FRENTE A OTRAS FORMAS DE LESIÓN HEPÁTICA AGUDA Y CONTROLES SANOS.

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Niu H; Alvarez-Alvarez I; Rodriguez-Diaz C; Bodoque-Garcia A; Di Zeo-Sánchez D, Ortega-Alonso A, Garcia-Cortes M, Robles-Diaz M, Lucena MI, Andrade RJ, Stephens C.

Nombre del congreso: LXXXII Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva (SEPD)

Fecha de celebración: 08/06/23

Fecha de finalización: 10/06/23

Entidad organizadora: Sociedad Española de Patología Digestiva (SEPD)

* PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN ORAL DE HÍGADO

Título del trabajo: 01935- ANÁLISIS DE LOS NIVELES SÉRICOS DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN EL DAÑO INDUCIDO POR FÁRMACOS Y OTRAS VARIETADES DE LESIÓN HEPÁTICA AGUDA.

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Di Zeo-Sanchez D; Pinazo-Bandera J; Ortega-Alonso A; Garcia-Cortes M; Robles-Diaz M; Lucena MI; Andrade RJ; Stephens C.

Nombre del congreso: 48 Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH)

Fecha de celebración: 15/03/2023

Fecha de finalización: 17/03/2023

Entidad organizadora: Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH)

Título del trabajo: 01934- ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS FRENTE A OTRAS FORMAS DE LESIÓN HEPÁTICA AGUDA Y CONTROLES SANOS.

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Niu H; Alvarez-Alvarez I; Rodriguez-Diaz C; Bodoque-Garcia A; Di Zeo-Sanchez D; Ortega-Alonso A; Garcia-Cortes M; Robles-Diaz M; Lucena MI; Andrade RJ; Stephens C.

Nombre del congreso: 48 Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH)

Fecha de celebración: 15/03/2023

Fecha de finalización: 17/03/2023

Entidad organizadora: Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH)

Título del trabajo: CP053 - EVALUACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES POTENCIALES PARA EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Garcia-Cortes M; Sanabria-Cabrera J; Lopez-Longarela B; Martinez-Gomez E; Sanjuan-Jimenez R; Ortega-Alonso A; Gonzales-Grande R; Jimenez M; Diaz-Mochon J; Lucena MI; Robles-Diaz M; Stephens C; Andrade RJ.

Nombre del congreso: I Congreso Virtual de Digestivo SEPD

Fecha de celebración: 18/06/2022

Fecha de finalización: 20/06/2022

Entidad organizadora: Sociedad Española de Patología Digestiva (SEPD)

Título del trabajo: 1201. COMPARISON OF GUT MICROBIOTA COMPOSITION BETWEEN PATIENTS WITH DRUG-INDUCED LIVER INJURY, OTHER FORMS OF LIVER INJURY AND HEALTHY CONTROLS

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Robles-Diaz M; Garcia-Cortes M; Ortega-Alonso A; Sanabria-Cabrera J; Pinazo-Bandera J; Del Campo-Herrera E; Gonzalez- Grande R; Jiménez M; Lucena MI; Stephens C; Andrade RJ.

Nombre del congreso: AASLD- The liver Meeting DIGITAL EXPERIENCE.

Fecha de celebración: 12/11/2021

Fecha de finalización: 15/11/2021

Entidad organizadora: American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)

Publicado: Hepatology 2021; 74 (Suppl S1): 721A (#1201).

Título del trabajo: 43- ROLE OF IMMUNE CHECKPOINTS AND ACTIVATED HELPER AND CYTOTOXIC T-CELLS IN DRUG-INDUCED LIVER INJURY (DILI)

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Sanabria-Cabrera J; Robles-Diaz M; Ortega-Alonso A; Garcia-Cortes M; Del Campo-Herrera E; Gonzalez-Grande R; Jimenez M; Ruiz-Cabello F; Andrade; M Isabel Lucena; Stephens C.

Nombre del congreso: EACPT Virtual Meeting 2021

Fecha de celebración: 28/06/2021

Fecha de finalización: 28/06/2021

Entidad organizadora: The European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT)

Publicado: "Eur J Clin Pharmacol (2021) 77 (Suppl 1): S1-S42".

Título del trabajo: O-2 ROLE OF IMMUNE CHECKPOINTS AND ACTIVATED HELPER AND CYTOTOXIC T-CELLS IN DRUG-INDUCED LIVER INJURY (DILI)

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Sanabria-Cabrera J; Robles-Diaz M; Ortega-Alonso A; M Garcia-Cortes; Del Campo-Herrera E; Gonzalez-Grande R; Jimenez M; Ruiz-Cabello F; Lucena MI; RJ Andrade; Stephens C.

Nombre del congreso: Congreso ALEH

Fecha de celebración: 21/04/2021

Fecha de finalización: 24/04/2021

Entidad organizadora: Asociación latinoamericana para el estudio del hígado

Publicado: "Annals of hepatology volumen 24, issue S1".

Título del trabajo: 1206. ROLE OF IMMUNE CHECKPOINTS AND ACTIVATED CD4+ AND CD8+ LYMPHOCYTES IN DRUG-INDUCED LIVER INJURY (DILI) DEVELOPMENT

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Robles-Diaz M; Ortega-Alonso A; Garcia-Cortes M; Sanabria Cabrera J; Del Campo-Herrera E; Gonzalez-Grande R; Jimenez M; Ruiz-Cabello F; Lucena MI; Stephens C; Andrade RJ

Nombre del congreso: 71st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), the Liver Meeting Digital Experience.

Fecha de celebración: 13/11/2020

Fecha de finalización: 16/11/2020

Entidad organizadora: American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)

Publicado: Hepatology 72 (Suppl S1): 725A (#1206).

Premio: AASLD Presidential Poster of Distinction

Título del trabajo: 2331 - ROLE OF OSTEOPONTIN, CYTOKERATIN 18, AND MICRORNA-122 AS BIOMARKERS FOR IDIOSYNCRATIC DRUG-INDUCED LIVER INJURY AND ACUTE VIRAL HEPATITIS

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Martinez-Gomez E; López-Longarela B; Sanabria-Cabrera J; Sanjuan- Jimenez R; Ortega-Alonso A; Garcia-Cortes M; Gonzalez-Grande R; Jimenez M; Diaz-Mochón J; Aithal GP; Lucena MI; Robles-Díaz M; Stephens C; Andrade RJ.

Nombre del congreso: 70th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD).

Fecha de celebración: 08/11/2019

Fecha de finalización: 12/11/2019

Entidad organizadora: American Association for the Study of Liver Disease (AASLD)

Publicado: Hepatology 70 (Suppl S1): 1371A-1372A (#2331)

Premio: AASLD Presidential Poster of Distinction

Título del trabajo: EVALUACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES POTENCIALES PARA EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS

Autores: **Cueto-Sanchez A**; Garcia-Cortes M; Sanabria-Cabrera J; Lopez-Longarela B; Martinez-Gomez E; Sanjuan-Jimenez R; Ortega-Alonso A; Gonzales-Grande R; Jimenez M; Diaz-Mochon J; Lucena MI; Robles-Diaz M; Stephens C; Andrade RJ.

Nombre del congreso: 1ª Reunión de Hepatología Traslacional

Fecha de celebración: 04/10/2019

Fecha de finalización: 05/10/2019

Entidad organizadora: Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH)

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido, de una u otra manera, en la realización de mi tesis doctoral.

En primer lugar, a mi directora Camilla, por su enseñanza constante, orientación y absoluta dedicación en todo momento. *“Sé que he sido un poco difícil en algunas ocasiones, pero me has enseñado mucho y no podría haber tenido una mejor directora de tesis. Muchísimas gracias por todo”*.

En segundo lugar, quisiera agradecer a los profesores María Isabel Lucena y Raúl Andrade por darme la oportunidad de entrar en un grupo tan competente y por brindarme una oportunidad laboral única. *“Estar en un grupo así me ha ayudado mucho a mejorar tanto en lo personal como en lo profesional. Además, habéis logrado crear un ambiente de trabajo excepcional que difícilmente se iguala. Enhorabuena y gracias”*.

También quiero agradecer a todos mis compañeros, tanto aquellos que han pasado por el grupo y ya no se encuentran, como a los que siguen actualmente. *“Sois muchos, y no podría hacer una lista con vuestros nombres, pero todos me habéis ayudado de una forma u otra. Sin la ayuda de cada uno de vosotros, no habría podido completar mi tesis”*.

Agradezco también a Juan José Díaz Mochón y Salvatore Pernangallo por permitirme colaborar con DestiNA Genomics para la realización de parte de esta tesis doctoral, así como a Bárbara por su ayuda en el laboratorio.

A mi familia, a mi hermano Adrián, primos, tías, sobrinos y ahijado. En especial, quiero destacar a mis padres, Mari Carmen y José Luis, quienes me permitieron dedicarme a lo que me gustaba y me han facilitado todo el camino para llegar a hasta donde he llegado. *“Gracias a todos por vuestro apoyo”*.

Quiero agradecer de forma especial a mi pareja, Andrea, porque sin su ayuda incansable y su apoyo, esta tesis no hubiera sido posible. *“Me has aguantado y ayudado durante estos años en los momentos más difíciles, que no han sido pocos, y he podido superarlos gracias a ti. Eres la persona más maravillosa del mundo y lo demuestras día tras día. Gracias de verdad, porque este trabajo no habría sido posible sin tu ayuda. Te quiero”*.

Por último, una figura especial que quiero destacar es a mi perrita Mamba, que sin su locura la vida sería más aburrida.

Gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS	3
Tipos de DILI: intrínseco e idiosincrásico	3
Intrínseco	3
Idiosincrásico	4
Incidencia	4
Características del DILI	5
Criterios DILI	5
Patrón de daño del DILI	6
Flujo diagnóstico	7
Causalidad del fármaco	8
Gravedad y cronicidad	9
MECANISMO DE DILI	11
El papel del metabolismo de los fármacos en el DILI	11
Fases del metabolismo de los fármacos	11
Formación de metabolitos reactivos	12
Efecto dañino de los fármacos en la célula	13
Producción de estrés oxidativo	13
Daño mitocondrial por los fármacos	13
Alteración de la homeostasis de ácidos biliares y daño del retículo endoplasmático	15
Sistema inmune en DILI	16
Sistema inmune innato	17
Sistema inmune adaptativo	19
Tolerancia inmune	21
La microbiota intestinal en el ser humano	23
Funciones importantes de la microbiota en el ser humano	24
Metabolismo de nutrientes.	24
Defensa frente a patógenos.	24
Relación microbiota- fármacos.	25
Homeostasis del sistema inmune.	26
La microbiota podría participar en la tolerancia hepática.	28
Hipótesis del papel de la microbiota en DILI	29
Importancia eje intestino-hígado, disbiosis y enfermedades del hígado	29
Papel del LPS en el DILI	29
Aumento del efecto hepatotóxico de los fármacos	30
NUEVOS HORIZONTES EN EL DIAGNÓSTICO DE DILI	33
Búsqueda de biomarcadores candidatos	33
MicroRNA-122	34
Citoqueratina-18	34
Alfa-glutación S-transferasa	35
Osteopontina	35
Búsqueda de una huella inmunológica en DILI	36
Búsqueda de un perfil de citocinas en DILI	37
Búsqueda de un patrón de microbiota en DILI	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES CANDIDATOS DIAGNÓSTICOS Y PRONÓSTICOS EN EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS FRENTE A OTRAS FORMAS DE DAÑO HEPÁTICO AGUDO	45

INTRODUCCIÓN	47
MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
Sujetos y protocolo de estudio.....	48
Recogida y preparación de muestras	49
Análisis de los biomarcadores candidatos.....	49
Análisis estadístico	50
RESULTADOS	50
Descripción de la cohorte del estudio.....	50
Rendimiento de los biomarcadores	50
Progresión de los biomarcadores durante el episodio hepático.....	54
Potencial pronóstico	56
Correlación entre los biomarcadores candidatos y los parámetros bioquímicos convencionales	56
DISCUSIÓN	59
PERFIL LINFOCITARIO Y EXPRESIÓN DE LOS IMMUNE-CHECKPOINTS EN EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS: UN ESTUDIO DEL INMUNOFENOTIPADO	65
INTRODUCCIÓN	67
MATERIALES Y MÉTODOS	68
Sujetos y protocolo de estudio.....	68
Recogida y preparación de muestras	69
Citometría de flujo multiparamétrica	70
Análisis estadístico	72
RESULTADOS	72
Descripción de la cohorte del estudio.....	72
Variaciones en las poblaciones de leucocitos.....	74
Variaciones en los immune-checkpoints	79
DISCUSIÓN	80
ANÁLISIS DE LOS NIVELES SÉRICOS DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS EN EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS Y OTRAS VARIEDADES DE DAÑO HEPÁTICO AGUDO	83
INTRODUCCIÓN	85
MATERIAL Y MÉTODOS.....	86
Sujetos y protocolo de estudio.....	86
Recogida de muestras	86
Ensayo Luminex.....	87
Análisis estadístico	87
RESULTADOS	87
Descripción de la cohorte del estudio.....	87
Cambios en los perfiles de citocinas y quimiocinas.....	88
DISCUSIÓN	91
MICROBIOTA INTESTINAL EN PACIENTES CON DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS: UN ESTUDIO EXPLORATORIO.....	95
INTRODUCCIÓN	97
MATERIAL Y MÉTODOS.....	97
Sujetos y protocolo de estudio.....	97
Recogida y preparación de muestras	98
Extracción de ADN	98
Preparación de librerías y secuenciación.....	99
Análisis bioinformático	100
Análisis estadístico	100
RESULTADOS	101

Descripción de la cohorte del estudio.....	101
Análisis de la microbiota fecal	103
Diversidad α	103
Diversidad β	105
DISCUSIÓN	111
DISCUSIÓN GENERAL	115
CONCLUSIONES	131
REFERENCIAS	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de riesgo potenciales en el DILI.....	11
Figura 2. Mecanismo de la inflamación estéril en el DILI.....	18
Figura 3. Vías de activación del sistema inmune adaptativo en el DILI.....	21
Figura 4. El mecanismo hipotético del papel de la microbiota en DILI.....	31
Figura 5. Nuevos horizontes en el diagnóstico y estudio del mecanismo de DILI	39
Figura 6. Progresión de los biomarcadores a lo largo del tiempo	55
Figura 7. Evaluación del potencial pronóstico de los biomarcadores	57
Figura 8. Mapa de calor de correlación de Spearman	58
Figura 9. Presentación esquemática de los immune-checkpoints	68
Figura 10. Comparación de los resultados de la citometría de flujo.	77
Figura 11. Estudio longitudinal de las poblaciones leucocitarias.....	78
Figura 12. Niveles de las citocinas/quimiocinas	90
Figura 13. Comparación de la α -diversidad	104
Figura 14. Diagrama de Venn	105
Figura 15. Gráfico de un análisis de componentes principales (PCA).....	106
Figura 16. Abundancia relativa a nivel de familia	107
Figura 17. Abundancia relativa a nivel de género.....	108
Figura 18. Figura esquemática del mecanismo de DILI.....	130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización fenotípica del DILI	6
Tabla 2. Comparación de datos demográficos y características clínicas.....	52
Tabla 3. Rendimiento de los biomarcadores analizados entre DILI, ALI y HLC	53
Tabla 4. Rendimiento de los biomarcadores analizados entre DILI, VH y AIH.....	54
Tabla 5. Combinación de marcadores utilizados para analizar diferentes poblaciones	71
Tabla 6. Comparación de los datos demográficos y las características clínicas.....	73
Tabla 7. Recuento absoluto y porcentaje de poblaciones de leucocitos	75
Tabla 8. Comparación de datos demográficos y características clínicas.....	89
Tabla 9. Comparación de datos demográficos y características clínicas.....	102
Tabla 10. Abundancia relativa media de familias y géneros bacterianos.....	109

ABREVIATURAS

ACLF	Acute-on-chronic liver failure/ Insuficiencia hepática aguda sobre crónica
ADNmt	ADN mitocondrial
AIH	Autoimmune hepatitis/ Hepatitis autoinmune
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
α-GST	Alfa-glutación S-transferasa
ALF	Acute liver failure/ Insuficiencia hepática aguda
ALI	Acute liver injury controls / Controles de daño hepático agudo no DILI
ALT	Alanina aminotransferasa
AMP	Antimicrobial peptides/ Péptidos antimicrobianos
AMPK	AMP-activated protein kinase/ Proteína quinasa activada por AMP
APAP	Acetaminophen/ Acetaminofeno
APC	Antigen presenting cell/ Célula presentadora de antígenos
ARE	Antioxidant response element/ Elemento de respuesta antioxidante
AUC	Area under the curve/ Área bajo la curva
BSEP	Bile salt export pump/ Bomba de exportación de sales biliares
ckK18	Caspase-cleaved cytokeratin 18/ Citoqueratina 18 escindida por caspasas
CD	Cúmulo de diferenciación
Células T$\gamma\delta$	Células T gamma-delta
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Sciences
CMV	Citomegalovirus
CREB	CAMP responsive element binding/ factor de unión al elemento sensible al cAMP
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4/ Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1/ Citocromo P450 2E1
D-GalN	D-galactosamina
DAMP	Damage-associated molecular pattern/ Patrones moleculares asociados a daño
DC	Dendritic cell/ Células dendríticas
DILI	Drug-induced liver injury/ Daño hepático inducido por fármacos
FA	Fosfatasa alcalina
FABP1	Fatty acid-binding protein 1/ Proteína de unión a ácidos grasos
FHF	Fallo hepático fulminante
GALT	Gut-associated lymphoid tissue/ Tejido linfoide asociado con el intestino
GGT	Gamma-glutamyl transferasa
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor/ Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HCC	Hepatocellular carcinoma/ Carcinoma hepatocelular
HDS	Herbal and dietary supplements/ Suplementos herbales y dietéticos

HLA	Human leukocyte antigen/ Antígenos leucocitarios humanos
HLC	Healthy liver controls/ Controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI
HMGB1	High-mobility group box-1/ Proteína del cuadro 1 del grupo de alta movilidad
HSC	Hepatic stellate cell/ Células estrelladas hepáticas
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
ICI	Immune-checkpoints inhibitor/ Inhibidores de los puntos de control inmunitarios
ICOS	Inducible T-cell coestimulator/ Coestimulador de linfocitos T
ICOS-L	Ligando de ICOS
IFN-β	Interferón beta
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
JNK	Jun N-terminal kinase
K18	Cytokeratin 18/ Citoqueratina 18
KC	Kupffer cells/ Células de Kupffer
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1/ Proteína 1 asociada a ECH Tipo Kelch
LBP	LPS binding protein/ Proteína de unión a LPS
LPS	Lipopolisacárido
LSEC	Liver sinuoidal endotelial cell/ Células endoteliales sinusoidales hepáticas
LSN	Límite superior de la normalidad
MCSF1R	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor/ Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos
MD2	Myeloid differentiation factor 2/ Factor de diferenciación mieloide 2
miR-122	MicroRNA-122
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore/ Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease/ Enfermedad hepática por grasa no alcohólica
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis/ Esteatohepatitis no alcohólica
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells/ Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Natural killer/ Células asesinas naturales
NKT	Natural killer T cell/ Células T asesinas naturales
NLR	NOD-like receptor/ Receptor tipo NOD
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/ Factor nuclear derivado de eritroide 2
OPN	Osteopontina
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern/ Patrones moleculares asociados a patógenos
PD-1	Programmed cell death protein 1/ Proteína de muerte celular programada 1

PD-L1	Ligando de PD-1
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha/ Coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferado de peroxisomas
PRR	Pattern recognition receptor/ Receptores de reconocimiento de patrones
RE	Retículo endoplasmático
RECAM	Revised electronic causality assessment method
ROC	Receiver operator characteristic/ Curva característica del operador
ROS	Reactive oxygen species/ Especies reactivas de oxígeno
RUCAM	Roussel Uclaf Causality Assessment Method
SCFA	Short-chain fatty acid/ Ácidos grasos de cadena corta
TCR	T-cell receptor/ Receptor de linfocitos T
TGF-β	Transforming growth factor beta/ Factor de crecimiento transformante beta
Th	T helper cell (CD4+)/ Linfocitos colaboradores (CD4+)
TLR	Toll-like receptor/ Receptor tipo Toll
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha/ Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL	TNF-related apoptosis- inducing ligand/ Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF
Treg	Linfocitos T reguladores
UKE	Unknown etiology/ Grupo de etiología desconocida
UPR	Unfolded protein response/ vías de respuesta a proteínas desplegadas
VEB	Virus de Epstein-Barr
VH	Viral hepatitis/ Hepatitis viral
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHE	Virus de la hepatitis E

INTRODUCCIÓN



El Daño Hepático Inducido Por Fármacos

En ciertas ocasiones, los fármacos pueden producir reacciones adversas que afectan al hígado generando una condición conocida como “hepatotoxicidad” o daño hepático inducido por fármacos (DILI del inglés *drug-induced liver injury*). Aunque la incidencia de DILI es relativamente baja en la población general, tiene un gran impacto en la salud de los pacientes afectados debido a que puede evolucionar hacia un fallo hepático fulminante (FHF, o ALF del inglés *acute liver failure*) y, en algunos casos, requerir un trasplante hepático o incluso conducir a la muerte ¹. El DILI también representa un problema significativo para la industria farmacéutica, ya que puede ser una de las causas principales de la interrupción del desarrollo de nuevos medicamentos y de la retirada de aquellos que ya se encuentran en el mercado ². Sin embargo, en la actualidad debido a la implementación de ensayos clínicos mejor diseñados y a controles más estrictos en cuanto a la seguridad de los medicamentos, la mayoría de los medicamentos causantes de DILI nunca llegan a comercializarse ³.

La hepatotoxicidad no se asocia únicamente al consumo de fármacos convencionales, si no que cada vez se describen más episodios de daño hepático asociados al consumo de suplementos herbales y dietéticos (HDS del inglés *herbal and dietary supplements*) ⁴⁻⁶. Estos productos se consumen como alternativa a los fármacos, para el tratamiento de una infinidad de dolencias, con la idea errónea de que al ser productos naturales son inocuos y presentan menos contraindicaciones ⁷. Se adquieren fácilmente ya que no se requieren recetas médicas como ocurre con los medicamentos. Además, estos productos no pasan por controles de calidad ni existen entidades reguladoras como si ocurre con los medicamentos convencionales ⁸. En un estudio de 2019 en EEUU se analizó el contenido de los productos herbales asociado a DILI y se encontró que de 272 productos el 51 % tenía un mal etiquetado del contenido químico ⁹. Esto podría aumentar el riesgo de desarrollar DILI, por lo que es necesario implementar medidas de control en la regulación de estos productos.

Tipos de DILI: intrínseco e idiosincrásico

Intrínseco

El DILI de tipo intrínseco se caracteriza por presentar un efecto tóxico dosis-dependiente, con un tiempo de latencia por norma general corto y consistente ¹⁰. El acetaminofeno (APAP) es un ejemplo de fármaco que produce este tipo de daño. A dosis terapéuticas es

bien tolerado, sin embargo, superar ciertas dosis puede conducir a la aparición de graves problemas de salud. La sobredosis por APAP constituye en torno al 40% de los casos de ALF ^{11,12}.

Idiosincrásico

El daño hepático denominado idiosincrásico es el tipo de hepatotoxicidad en el cual se ha basado esta tesis doctoral. Este tipo de daño se considera que es multifactorial e impredecible, ya que depende tanto de las propiedades del fármaco como por su interacción con factores ambientales y del huésped ¹³.

A diferencia del tipo intrínseco se produce a dosis terapéuticas en un porcentaje muy bajo de los individuos que toman un fármaco ¹⁴. Además, no existe una relación directa entre la dosis y el daño producido, sin embargo, se piensa que se necesita superar un cierto umbral de dosis, específico para cada persona, para que aparezca el daño ^{15,16}. Otra diferencia con el tipo intrínseco es que el periodo de latencia puede variar desde unas pocas semanas hasta meses ¹⁷. En la mayoría de los casos el daño remite cuando se suspende la medicación, no obstante, el episodio puede llegar a producir ALF.

La naturaleza de los principales agentes causantes de DILI es muy diversa y varía mucho entre los diferentes estudios y registros. En EEUU y Europa los fármacos antiinfecciosos, en concreto la amoxicilina clavulánico, es la principal causa de DILI ^{1,17,18}. Sin embargo, en otros países como China los productos herbales encabezan la lista de las principales causas de DILI ¹⁹. En países en vías de desarrollo como la India la combinación de fármacos contra la tuberculosis supone la causa principal de DILI, seguido de las medicinas tradicionales ²⁰.

Incidencia

La evaluación de la incidencia en enfermedades como el DILI supone una tarea de gran dificultad. Esto es debido a que es complicado tener registrado tanto los pacientes que han tomado un determinado fármaco, como constancia del número de casos DILI que se han producido por su consumo. Para poder obtener resultados fiables de incidencia, es necesario realizar estudios de base poblacional y hasta la fecha estos han sido limitados. Existen dos estudios prospectivos conocidos que si basan sus resultados en una población concreta. En el primero realizado en Francia por Sgro *et al* se obtuvo un resultado de la incidencia de DILI de 13.9 casos cada 100000 habitantes al año ²¹. Posteriormente en

Islandia Björnsson *et al*, realizaron un estudio que incluyó a toda la población del país, obteniendo una incidencia de 19.1 cada 100000 habitantes ¹⁸. En otro estudio de tipo retrospectivo realizado en China se obtuvo una tasa de 23.8 de cada 100000 habitantes al año ¹⁹.

Estas diferencias observadas entre los estudios sobre DILI podrían deberse a las variaciones en los criterios de diagnóstico utilizados, así como a las diferencias culturales y las variaciones en las tasas de prescripción de medicamentos entre las diferentes regiones. Además, el consumo de medicinas alternativas también puede influir en los resultados de los estudios. Es importante tener en cuenta estos factores al evaluar los resultados de los estudios sobre DILI.

Características del DILI

Criterios DILI

Para valorar el estado funcional e inflamatorio del hígado se realiza la medición de las transaminasas junto a otros parámetros bioquímicos como son la fosfatasa alcalina (FA) y la bilirrubina total (BT). La lesión hepática en el contexto del DILI se ha definido como una elevación de la concentración sérica de alanina aminotransferasa (ALT) o bilirrubina conjugada superior a 2 veces el límite superior de la normalidad (LSN), o una elevación combinada de aspartato aminotransferasa (AST), FA y bilirrubina total siempre y cuando uno de estos sea mayor a 2x LSN ²². Sin embargo, estos criterios presentan una serie de limitaciones principalmente debido a que las transaminasas pueden incrementar sus niveles en sangre por diferentes motivos. La AST y ALT no son marcadores específicos del hígado, también se encuentran en el tejido muscular y tras una sesión de entrenamiento intenso pueden incrementarse sus niveles en sangre ²³. Además, muchos fármacos pueden generar elevaciones transitorias de las transaminasas que no desembocan en un DILI grave, y los niveles pueden normalizar incluso sin suspender el tratamiento, produciendo lo que se conoce como fenómeno de adaptación ²⁴. Del mismo modo, la incidencia cada vez mayor de otras patologías hepáticas, como la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD del inglés *Non-alcoholic fatty liver disease*), también puede contribuir al aumento de la ALT detectada en la clínica, lo que podría enmascarar el DILI. Por ello, en 2011, Aithal *et al* desarrollaron un trabajo consenso de los criterios a tener en cuenta a la hora de considerar un caso de DILI de importancia clínica (Tabla 1). Con estos nuevos criterios se buscó superar las limitaciones de los criterios anteriores utilizados en

el diagnóstico de DILI. Esto permitiría que los casos de DILI que no cumplen los criterios y que no representan un riesgo clínicamente alto, puedan mantener la medicación y evitar la interrupción de un tratamiento específico ²⁵.

Tabla 1. Caracterización fenotípica del DILI. Se indican los criterios utilizados para el diagnóstico, para evaluar el tipo de daño y para la clasificación de la gravedad.

Criterios de DILI	Tipo de patrón de daño	Gravedad en DILI
<p>Se debe cumplir uno de estos criterios:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. $ALT \geq 5 \times LSN$ 2. $FA \geq 2 \times LSN$ 3. $ALT \geq 3 \times LSN$ + $BT > 2 \times LSN$ 	<p>Se estima el ratio R:</p> $R = \frac{(ALT/LSN)}{(FA/LSN)}$ <p>$R \geq 5$: Patrón hepatocelular</p> <p>$2 < R < 5$: Patrón Mixto</p> <p>$R \leq 2$: Patrón colestásico</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Leve: $ALT \geq 5$ o $FA \geq 2$ y $BT < 2 LSN$ - Moderado: $ALT \geq 5$ o $FA \geq 2$ y $BT > 2 LSN$, puede venir acompañado de síntomas de hepatitis - Grave: $ALT \geq 5$ o $FA \geq 2$ y $BT > 2 LSN$. Puede venir acompañado también de síntomas de hepatitis y unos de los siguientes criterios: <ul style="list-style-type: none"> • Tener un valor de $INR \geq 1.5$ • Presentar ascitis con o sin encefalopatía, una duración de la enfermedad de menos de 26 semanas y ausencia de cirrosis. • Fallo en otro órgano debido al DILI - Fatal o trasplante: casos a los cuales se les ha sometido a trasplante o incluso han llegado a fallecer debido al DILI

ALT: Alanina transaminasa; BT: Bilirrubina total; FA: Fosfatasa alcalina; INR: tiempo de protombina normalizado; LSN: Limite superior de la normalidad.

Patrón de daño del DILI

Otra de las manifestaciones clínicas característica del DILI es que a nivel histológico puede presentar tres tipos de patrón de daño diferentes. Según la zona afectada del hígado el daño en el DILI puede ser de tipo hepatocelular, colestásico o mixto. Sin embargo, normalmente no se realiza una biopsia hepática si los pacientes únicamente tienen indicio de presentar DILI, por lo que la caracterización del tipo de daño también se realiza mediante el perfil bioquímico hepático. Para ello se utiliza el valor R o ratio R (Tabla 1). Si el valor de R es superior o igual a 5 se considera un patrón de daño hepatocelular, si es mayor que 2 y menor que 5 se considera mixto, y por último si es menor o igual a 2 se considera colestásico ²⁵. En ausencia del valor de ALT se puede sustituir por el de AST,

pero no se puede realizar la sustitución de FA por la aspartato la gamma-glutamil transferasa (GGT) ²⁶.

Flujo diagnóstico

Actualmente, no existe una prueba específica para el diagnóstico ni para el pronóstico de DILI, lo cual representa un desafío para su identificación en la clínica ²⁷. Sin embargo, la detección rápida del fármaco culpable es crucial para prevenir el empeoramiento del paciente. Lo más importante ante un caso de hepatitis aguda es que exista un alto grado de sospecha de DILI y que exista una exposición a algún medicamento o HDS. Además, debe existir una relación temporal compatible entre la toma del fármaco y la presencia del daño. Existe una gran variabilidad entre el momento de la toma y la aparición del daño en el DILI, aunque el daño hepático suele aparecer en los primeros tres meses después de iniciar el tratamiento ²⁸. Una herramienta útil que ayuda en el diagnóstico de DILI es la base de datos “LiverTox” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>), desarrollada por el National *Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease*, que contiene información sobre el potencial hepatotóxico de fármacos y productos HDS. Además, LiverTox contiene información sobre las características de casos DILI producidos por numerosos causantes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que tiene ciertas limitaciones, como que la información está recogida a partir de publicaciones, lo que limita información sobre fármacos relativamente nuevos. Una vez se tiene constancia de que el paciente ha tomado un fármaco y/o HDS el cual podría estar asociado con el DILI se excluirán otras causas de daño hepático. Los síntomas de DILI pueden mimetizar a los encontrados en cualquier otra patología hepáticas como hepatitis viral (VH del inglés *viral hepatitis*), hepatitis autoinmune (AIH del inglés *autoimmune hepatitis*), infecciones bacterianas y obstrucciones biliares entre otras. El diagnóstico de DILI es un diagnóstico de exclusión de estas patologías debido a la falta de biomarcadores específicos. En este punto, el patrón de daño permite orientar la batería de pruebas que se le realizarán al paciente para descartar otras patologías. Por ejemplo, en casos con un patrón colestásico necesitan ser descartadas patologías biliares como obstrucción de la vía biliar, infiltración tumoral o colestasis intrahepáticas como colangitis biliar primaria entre otras. Sin embargo, cuando si existe un daño hepatocelular se tienen que descartar diversas hepatopatías virales y la AIH ^{29,30}. Otra de las actividades importantes a realizar en el diagnóstico del DILI es el seguimiento de los niveles séricos del perfil hepático en los

pacientes. Principalmente porque una remisión del daño cuando se le retira la medicación apoyaría el diagnóstico. No obstante, hay que tener en cuenta que algunos casos de DILI pueden derivar hacia ALF o hacia una cronificación. Existen otras herramientas como son las escalas de causalidad que sirven para ayudar a reforzar el diagnóstico.

Causalidad del fármaco

La evaluación de la causalidad es una herramienta esencial en la medicina para determinar la probabilidad de que una reacción adversa sea causada por un fármaco. La escala *Roussel Uclaf Causality Assessment Method* (RUCAM), desarrollada por el *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS), es ampliamente utilizada para esta evaluación. Esta escala consiste en un sistema de puntuación en diferentes categorías: comienzo de los síntomas, factores de riesgo, evolución, fármacos concomitantes, exclusión de causas no farmacológicas, información de hepatotoxicidad previa y reexposición. Tras puntuar cada una de ellas se obtiene una puntuación global que indica la probabilidad de la causalidad en altamente probable, probable, posible, improbable o excluido. Es una herramienta útil para destacar las áreas importantes en el diagnóstico de DILI, pero también presenta limitaciones como la falta de objetividad debido a la falta de instrucciones claras y consecuentemente la subjetividad del evaluador, lo que puede llevar a afectar los resultados.

Recientemente, se ha publicado una revisión de la escala RUCAM y se ha creado una versión electrónica denominada *RECAM (Revised electronic causality assessment method)*³¹. Esta nueva versión ha demostrado tener el mismo potencial diagnóstico que la escala RUCAM además de presentar ciertas ventajas. Principalmente, es una escala más objetiva y clara que RUCAM, intentando así evitar la subjetividad del evaluador. En consecuencia, esto permite que se puedan hacer relaciones de causalidad de una forma más estandarizada por los diferentes expertos. No obstante, la utilización de la escala RECAM requiere más información para cumplimentarla, y por lo tanto se necesita más tiempo para su elaboración. En definitiva, ambas son herramientas muy útiles para reforzar el diagnóstico del médico ante un caso de DILI, aunque ninguna puede sustituir el juicio clínico del médico. Sin embargo, pueden ser utilizadas como apoyo mientras se buscan biomarcadores específicos para el DILI.

Gravedad y cronicidad

La gran mayoría de los casos de DILI se resuelven al retirar el fármaco sospechoso, sin embargo, algunos pacientes pueden experimentar una progresión hacia el ALF. Es importante tener en cuenta que es necesario un seguimiento y tratamiento adecuado para minimizar el riesgo de complicaciones y promover la recuperación del paciente. Según Aithal *et al*, la gravedad en los DILI puede clasificarse en cuatro niveles o grados que son leve, moderado, grave y un último nivel al cual pertenecen aquellos pacientes que necesitan un trasplante o pueden llegar a fallecer (Tabla 1). Por el contrario, una parte de los casos de DILI pueden mantener el daño en el tiempo y desarrollar cronicidad. Los criterios para considerar un caso de DILI como crónico varían entre los diferentes estudios. Sin embargo, en un estudio reciente se considera crónicos a los pacientes que no resuelven el daño hepático durante el primer año, según los resultados de Medina-Cáliz *et al*. En este estudio se analizaron 298 casos de DILI y observaron que la mayoría de los casos (273) resolvieron dentro del primer año desde la detección. Únicamente un 8% de los casos mantuvieron las elevaciones del perfil hepático después del año. Factores como la edad avanzada, la dislipemia y la gravedad en el DILI se asocian con un incremento del riesgo de desarrollar DILI crónico ³².



Mecanismo de DILI

El mecanismo subyacente del DILI idiosincrásico no se comprende completamente, aunque se considera generalmente que es un proceso multifactorial (Figura 1) que involucra el estrés celular y la respuesta inmune. Además, actualmente no existen modelos experimentales específicos que permitan replicar el DILI idiosincrásico en el laboratorio, lo que dificulta la búsqueda de una comprensión detallada de los mecanismos de esta condición. Únicamente existen diversos modelos que utilizan animales modificados genéticamente, que solo son aplicables a ciertos medicamentos. Por ello, se ha utilizado el modelo de acetaminofeno (APAP) como base para el estudio de los mecanismos del daño idiosincrásico. En ambos tipos de daño, el intrínseco y el idiosincrásico, la teoría más aceptada es que el daño comienza con el metabolismo de los fármacos.

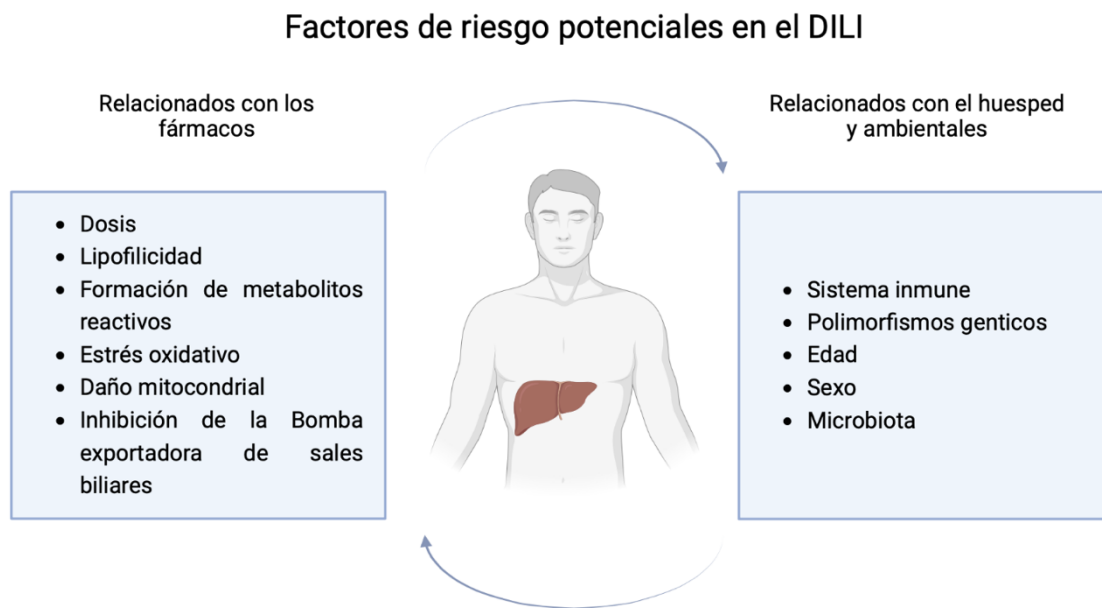


Figura 1. Factores de riesgo potenciales en el daño hepático inducido por fármacos (DILI). Se indican ejemplos de factores de riesgo relacionados con el fármaco y los relacionados con el huésped y ambientales.

El papel del metabolismo de los fármacos en el DILI

Fases del metabolismo de los fármacos

Los fármacos junto a compuestos tóxicos, como pueden ser venenos, son reconocidos como xenobióticos por el organismo, y son sometidos a un proceso de biotransformación. Este proceso se basa en la metabolización por sistemas enzimáticos especializados en

aumentar la hidrosolubilidad del xenobiótico y así facilitar su eliminación. El proceso de biotransformación se divide en tres fases que son la modificación, conjugación y excreción de los xenobióticos ³³. En la fase I, participan varias enzimas que, mediante diferentes reacciones como la oxidación, reducción o hidrólisis, entre otras, modifican la estructura del sustrato de la reacción. Se generan metabolitos más reactivos e hidrosolubles que contienen grupos polares como -OH, -NH₂ y -COOH. La superfamilia del citocromo P-450 es la principal representante de las enzimas de esta fase. Tienen la capacidad de actuar sobre numerosos sustratos tanto endógenos como exógenos, metabolizándolos en su mayoría mediante reacciones de oxidación. Estas enzimas se distribuyen por diferentes órganos y tejidos, pero en el hígado, en concreto en los hepatocitos, es donde se encuentran en mayor concentración y diversidad. En la fase II, se produce la unión de los grupos polares a moléculas endógenas generando conjugados que son más hidrosolubles. Por ejemplo, la glutatión S-transferasa (GST) es una enzima que conjuga glutatión en su forma reducida con el grupo polar del metabolito. La glucuronidación es otro ejemplo de reacción que se producen en la fase II y consiste en la conjugación de ácidos glucurónicos con los grupos polares ³⁴. En la fase III, se produce la eliminación de estos compuestos mediante la vía renal o biliar.

Formación de metabolitos reactivos

Durante la biotransformación, normalmente acompañado del aumento de la solubilidad del fármaco se produce la disminución de su potencial tóxico mediante la conjugación en la fase II (detoxificación). Sin embargo, en ciertas ocasiones como consecuencia de las reacciones de la fase I se originan especies químicamente reactivas que no serán adecuadamente detoxificadas y como consecuencia pueden generar un daño estructural en la célula (bioactivación) ³⁵. Se pueden generar especies de diferente naturaleza como especies electrófilas, radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*) ³⁶. Las especies electrófilas tienen la capacidad de unirse covalentemente a sitios nucleofílicos, formando aductos irreversibles con diferentes estructuras. Esta unión produce un cambio estructural que puede alterar las funciones metabólicas de la célula conduciendo a un daño y en última estancia a la muerte celular. Respecto a los radicales libres, pueden generar tanto uniones covalentes, al igual que los reactivos electrófilos, como modificaciones no covalentes mediante oxidación de estructuras como el ADN, grupos amino de diferentes enzimas o lípidos entre otros. Cabe

destacar que los metabolitos reactivos también pueden generar ROS a partir de la reducción de oxígeno molecular ³⁷.

Efecto dañino de los fármacos en la célula

Producción de estrés oxidativo

El estrés oxidativo aparece cuando se produce un desbalance entre ROS y los mecanismos antioxidantes celulares hacia el lado de ROS ³⁸. Niveles bajos de ROS son cruciales para diversas funciones celulares como la señalización celular, la transcripción génica y la respuesta inmune ³⁹. Sin embargo, un incremento de ROS puede promover el daño irreversible a lípidos, ácidos nucleicos y a proteínas celulares alterando la función celular. En el hígado, el daño oxidativo puede tener como origen de ROS el metabolismo citosólico por el citocromo P450 de los fármacos, como ya se ha mencionado o el estrés mitocondrial. Además, diferentes células del sistema inmune como neutrófilos o monocitos pueden generar ROS como parte de su respuesta inflamatoria ante un daño. Algunos fármacos como el ácido valproico aumentan la producción de ROS en el hepatocito ya que alteran la cadena respiratoria mitocondrial y estimulan la vía *Jun N-terminal kinase* (JNK) que lleva a un aumento de la permeabilidad mitocondrial y en última instancia puede llevar a la muerte del hepatocito ⁴⁰.

A nivel celular, existen respuestas adaptativas que se activan para intentar detener el estrés causado por los fármacos, como es la sobrerregulación del factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2 del inglés *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). El Nrf2 se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE del inglés *antioxidant response element*) en el promotor del gen objetivo para inducir la expresión de genes de defensa. En ausencia de estrés celular, Nrf2 está unido a su represor, la proteína 1 asociada a ECH Tipo Kelch (Keap1 del inglés *kelch-like ECH-associated protein 1*) y permanece en el citosol antes de ser degradado por la vía ubiquitina-proteosoma. Sin embargo, durante un estrés celular, los sensores redox de Keap1 se unen a los metabolitos reactivos, liberando así a Nrf2 y translocándolo al núcleo para unirse al ARE ⁴¹.

Daño mitocondrial por los fármacos

Las mitocondrias se ha planteado que podrían tener un papel importante en el desarrollo del DILI. Esto es debido a que los fármacos pueden ejercer un efecto tóxico sobre las mismas mediante diferentes mecanismos. Uno de ellos es alterando la función de la

cadena de transporte de electrones, comprometiendo la producción de ATP y en consecuencia deteriorando las funciones vitales de la célula y pudiendo conducir a la muerte celular⁴². La isoniazida es un ejemplo de fármaco que puede dañar la mitocondria de esta forma en pacientes susceptibles⁴³.

Otros fármacos pueden alterar la membrana mitocondrial interna y romper el gradiente de protones (H^+) necesario para la producción de ATP³⁶. Los fármacos también pueden abrir los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP del inglés *mitochondrial permeability transition pore*) localizados en la membrana interna de las mitocondrias. La permeabilización de la membrana mitocondrial por apertura de estos poros puede conducir a un incremento del volumen de la matriz intestinal y a la ruptura de la membrana externa de la mitocondria. Esto afecta directamente a la producción del ATP por parte de las mitocondrias y además puede producir la liberación de factores que inducen procesos de muerte celular^{44,45}. Los fármacos también pueden afectar al ADN mitocondrial (ADNmt), que codifica principalmente para los componentes de la cadena respiratoria y componentes de la maquinaria para la traducción de proteínas mitocondriales, interfiriendo en los procesos de replicación o traducción⁴⁶. Por último, algunos fármacos también pueden afectar a la beta-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos actuando sobre las enzimas o cofactores que participan en esta ruta. El ácido valproico también puede afectar a la mitocondria por esta vía⁴⁷. En la beta-oxidación se producen reactivos necesarios para la cadena de transporte de electrones en la producción de ATP.

Todos estos efectos potenciales que tienen los fármacos o sus metabolitos intermediarios sobre la mitocondria suponen una alteración de la actividad vital de la célula y pueden producir una activación de las vías de muerte celular⁴⁸. No obstante, las células tienen diferentes sistemas capaces de frenar y revertir el daño generado en las mitocondrias por los fármacos⁴⁹. Uno de ellos es la biogénesis mitocondrial, que es la formación de nuevas mitocondrias. Tras un estrés celular se produce un incremento de intermediarios como son la proteína quinasa activada por AMP (AMPK del inglés *AMP-activated protein kinase*) y el factor de unión al elemento sensible al cAMP (CREB del inglés *cAMP responsive element binding*). Tanto CREB como AMPK producen un aumento del coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) que actúa incrementando la expresión de genes mitocondriales⁵⁰. Otro de los mecanismos que tienen las mitocondrias para revertir los efectos del daño por los medicamentos es la

mitofagia⁵¹. Es una forma de autofagia en la cual se reciclan mitocondrias dañadas. Los mecanismos de fusión y fisión también son fundamentales para combatir el daño estructural de las mitocondrias⁴⁹. En la fusión se unen mitocondrias con el objetivo de amortiguar el estrés local causado por ROS disipándolo con otras mitocondrias. Por otro lado, la fisión es un proceso en el cual a partir de una mitocondria se generan nuevas mitocondrias. Gracias a este mecanismo se eliminan estructuras dañadas, como pueden ser ADNmt y proteínas, de las mitocondrias y las partes viables se fusionan con otras mitocondrias sanas.

Alteración de la homeostasis de ácidos biliares y daño del retículo endoplasmático

El efecto que los fármacos pueden ejercer alterando la homeostasis de los ácidos biliares también se ha planteado como un factor de riesgo en el DILI, ya que las sales biliares si se acumulan pueden tener efectos tóxicos en el hepatocito. Algunos fármacos inhiben la actividad de la bomba exportadora de sales biliares (BSEP del inglés *bile salt export pump*)⁵², que constituyen la principal vía de secreción de sales biliares en los hepatocitos. Por lo que una alteración en su función como transportador por la acción de los fármacos puede producir la acumulación de las sales biliares en el interior celular⁵³.

Otra estructura que puede verse alterada por los fármacos y sus metabolitos reactivos es el retículo endoplasmático (RE)^{54,55}. Este orgánulo se encarga de procesos vitales para la célula como ser el lugar donde se realiza la síntesis proteína, el metabolismo lipídico y el transporte intracelular entre otros⁵⁶. El RE es extremadamente sensible a los cambios que afectan su estructura, integridad y función. Diferentes factores como alteraciones en la homeostasis de calcio, la infección con virus o xenobióticos, entre otros, pueden interrumpir la síntesis, traducción y plegamiento de las proteínas correctamente. Esto conduce a una acumulación de proteínas desplegadas y mal plegadas en el RE y, en consecuencia, a un estrés en este orgánulo. Para contrarrestar este estrés se activan las vías de respuesta a proteínas desplegadas (UPR del inglés *unfolded protein response*).

Es posible que los fármacos puedan contribuir al aumento del estrés del RE y aumentar la susceptibilidad a DILI, aunque actualmente se desconoce como lo hacen. Sin embargo, se cree que puede ser de forma indirecta a través del incremento del nivel de ROS⁵⁴

Según las diferentes hipótesis del mecanismo de DILI idiosincrático, hasta este punto el mecanismo podría ser en gran medida similar al daño hepático intrínseco por APAP. Es decir, la mayoría de los fármacos o HDS, producirían un cierto grado de estrés celular. Sin embargo, generalmente los fármacos no producen DILI por la acción de diferentes

mecanismos de adaptación celular ⁵⁷. Se plantea que la susceptibilidad a la hepatotoxicidad idiosincrásica podría estar condicionada tanto por fallos en estos mecanismos de adaptación, como por la participación de otros factores, como es el sistema inmune.

Sistema inmune en DILI

Diferentes observaciones han destacado la participación del sistema inmune en la patogénesis del DILI idiosincrásico. A diferencia del daño intrínseco, en la mayoría de los casos de tipo idiosincrásico se observa un tiempo de latencia variable y relativamente largo, que puede llegar a ser de varios meses ¹. Esto se podría explicar por la participación del sistema inmune adaptativo, que produciría una respuesta inmune al daño que no sería inmediata. Además, en los casos en los cuales se llega a producir un nuevo daño por re-exposición al fármaco el tiempo de latencia es frecuentemente menor. La creación de células inmunes de memoria tras el primer episodio podría explicar que la respuesta sea más rápida ⁵⁸. Otra de las observaciones que apoyan el papel del sistema inmune en DILI es la caracterización en cultivo de linfocitos T, previamente extraídos de sangre de pacientes DILI, que muestran reactividad frente al fármaco causante del daño. Sin embargo, esta reactividad no se observó en los linfocitos cultivados a partir de pacientes que no desarrollaban DILI ^{59,60}. Además, a nivel histológico se han observado infiltraciones de linfocitos citotóxicos CD8+ en biopsias de pacientes DILI ⁶¹. Del mismo modo, mediante la realización de estudios genéticos, se han observado asociaciones entre la presencia de ciertos alelos de los antígenos leucocitarios humanos (HLA del inglés *human leukocyte antigen*) con un mayor riesgo de desarrollo de DILI al tomar ciertos fármacos. En un estudio realizado por Lucena *et al* se observó que la presencia de alelos HLA de clase II (*HLA-DRB1*15:01* y *DQB1*06:02*) y clase I (*HLA-A*0201*) pueden aumentar la susceptibilidad de desarrollar DILI por amoxicilina-clavulánico. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el valor de odds ratio asociado a estos alelos es relativamente bajo (alrededor de 3), lo que indica que su utilidad como biomarcadores en el DILI sigue siendo limitada debido al tamaño pequeño del efecto que presentan ⁶². En definitiva, todos estos antecedentes ponen en evidencia el posible papel del sistema inmune tanto innato como adaptativo en el desarrollo de DILI. A continuación, se mostrará de forma más detallada el mecanismo hipotético del sistema inmune en DILI.

Sistema inmune innato

Cuando los hepatocitos se dañan por la acción del fármaco, o de sus metabolitos reactivos, pueden liberar patrones moleculares asociados a daño o alarminas (DAMP del inglés *damage-associated molecular pattern*). Estas señales son reconocidas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR del inglés *pattern recognition receptor*), que se encuentran en diversas células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos T. Cuando las células del sistema inmune innato residentes en el hígado detectan DAMPs, se activan y generan una respuesta inmune. Dentro de las células inmunitarias innatas residentes del hígado están presentes algunos tipos celulares como las células de Kupffer (KC del inglés *Kupffer cells*) que son un tipo de macrófagos, las células asesinas naturales (NK del inglés *natural killer*) que son un tipo de linfocito, las células dendríticas (DC del inglés *dendritic cells*), que son células fagocíticas y las células T gamma-delta (células T $\gamma\delta$), que están en el límite de la inmunidad innata y adaptativa, y tienen la capacidad de detectar y eliminar células dañadas o infectadas por patógenos^{63,64}. Este proceso en el contexto del DILI se conoce como inflamación estéril, ya que se produce una activación del sistema inmune innato en ausencia de patógenos (Figura 2).

La activación de estos tipos celulares por la presencia de los DAMPs desencadena una cascada de señalización caracterizada principalmente por la liberación de diferentes tipos de citocinas, que son proteínas pequeñas que desempeñan un papel fundamental en la comunicación celular y en el proceso inflamatorio. Estas citocinas pueden tener actividad proinflamatoria o antiinflamatoria, o ambas, y pueden actuar sobre diferentes tipos celulares generando diferentes efectos. Cuando las citocinas participan en la quimiotaxis celular se denominan quimiocinas, y se encargan de activar, atraer y dirigir otras células hacia una determinada localización. Ante un daño del hepatocito las células innatas del hígado producen la liberación de diferentes citocinas y quimiocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α del inglés *tumor necrosis factor alpha*), interleucina 1 β (IL-1 β), e interferón gamma (IFN- γ), entre otras. Por ejemplo, las KC pueden secretar TNF- α , IL-1 β junto a IL-6 para promover la señal inflamatoria⁶⁵. Algunas de estas señales producen tanto el reclutamiento de neutrófilos y monocitos de la sangre, como la muerte de los hepatocitos⁶⁶. Las células que llegan al hígado desde la periferia, junto con las residentes, desarrollan una respuesta inmune, generando una inflamación y amplificando el daño celular.

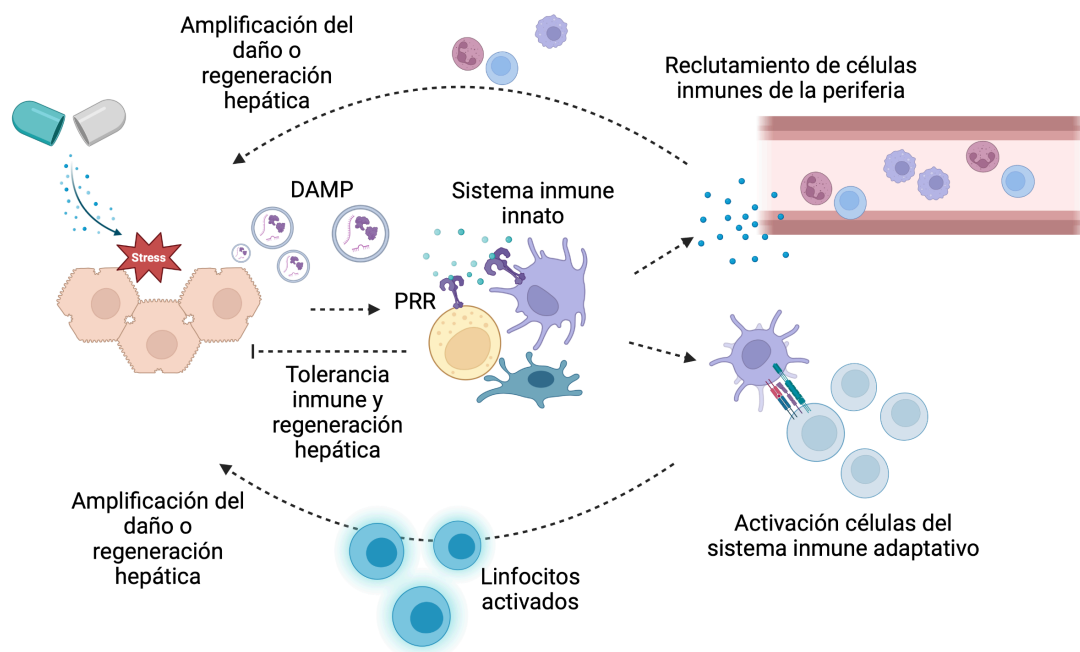


Figura 2. Mecanismo de la inflamación estéril en el daño hepático inducido por fármacos (DILI). Cuando se produce el daño del hepatocito se produce la liberación de DAMPs que activan a las células del sistema inmune innato. Estas pueden atraer mediante la liberación de citocinas a células inmunes de la periferia que amplifican el daño y muerte celular, o participan en la regeneración hepática. Las células inmunes innatas también pueden activar a las células del sistema inmune adaptativo, las cuales también pueden producir un daño de los hepatocitos o participar en la regeneración tisular. Las células del sistema inmune innato residentes del hígado pueden liberar citocinas antiinflamatorias que promueven la tolerancia inmune en el hígado, produciendo la regeneración del tejido dañado. DAMP: patrones moleculares asociados a daño; PRR: receptores de reconocimiento de patrones.

Sin embargo, no siempre se va a producir una amplificación del daño, ya que las células del sistema inmune innato también juegan un papel importante en la remodelación y reparación del tejido dañado. La liberación de citocinas con actividad supresora de la respuesta inmune como pueden ser IL-10, IL-22 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β del inglés *transforming growth factor beta*) participan en este proceso ⁶⁶. Además, las células del sistema innato también mantienen una comunicación con las células del sistema inmune adaptativo, y cuya respuesta acondicionará el desarrollo y la progresión del daño.

Sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo a diferencia del sistema inmune innato se caracteriza por desarrollar una respuesta específica hacia un agente agresor. Además, tiene capacidad de memoria inmunitaria, es decir ante un segundo encuentro con ese patógeno el sistema adaptativo puede desencadenar una respuesta inmune más efectiva. Su actividad se puede llevar a cabo mediante una respuesta humoral o celular. Las respuestas inmunes humorales están mediadas por anticuerpos producidos por los linfocitos B, mientras que las respuestas celulares están mediadas por los linfocitos T. A su vez, dentro de los linfocitos T podemos encontrar a los linfocitos colaboradores (CD4+ o cúmulo de diferenciación 4, también llamados Th del inglés *T helper*), los linfocitos citotóxicos (CD8+), las células T asesinas naturales (NKT del inglés *natural killer T cell*), que son un tipo de célula T con características de NK, y los linfocitos T reguladores (Treg) que tienen actividad supresora de la respuesta inmune. A su vez los linfocitos colaboradores se dividen en diferentes subfamilias, entre los que podemos encontrar los linfocitos Th1 que participan en la eliminación de patógenos intracelulares, como virus (por ejemplo, el virus varicela-zóster) y bacterias (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*) como la causante de la tuberculosis, y los Th2 que se encargan de eliminar patógenos extracelulares, como pueden ser el parásito causante de la malaria, *Plasmodium falciparum*.

En el contexto de DILI, las células del sistema inmune adaptativo podrían activarse por varios mecanismos según diferentes hipótesis planteadas (Figura 3) ⁶⁷. En la primera hipótesis se plantea que los fármacos pueden actuar como haptenos (“hipótesis del hapteno”), que son sustancias químicas que por sí misma no producen una respuesta inmune adaptativa a no ser que se unan a péptidos endógenos. Esta unión entre fármacos y péptidos pueden formar neoantígenos que serán presentados mediante HLA a los receptores de los linfocitos T (TCR del inglés *T cell receptor*). Otra hipótesis es la de la interacción farmacológica o “*pi-concept*” (del inglés *pharmacological interaction*) en la cual se produce una unión no covalente del metabolito reactivo o del fármaco con los HLA o directamente o con los TCR de los linfocitos T, produciendo su activación ⁶⁸. En una tercera hipótesis, conocida “*altered peptide repertoire model*”, el fármaco podría unirse a la ranura de unión a péptidos del complejo HLA, modificando la configuración de esta ranura y produciendo una alteración en los péptidos que pueden ser presentados a los TCR ⁶⁹.

Los neoantígenos y los DAMPs se liberan desde los hepatocitos dañados, probablemente en exosomas, y son captados por las células del sistema inmune innato que actúan como presentadoras de antígenos (APC del *inglés antigen presenting cells*)⁷⁰. Estas células son principalmente las DC que, al captar ambos componentes, se activan y presentan los neoantígenos en los complejos HLA-II, activando a los linfocitos CD4+. A su vez, los hepatocitos van a realizar la presentación de los neoantígenos a través de los complejos HLA-I a los linfocitos CD8+.

La activación de los linfocitos CD8+ y las CD4+ pueden producir diferentes reacciones en el hígado. Por ejemplo, los CD4+ pueden estimular la respuesta inmune mediante la producción de diferentes citocinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-17 e IL-6. Por otro lado, los linfocitos CD8+ pueden liberar mediante exocitosis moléculas como perforinas, granzimas y TNF- α conduciendo a la muerte celular. Además, tanto los linfocitos CD4+ como CD8+ tienen la capacidad de inducir la muerte celular mediante la expresión de moléculas de superficie como Fas-L o el ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL del *inglés TNF-related apoptosis-inducing ligand*), ambas citocinas pertenecientes a la familia del TNF⁷¹. Sin embargo, al igual que ocurría con las células del sistema inmune innato, el sistema inmune adaptativo en el momento del daño celular podría tener una función de recuperación y remodelación del tejido⁶⁵.

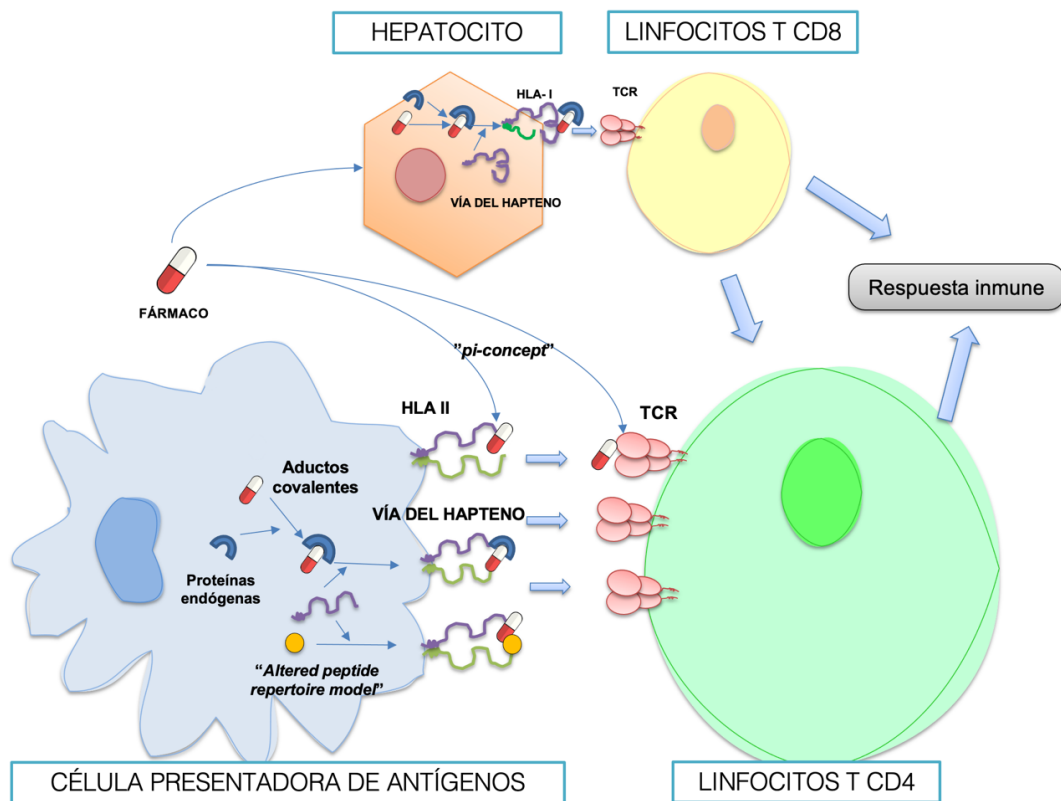


Figura 3. Vías de activación del sistema inmune adaptativo en el DILI. Según la teoría del hapteno, los fármacos o sus metabolitos pueden unirse covalentemente con proteínas endógenas formando aductos que van a generar neoantígenos, los cuales serán presentados mediante HLA (HLA-II en los APC y HLA-I en los hepatocitos). En la hipótesis “*pi-concept*”, los fármacos, y sus metabolitos reactivos, pueden activar directamente tanto a los HLA como a los receptores TCR de los linfocitos. Los fármacos en la teoría del “*altered peptide repertoire model*” pueden modificar la estructura de los HLA alterando los péptidos endógenos que estos pueden presentar a los TCR.

Tolerancia inmune

El hecho de que la mayoría de las personas que toman fármacos no lleguen a desarrollar DILI podría explicarse por diferencias en los mecanismos de adaptación celular. Los sistemas de detoxificación de xenobióticos, los diferentes sistemas de adaptación mitocondrial y la capacidad regenerativa del hígado entre otros, se agrupan dentro de estos mecanismos⁵⁷. La tolerancia inmune es un mecanismo adaptativo que puede influir en la susceptibilidad a desarrollar DILI. Se refiere a la ausencia de respuesta inmune ante un antígeno inducida por un contacto previo con ese antígeno. Los antígenos que inducen tolerancia se llaman tolerógenos, mientras que los que inducen respuesta inmune son inmunógenos. La tolerancia se establece naturalmente durante las primeras etapas del desarrollo y permite al sistema inmune distinguir entre antígenos propios y extraños. Es

esencial para el control de la autoinmunidad, que se refiere a la activación de una respuesta inmunitaria contra antígenos propios, lo que puede provocar una variedad de patologías.

Los puntos de control inmunológico o del inglés *immune-checkpoints* son pieza clave en el proceso de tolerancia inmune. Son un conjunto de moléculas (receptores y ligandos) que están presentes tanto en los linfocitos como en las células APC. Los receptores y ligandos se pueden dividir en coestimuladores o inhibidores, según su función, ya que modulan la respuesta inmune cuando se produce la unión entre el complejo HLA unido al antígeno y los TCR. Por ejemplo, CD28 y el coestimulador de linfocitos T (ICOS del inglés *inducible T-cell coestimulator*) son moléculas expresadas en la superficie celular de los linfocitos T, que tienen actividad coestimuladora. El CD28 se une a ligandos como CD80 y CD86 expresados en las células dendríticas, mientras que ICOS se une al ligando de ICOS (ICOS-L) expresado también en las células dendríticas y en los linfocitos B. Por otro lado, receptores como el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4 del inglés *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) o la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1 del inglés *programmed cell death protein 1*) actúan reduciendo la respuesta inmune y por lo tanto son fundamentales en el fenómeno de tolerancia. El CTLA-4 se expresa en la superficie de los linfocitos T, cuando éstos se activan, y de forma constitutiva en los Treg. Al igual que CD28, el CTLA-4 también se une a CD80 y CD86, pero con más afinidad, por lo que compete con CD28 y frena la activación generada. El receptor PD-1 se une a ligandos como PD-L1 de las APC inhibiendo la activación de la respuesta inmune ⁷².

El hígado es un órgano que tiende a mantener una tolerancia inmune debido a que constantemente recibe antígenos y patógenos de la dieta y del medio ambiente. Los mecanismos de tolerancia inmune en el hígado evitan una respuesta inmune e inflamación constantes ante la llegada normal de estos antígenos ⁷³. Las células residentes del hígado, tanto hepatocitos como células inmunes, presentan niveles bajos de complejos HLA y de immune-checkpoints en su superficie tanto ^{66,74}. Esto dificulta que se produzca la activación de la respuesta inmune y permite mantener la tolerancia. Además, los Treg del sistema inmune adaptativo tienen la capacidad de inhibir la actividad de los linfocitos T CD4⁺ promoviendo así la tolerancia inmune en el hígado. Otras poblaciones celulares como las KC o las células estrelladas hepáticas (HSC del inglés *hepatic stellate cells*) pueden favorecer la expansión de los Treg e inhiben la actividad de los linfocitos T ⁵⁷. El papel de los immune-checkpoint, y el fenómeno de tolerancia inmune en general, se ha planteado como de gran importancia en el desarrollo de DILI. En modelos animales, se

observó que ratones knockout para PD-1 desarrollaron más daño al ser tratados con amodiaquina si a su vez se les inhibía CTLA-4⁷⁵, lo que sugiere que estos ratones tenían interrumpido el mecanismo de tolerancia inmune. Además, en humanos el efecto hepatotóxico observado en pacientes oncológicos tratados con inhibidores de los immune-checkpoints (ICI del inglés *immune-checkpoints inhibitors*) también resalta el posible papel de la tolerancia inmune en el DILI idiosincrásico^{76,77}.

En resumen, se puede observar cómo existe un complejo mecanismo interrelacionado entre sistema inmune innato y adaptativo, junto a los factores propios del huésped, del entorno y del propio fármaco, generando interconexiones que regulan la susceptibilidad al DILI. La microbiota, como se mostrará a continuación, es otro factor de riesgo que podría desempeñar un papel importante en el desarrollo del DILI.

La microbiota intestinal en el ser humano

La idea de que la microbiota intestinal podría ser una pieza fundamental en el mecanismo del DILI, se basa en la relación que existe entre ésta con el metabolismo de los fármacos y con el sistema inmune. Se define como microbiota al conjunto de microorganismos presentes en el organismo y con los cuales se genera una relación simbiótica huésped-hospedador. En su composición encontramos bacterias, hongos, virus y protistas, pero son las primeras las que representan casi la totalidad de la misma. Se ha estimado que el número de bacterias en la microbiota de cada individuo es del mismo orden de magnitud que el número de células humanas, y tiene una masa total de aproximadamente 0,2 kg⁷⁸. La mayor cantidad de microbiota se localiza a lo largo del tubo digestivo, variando su composición en los diferentes segmentos u órganos⁷⁹. En el intestino, las bacterias están representadas casi en su totalidad por los filos Bacteroidetes y Firmicutes, seguidos de otros filos con una menor representación como Proteobacterias, Actinobacterias, Fusobacterias y Verrucomicrobia⁸⁰. Sin embargo, la composición no es estable y está condicionada por factores como la ubicación geográfica, el entorno familiar, el tipo de lactancia, la genética y la dieta entre otros⁸¹. De todos los factores probablemente la dieta sea el que más afecta a la diversidad de la microbiota intestinal. De hecho, en la microbiota de los individuos que siguen dietas ricas en grasas y proteínas animales, típico de los países occidentales, predominan taxones típicos de *Bacteroides*. Por el contrario, una dieta rica en carbohidratos y fibras tiende a favorecer el crecimiento de *Prevotella*⁸². Es decir, la microbiota puede llegar a mostrar grandes diferencias interindividuales en

cuanto a su composición. No obstante, es fundamental que la microbiota mantenga un equilibrio saludable (eubiosis) para que realice correctamente las diversas funciones que cumple ⁷⁹. Un desequilibrio de la composición o de la función de la microbiota normal (disbiosis) se ha asociado al desarrollo de diferentes patologías ⁸³.

Funciones importantes de la microbiota en el ser humano

Metabolismo de nutrientes.

La microbiota es capaz de metabolizar componentes de la dieta que no pueden ser digeridos por el huésped, como por ejemplo la fibra alimentaria. A partir de ella, las bacterias producen ácidos grasos de cadena corta (SCFA del inglés *short-chain fatty acid*). Estos ácidos grasos desempeñan funciones importantes en el huésped como la modulación del sistema inmune, o pueden ser utilizados como fuente energética ⁸⁴. Por ejemplo, el butirato, uno de los principales SCFAs, es la mayor fuente de energía para los colonocitos ⁸⁵.

Algunas bacterias presentes en la microbiota intestinal también tiene la capacidad de producir algunos tipos de vitaminas, como la K o la B, que son aprovechadas por el huésped ^{86,87}.

La microbiota también puede realizar otras funciones como es participar en el metabolismo de los ácidos biliares ⁸⁸. De hecho, existe una relación bidireccional entre ácidos biliares y microbiota, ya que ambos se modifican entre sí. Por un lado, los ácidos biliares, se sintetizan en el hígado a partir del colesterol y luego pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal generándose ácidos biliares secundarios. Los ácidos biliares son necesarios en la absorción de grasas y vitaminas liposolubles, por lo que cambios en la composición de la microbiota podría suponer una alteración de estos procesos. Por otro lado, la composición de la microbiota puede alterarse por la acción de los ácidos biliares, y en consecuencia las funciones que ésta realiza pueden verse afectadas ⁸⁹.

Defensa frente a patógenos.

Otra de las funciones vitales en el organismo llevada a cabo por la microbiota es la defensa frente a patógenos. En el intestino esta función es muy importante, ya que es un órgano que está expuesto constantemente a agentes externos. Para ello, la microbiota comensal ejecuta diferentes mecanismos de actuación, siendo uno de ellos el mantenimiento de la capa de moco intestinal. En dicha capa se encuentran los péptidos antimicrobianos (AMP del inglés *antimicrobial peptides*) que son péptidos pequeños secretados por las células

intestinales, que se encargan de combatir la presencia de microorganismos patógenos. La presencia de bacterias como *Akkermansia*, que se encuentra en una microbiota saludable, es fundamental en el mantenimiento de la capa de moco intestinal ⁹⁰. Además, las bacterias comensales de la microbiota pueden generar compuestos antimicrobianos propios frente a patógenos, denominados bacteriocinas, y evitar la llegada y crecimiento de bacterias extrañas o patógenas por competencia de nicho ecológico ^{91 92}.

Relación microbiota- fármacos.

Existe una relación bidireccional entre los fármacos y la microbiota. La microbiota puede influir en el metabolismo de los fármacos mientras que éstos pueden alterar la composición de la microbiota. En un estudio reciente se analizó la capacidad de 76 cepas bacterianas del intestino humano para metabolizar 271 fármacos orales, y se observó que la mayoría de los fármacos eran alterados químicamente por al menos una cepa bacteriana ⁹³. La microbiota puede afectar al metabolismo de los fármacos actuando directamente sobre ellos. Por ejemplo, las bacterias pueden generar reacciones hidrolíticas sobre los conjugados formados en la fase II de detoxificación ⁹⁴. Algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tienen una fracción de ácido carboxílico que se conjugan con el ácido glucurónico en el hígado para formar acilglucurónidos y facilitar su excreción por la vía biliar. En contacto con ciertas bacterias intestinales, productoras de β -glucuronidasa, estos compuestos pueden ser hidrolizados (desconjugados) y las agliconas resultantes se someten posteriormente a la reabsorción por el huésped (reciclaje enterohepático) ⁹⁵. Existen diferentes glucuronidasas sintetizadas por la microbiota con diferentes propiedades catalíticas. De hecho, recientemente, Candelieri *et al* observaron una asociación entre la composición de la microbiota y los diferentes tipos de glucuronidasas expresadas ⁹⁶. El proceso de desconjugación podría aumentar la exposición del huésped al fármaco, así como la presencia de metabolitos activos en el intestino, lo cual podría tener consecuencias tóxicas.

La microbiota también puede afectar al metabolismo de los fármacos de forma indirecta al alterar la expresión de los genes del huésped implicados en su metabolismo. En un estudio donde se analizaron 303 de estos genes se observó que 116 de ellos se expresaron de forma significativamente diferente en ratones convencionales y ratones libres de gérmenes. Por ejemplo, los ratones libres de gérmenes mostraron un descenso de la expresión de *Cyp3a* tanto en hígado como en intestino. Por lo que es probable que la falta de microbiota intestinal afecte el metabolismo de los xenobióticos. Sin embargo, en este

estudio sólo evaluó el nivel de mRNA, pero no midió el proteínico ni las actividades enzimáticas/transportadoras, por lo que no se puede afirmar con certeza que existan cambios en el metabolismo de los xenobióticos ⁹⁷.

Por otro lado, los fármacos también pueden afectar a la composición de la microbiota normalmente produciendo cambios a corto plazo. Sin embargo, dependiendo del tipo de fármaco, los cambios pueden perdurar más produciendo una disbiosis y aumentar el riesgo de desarrollar diferentes patologías ⁹⁸. Los antibióticos son los fármacos que más afectan a la composición de la microbiota. La magnitud de su efecto depende del tipo de antibiótico, de la dosis y del tiempo del tratamiento, aunque la gran mayoría produce cambios y descensos bruscos en la diversidad ⁹⁹. Una disminución de la diversidad de la microbiota puede comprometer su funcionalidad y afectar la salud del huésped. Además, el descenso de la diversidad de la microbiota comensal puede hacer más susceptible al huésped a desarrollar una infección por patógenos oportunistas, como por ejemplo por *Clostridioides difficile* ¹⁰⁰. Los antibióticos no son los únicos fármacos que pueden producir una alteración en la composición de la microbiota. De hecho, un estudio llevado a cabo por Maier *et al* mostró como otros fármacos no antibióticos producían alteraciones en diferentes especies bacterianas presentes en la microbiota ¹⁰¹. Las especies *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium rectale* y *Bacteriodes vulgatus* estaban entre las más sensibles, mientras que las γ -proteobacterias mostraron mayor resistencia a estos fármacos. En concreto, los inhibidores de las bombas de protones (IBP) son uno de los fármacos no antibióticos que más se asocian con cambios en la microbiota. Esto es debido a que los IBP producen una disminución del nivel de ácido del estómago, el cual es necesario para controlar el sobrecrecimiento bacteriano y la infección por patógenos provenientes de la dieta. Un estudio con 211 individuos que tomaron IBP y 1604 que no tomaron, mostró aumentos en las familias Streptococcaceae y Micrococcoceae en los que tomaron el fármaco. Además, se observaron incrementos en la microbiota intestinal de especies como *Rothia dentocariosa* y *Rothia mucilaginosa* que pertenecen mayoritariamente a la microbiota oral. Esto podría explicarse por el aumento del nivel de pH en el estómago de estos pacientes, que permitió la colonización de nuevos espacios por estas especies ¹⁰².

Homeostasis del sistema inmune.

La microbiota juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis inmune del huésped, ayudando a mantener el equilibrio frente a los cambios que ocurren en el entorno, como la presencia de patógenos. Esta homeostasis es fundamental en el intestino

donde se recibe constantemente la llegada de antígenos exógenos. En la mucosa del intestino se encuentra el tejido linfoide asociado con el intestino (GALT del inglés *gut-associated lymphoid tissue*) que es un componente del sistema inmune. Está compuesto de células del sistema innatas y adaptativas, que se encargan de mantener el control de la entrada de patógenos por la barrera intestinal. Estas células deben ser capaz de distinguir entre patógenos, los patógenos oportunistas y los comensales que mantienen una relación de simbiosis con el huésped. En consecuencia, el sistema inmune inducirá reacciones de inmunidad frente a los patógenos y mantendrá un estado de tolerancia inmunitaria frente a la microbiota comensal ¹⁰³. Las bacterias del intestino producen SCFAs que podrían tener un papel importante en la modulación de las respuestas inmunes y en el mantenimiento de la homeostasis inmune en el intestino. Los SCFAs pueden actuar como señales para regular la respuesta inmune y promover la tolerancia a los comensales intestinales, lo que contribuye a evitar la inflamación y la enfermedad ¹⁰⁴.

La comunicación de la microbiota con el sistema inmune del huésped se realiza a través de PRR presentes en diferentes tipos celulares del sistema inmune innato. Dentro de los PRR figuran algunas familias como los receptores tipo Toll (TLR del inglés *Toll-like receptor*) o tipo NOD (NLR del inglés *NOD-like receptor*), entre otros, que detectan diferentes tipos de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés *pathogen-associated molecular patterns*). Dentro de los PAMPs se incluyen ácidos nucleicos, proteínas secretadas, polisacáridos capsulares y exopolisacáridos. El lipopolisacárido (LPS) es el PAMP más representativo de las bacterias gramnegativas, mientras que el ácido lipoteicoico se asocia a las grampositivas. La unión de los PAMPs a los PRRs activa ciertas vías de señalización implicadas en la defensa frente a patógenos o en el control de los comensales ¹⁰⁵. En concreto, el mecanismo del LPS consiste en la unión con la proteína de unión a LPS (LBP del inglés *lipopolysaccharide binding protein*) y su transferencia al factor de diferenciación mieloide 2 (MD2 del inglés *myeloid differentiation factor 2*) y al grupo de diferenciación 14 (CD14). El complejo formado por estas 3 estructuras se une al receptor TLR4, el cual se activa y se produce una cascada de señalización de la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ¹⁰⁶. La activación de esta vía produce la liberación de una serie de citocinas proinflamatorias como son el TNF- α , la IL-1 β , la IL-6, IL-12, IL-18 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF del inglés *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) ¹⁰⁷. Los patógenos tienen los mismos PAMPs

que la microbiota comensal por lo que el sistema inmune va a producir inflamación o tolerancia dependiendo del microambiente. En el intestino, donde se tiende a la tolerancia inmunitaria frente a la microbiota comensal, la activación de los TLRs por parte de estos microorganismos beneficiosos puede llevar a la liberación de citocinas antiinflamatorias como el TGF- β y el IL-10. Además, las células epiteliales del intestino presentan principalmente los TLRs en su lado basolateral, lo que podría ayudar a limitar la respuesta proinflamatoria frente a patógenos que consiguen atravesar la barrera intestinal. Esta disposición de los TLRs evita que se produzca de forma continua una respuesta inflamatoria frente a la microbiota comensal y a otros antígenos no peligrosos presentes en el lumen intestinal. Esto podría contribuir a mantener la homeostasis inmune en el intestino y evitar la inflamación innecesaria.

La microbiota es fundamental en la maduración del sistema inmune desde el nacimiento, cuando el recién nacido presenta un sistema inmune que es completo pero inmaduro. Los microorganismos de la microbiota comensal constituyen los primeros estímulos inmunogénicos a los que se expone el neonato ¹⁰⁸. Este proceso es fundamental y se necesita una microbiota sana para una correcta maduración del sistema inmune ¹⁰⁹.

La microbiota podría participar en la tolerancia hepática.

El hígado recibe sangre directamente desde el intestino por la vena porta hepática, exponiéndose constantemente a componentes microbianos que han podido atravesar la barrera intestinal. La microbiota comensal del intestino puede contribuir a mantener la homeostasis inmune en el hígado y a prevenir la inflamación innecesaria de este órgano. Se plantea que principalmente la regulación de los receptores TLR en el hígado es uno de los principales mecanismos mediante el cual la microbiota podría promover la tolerancia inmune en el hígado. Se ha demostrado un bajo nivel de expresión de TLR4 en las células hepáticas en condiciones sanas, con aumentos significativos durante ciertas condiciones inflamatorias del hígado como son la cirrosis biliar primaria y esteatohepatitis no alcohólica (NASH del inglés *non-alcoholic steatohepatitis*) ¹¹⁰. Las KC y las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSECs del inglés *liver sinusoidal endothelial cell*) que forman el revestimiento de los vasos sanguíneos del hígado, se encargan de limpiar la sangre de los productos microbianos derivados del intestino como el LPS sin generar una respuesta inmune. Se ha visto que las KC del hígado pueden generar tolerancia inmune secretando IL-10 y TGF- β en respuesta al LPS controlando pues la expresión de mediadores proinflamatorios en los sinusoides hepáticos ¹¹¹. Además, la exposición al

LPS en las LSECs produce una inhibición de la vía NF-kB y por lo tanto un descenso en la adhesión de los leucocitos a estas células ¹¹².

Hipótesis del papel de la microbiota en DILI

Importancia eje intestino-hígado, disbiosis y enfermedades del hígado

La microbiota intestinal, a través del eje intestino-hígado, podría tener un papel fundamental en el desarrollo de diferentes enfermedades hepáticas como en el DILI ¹¹³. Se plantea que en el DILI pueda estar produciéndose un proceso de disbiosis intestinal, debido al consumo de fármacos, lo cual podría conducir a una alteración de las funciones de la microbiota comensal y afectar al huésped. Además, los fármacos antibióticos, que son uno de los principales fármacos asociados al DILI, son los que más pueden modificar la microbiota. Aunque esto por sí solo es difícil que pueda generar una enfermedad hepática

Papel del LPS en el DILI

El estado de disbiosis puede producir un proceso inflamatorio intestinal, un aumento de la permeabilidad intestinal y un incremento de la translocación de productos de PAMPs. La mayor entrada a través de la barrera intestinal de componentes microbianos, como el LPS, se denomina endotoxemia y se caracteriza por la presencia de una inflamación sistémica en el huésped. Este fenómeno se ha planteado que podría estar relacionado con el desarrollo de DILI. La mayor llegada de LPS al hígado podría participar en la inflamación local promoviendo la liberación de citocinas proinflamatorias ¹⁰⁷.

Diferentes estudios soportan esta hipótesis en relación al DILI. Por ejemplo, en modelos animales se ha observado como el LPS incrementa el efecto hepatotóxico de algunos fármacos. En ratones tratados con dosis no hepatotóxicas de diclofenaco y de LPS mostraron un daño hepático únicamente si se les administraba ambos compuestos a la vez ¹¹⁴. Además, utilizando el LPS en dosis subletales junto a la D-galactosamina (D-GaIN), que es un compuesto que se ha asociado con el desarrollo de hepatotoxicidad, se ha conseguido reproducir en modelos experimentales de forma muy similar las características del FHF observado en la clínica ¹¹⁵. En otro estudio donde los fármacos anti-tiroideos como el metimazol y propiltiouracilo alteraban la microbiota intestinal tanto en pacientes en un ensayo clínico como en ratas, se observó que los niveles de LPS

aumentaban en heces y suero durante el tratamiento. Estos resultados apoyan la hipótesis de la endotoxemia y el posible papel del LPS en el DILI ¹¹⁶.

Aumento del efecto hepatotóxico de los fármacos

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que el efecto de la microbiota sobre los fármacos podría también ser un factor de riesgo en el desarrollo de DILI. En el daño intrínseco por APAP la susceptibilidad puede variar por los niveles de p-cresol endógeno presente en el intestino. Este compuesto es producido por bacterias como *Clostridioides difficile* y llega al hígado donde se transforma en sulfato de p-cresol por las sulfotransferasas del hepatocito. El p-cresol compite con el APAP por la o-sulfonación en voluntarios sanos. Por ello, las variaciones en la microbiota podría explicar las diferencias en la capacidad metabólica en el hígado del APAP por estos individuos ¹¹⁷. En el daño hepático por tacrina, un fármaco para el alzhéimer que se retiró del mercado con un alto potencial hepatotóxico, la actividad de la β -glucuronidasa bacteriana intestinal podría condicionar la susceptibilidad del daño. En un estudio con ratas se observó que los animales con mayor porcentaje de bacterias que producían esta enzima tenían un mayor tiempo de exposición a la tacrina y por lo tanto mayor daño hepático ¹¹⁸.

En resumen, se plantean diferentes mecanismos mediante los cuales la microbiota podría incrementar la susceptibilidad de desarrollar DILI (Figura 4). Por un lado, los fármacos podrían generar una disbiosis afectando a las funciones que desempeñan la microbiota y de las cuales se beneficia el huésped. Además, acompañado a la disbiosis puede producirse un incremento de la permeabilidad intestinal y una mayor llegada de componentes microbianos como el LPS al hígado. La microbiota también puede afectar a la farmacodinámica de los fármacos actuando directamente sobre ellos o estimulando ciertos genes del huésped. Todas estas vías pueden afectar la susceptibilidad de desarrollar el daño hepático. El conocimiento en profundidad del mecanismo detrás del DILI, como la participación del sistema inmune y/o la microbiota, proporciona la posibilidad de identificar nuevos biomarcadores que puedan ayudar en el diagnóstico del DILI. Este estudio doctoral se ha enfocado en analizar diferentes biomarcadores candidatos para el DILI. En las siguientes secciones se presentan diferentes estrategias en la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos.

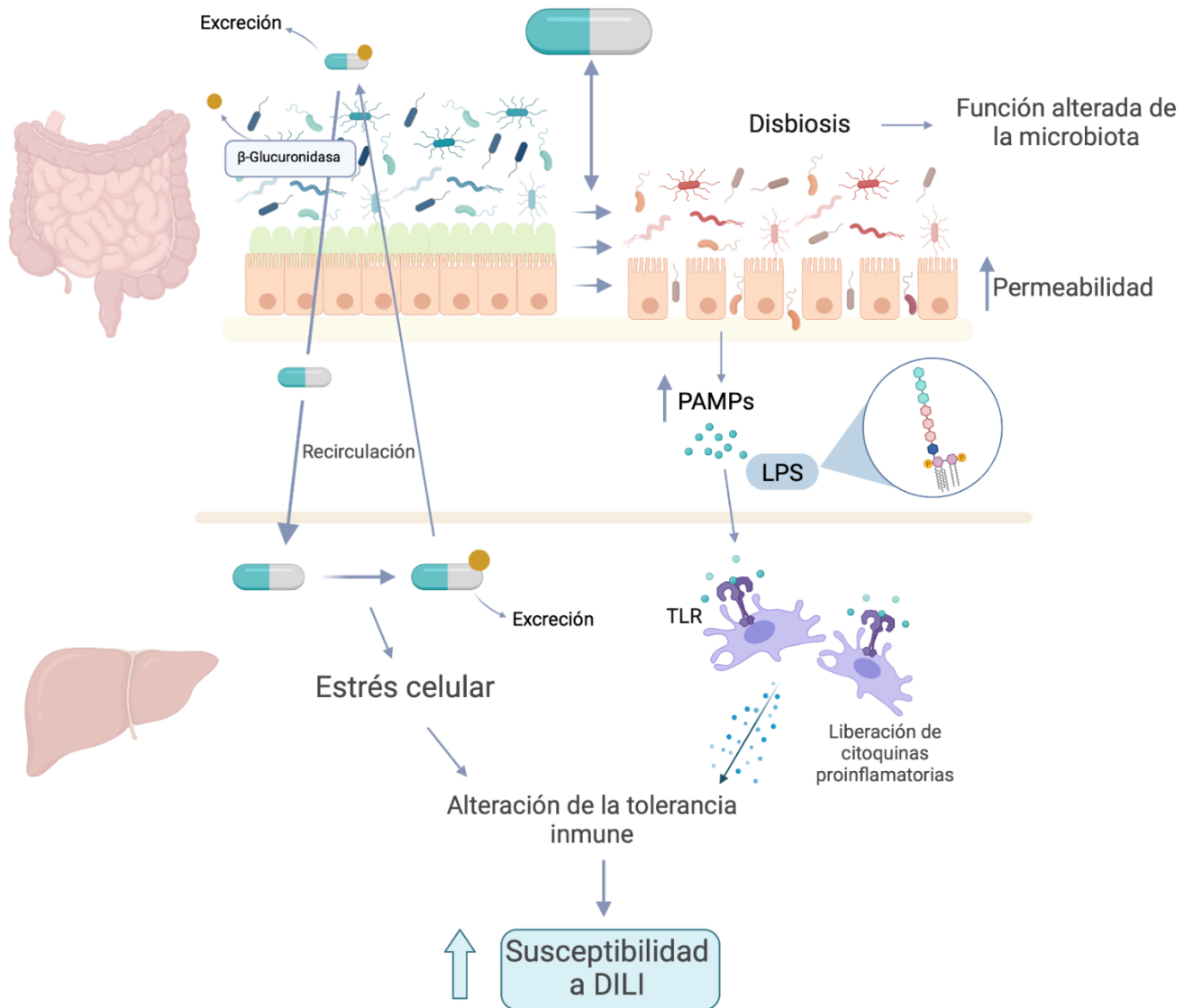


Figura 4. El mecanismo hipotético del papel de la microbiota en DILI. La microbiota puede modificar el metabolismo de los fármacos afectando a la farmacodinámica, por ejemplo, la actividad de la β -glucuronidasa microbiana puede producir la recirculación enterohepática de los fármacos y puede incrementar el estrés celular. Los fármacos pueden producir una disbiosis de la microbiota alterando su función. Esta disbiosis puede incrementar la permeabilidad intestinal y aumentar la llegada de LPS al hígado, lo que puede activar el sistema inmune y romper la tolerancia inmune. La relación de los fármacos con la microbiota podría incrementar la susceptibilidad en el DILI. DILI: Daño hepático inducido por fármacos; LPS: Lipopolisacárido; PAMPs, Patrones moleculares asociados a patógenos.



Nuevos horizontes en el diagnóstico de DILI

Búsqueda de biomarcadores candidatos

Hasta ahora, no se han identificado biomarcadores específicos para diagnosticar el DILI. En su lugar, se utilizan parámetros bioquímicos convencionales para detectar esta enfermedad, como los niveles en suero de la ALT, AST, FA y GGT, que suelen indicar una alteración en el tejido hepático y daño celular. Sin embargo, diferentes estudios han evaluado el potencial de nuevos biomarcadores para DILI. En 2014, Thulin *et al* evaluaron el potencial de la queratina 18 total (K18 del inglés *cytokeratin 18*) y escindida por caspasas (ccK18 del inglés *caspase-cleaved cytokeratin 18*), miR-122, glutamato deshidrogenasa (GDH) y Alfa-fetoproteína, de distinguir pacientes con elevaciones de aminotransferasas en dos cohortes de sujetos, una con pacientes tratados con APAP y otra con pacientes tratados para la coinfección de tuberculosis y/o el virus de la inmunodeficiencia humana ¹¹⁹. En ambos grupos de estudio K18 y miR-122 se detectaron antes que la ALT en sangre por lo que se plantean como indicadores de lesión hepática más tempranos. El estudio también midió estos biomarcadores junto con los convencionales en pacientes antes y después de realizar ejercicio extenuante. Se encontró que los niveles de ALT aumentaron después del ejercicio, pero no en los biomarcadores, lo que sugiere que los biomarcadores candidatos tienen una mayor especificidad para el hígado que la ALT. En 2019, se publicó un estudio a nivel internacional en el cual se evaluaron 14 diferentes biomarcadores candidatos ¹²⁰. Los biomarcadores seleccionados fueron miR-122, GDH, K18, ccK18, α -GST, α -fetoproteína, arginasa 1, osteopontina (OPN), sorbitol deshidrogenasa, FABP1 (*Fatty Acid-Binding Protein 1*: proteína de unión a ácidos grasos 1), cadherina-5, el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF1R del inglés *macrophage colony-stimulating factor 1 receptor*), paraoxonasa 1 y la quimiotaxina-2 derivada de células leucocitarias (LECT2 del inglés *leucocyte cell-derived chemotaxin 2*). La mayoría de los biomarcadores que se evaluaron mostraron niveles más elevados en los casos DILI que en los controles sanos. En concreto, K18, ccK18, FABP1 y GDH mostraron los mejores resultados en la distinción de los casos DILI ¹²⁰. Otros de estos biomarcadores presentaron un gran potencial pronóstico distinguiendo los casos de DILI grave (casos que se sometieron a trasplante hepático o que fallecieron). Por ejemplo, la K18 y la OPN se encontraron en niveles elevados en los casos graves.

Aunque todos estos estudios sugieren el potencial de los biomarcadores para el diagnóstico de DILI, es necesario validar la efectividad de estos biomarcadores candidatos en otros grupos de daño hepático agudo para confirmar su utilidad en la práctica clínica. En este estudio se abordará esta necesidad mediante la evaluación de varios biomarcadores diferentes en varios grupos de pacientes. A continuación, se describirán los biomarcadores específicos que se estudiarán en este estudio doctoral.

MicroRNA-122

Un microRNA o miRNA es un RNA pequeño no codificante que tiene la capacidad de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional produciendo el silenciamiento o degradación de los RNA mensajeros. Están implicados en diferentes procesos biológicos como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y el desarrollo embrionario ¹²¹ Además, participan en la comunicación intercelular liberándose tanto libres como en microvesículas o exosomas.

Los miRNAs se han propuesto como biomarcadores útiles en el diagnóstico de diferentes patologías ya que presentan una serie de características que los hacen idóneos para ello. Son muy estables y se detectan en diferentes fluidos corporales, como sangre y orina, por lo que la toma de muestras es muy sencilla. Además, son muy específicos del tejido del que provienen y son muy sensibles ¹²², pudiendo incrementar sus niveles ante un estado patológico detectable ¹²³. Se han identificado diferentes miRNAs asociados a diferentes patologías hepáticas. En concreto, el miR-122 tiene gran importancia ya que es específico del hígado y constituye el 70 % de todos los miRNAs producidos por este órgano ¹²⁴. Por lo que se ha planteado su potencial como biomarcador en el DILI.

Citoqueratina-18

Las citoqueratinas son péptidos que forman parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de diversos tipos celulares. La citoqueratina-18 es una de los tipos de queratina más expresadas dentro de la familia de genes de los filamentos intermedios del hígado. Su utilidad como biomarcador se basa en la información del mecanismo que ofrece esta proteína cuando se detecta extracelularmente, debido a procesos de apoptosis y necrosis. De hecho, para la detección de esta proteína se pueden utilizar dos antígenos diferentes sobre esta proteína, que son M30 y M65 ¹²⁵. Durante la apoptosis las caspasas escinden a la citoqueratina-18 en fragmentos séricos (ccK18) que muestran el antígeno

M30. Sin embargo, el M65 es un antígeno que se detecta tanto en la forma escindida por caspasas, como en el fragmento completo liberado (K18) en el proceso de necrosis.

Alfa-glutación S-transferasa

Las enzimas GST participan en los procesos de detoxificación de los fármacos y xenobióticos. Para ello, catalizan la conjugación del glutatión reducido a los metabolitos reactivos formando compuestos que son más fáciles de eliminar ¹²⁶. Estas enzimas tienen ciertas características que las hacen muy interesantes como biomarcadores de daño. Se encuentran en concentraciones intracelulares elevadas y presentan una distribución celular específica. Por ejemplo, α -GST se detecta en grandes concentraciones en el citoplasma de los hepatocitos, y se libera cuando se rompe la membrana celular, permitiendo su detección en una etapa temprana ¹²⁷. Es una proteína que presenta una gran especificidad del hígado, ya que, aunque también se exprese en niveles altos en riñones, su nivel se incrementa en orina y no en sangre ¹²⁸.

Osteopontina

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína de la matriz extracelular que es sintetizada por una gran variedad de tipos celulares. Se localiza en la matriz ósea, donde desempeña una actividad estructural y participa en la remodelación de los huesos, ayudando a los osteoclastos en el inicio de la resorción ósea ¹²⁹. Además, es producida por células del sistema inmune como las células dendríticas o macrófagos, actuando como citocina proinflamatoria y participando en la modulación del sistema inmune ¹³⁰. También actúa como quimiocina, atrayendo a otras células del sistema inmune hacia una zona dañada ¹³¹. El papel de la OPN como citocina proinflamatoria podría tener un papel importante en diferentes patologías hepáticas como son la esteatosis, la AIH, la VH y el carcinoma hepatocelular (HCC del inglés *hepatocellular carcinoma*) ^{132,133}. A pesar de ellos, su papel en estas patologías no está del todo claro. Por ejemplo, en casos de hepatitis viral B (VHB) se observó un mayor nivel de OPN en suero de los pacientes con insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF del inglés *acute-on-chronic liver failure*) asociado a VHB frente a los que tenían VHB crónica ¹³⁴. Sin embargo, en un estudio se observó que los casos de ALF que llegaban a recuperarse mostraban niveles más elevados de OPN que aquellos que necesitaron un trasplante hepático o no sobrevivieron ¹³⁵. Por lo que, si la OPN participa en la progresión del daño, o protege, en el contexto de una lesión hepática aguda necesita más investigación.

Búsqueda de una huella inmunológica en DILI

La búsqueda de una “huella” inmunológica o inmunofenotipado podría ayudar a realizar diagnósticos más precisos en patologías como el DILI. Esta técnica consiste en la caracterización de las diferentes células inmunes presentes en una determinada muestra, lo cual aporta información del estado inmunitario del paciente. Se puede realizar mediante diferentes técnicas sin embargo actualmente, la citometría de flujo es la más utilizada. Para su realización, se utilizan anticuerpos específicos marcados con diferentes fluorocromos que se unen a marcadores presentes en las células¹³⁶. Una vez marcadas las células se introducen en el citómetro, donde se van a clasificar según su tamaño, complejidad y según la presencia o ausencia de un determinado marcador detectado por fluorescencia. La combinación de diferentes anticuerpos permite realizar un análisis multiparamétrico e identificar diferentes poblaciones celulares a la vez¹³⁷.

Es una herramienta utilizada en el diagnóstico y seguimiento de diferentes patologías debido a que no es una técnica invasiva, ya que normalmente se realiza en muestras de sangre. No obstante, se pueden utilizar otro tipo de muestras como médula ósea, biopsias u otros fluidos biológicos¹³⁸⁻¹⁴⁰.

El uso del inmunofenotipado tiene potencial en el estudio de las patologías hepáticas, ya que todas comparten un trasfondo inflamatorio. Conocer las diferentes poblaciones de células inmunes presentes en el momento agudo del daño ayudará a ampliar el conocimiento del mecanismo patológico de la enfermedad. De hecho, la comunicación entre las células inmunitarias residentes en el hígado, los hepatocitos y las células inmunitarias infiltrantes puede condicionar la progresión de la enfermedad.

En un estudio que examinó el tejido hepático de pacientes con DILI, se observó diferencias en la infiltración de células inmunes en comparación con otras enfermedades hepáticas. Los pacientes con DILI tenían niveles más altos de ciertas células inmunes, como las células T citotóxicas CD8+ y los macrófagos, pero menores niveles de otras células inmunes, como las células B y las células NK, en comparación con los pacientes con otras enfermedades hepáticas¹⁴¹.

Sin embargo, los estudios histológicos son limitados en el diagnóstico del DILI, ya que las biopsias del hígado no son una práctica común en esta enfermedad. Una alternativa a las biopsias es el uso del inmunofenotipado en sangre periférica, ya que esta técnica podría reflejar los eventos inflamatorios que ocurren en el hígado y permitir la identificación de un patrón único de células inmune periférica. Esta técnica proporciona

información sobre el mecanismo de la enfermedad y puede ayudar a encontrar un patrón único de poblaciones linfocitarias que pueda utilizarse en el diagnóstico de DILI

Búsqueda de un perfil de citocinas en DILI

Se ha sugerido que la identificación de patrones específicos de citocinas y quimiocinas, podrían ser utilizados como biomarcadores en patologías hepáticas como el DILI ¹⁴². En el hígado, las células inmunitarias residentes normalmente producen una pequeña cantidad de citocinas y quimiocinas, pero durante un daño o infección aumentan significativamente su expresión. Se liberan constantemente al torrente sanguíneo citocinas producidas tanto por las células presentes en la sangre como por células de los diferentes tejidos. Por tanto, su identificación en la sangre podría proporcionar información sobre el estado del sistema inmunitario en un órgano determinado. El perfil de citocinas permitió diferenciar los casos de HCC, de hepatitis vírica (infección por el virus VHB o el virus de la hepatitis C (VHC)), así como los casos con ambas patologías ¹⁴³. También se ha destacado el potencial pronóstico de las citocinas en algunas enfermedades. Recientemente, en un estudio que evaluó el efecto del NAFLD en 94 pacientes infectados por COVID-19 grave, se observó que los pacientes con NAFLD concomitante que progresaron a COVID-19 grave tenían un perfil de citocina distinto. En estos pacientes se observó niveles más altos de IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- β . Además, se descubrió que la IL-8 y la IL-10 tenían un potencial pronóstico con respecto al tiempo de recuperación ¹⁴⁴. Además, los casos de DILI con mejor resultado han sido asociados a niveles más altos de IL-22, lo que sugiere que la IL-22 puede desempeñar un aparente papel hepatoprotector ¹⁴⁵.

Por ello, la caracterización de los perfiles inmunitarios proporciona información novedosa que podría ayudar a comprender el papel mecánico que desempeñan las citocinas y quimiocinas en la patogénesis de la DILI.

Búsqueda de un patrón de microbiota en DILI

La implicación de la microbiota intestinal en el desarrollo de diferentes patologías en el ser humano es cada vez más evidente. Por ello, tanto la búsqueda de un perfil de composición específico que sirva como diagnóstico, como la manipulación terapéutica de la microbiota, son campos de investigación que están generando gran interés. Además, se han producido grandes avances en las técnicas de secuenciación y en la biología

computacional de los últimos años que permiten avanzar en el estudio de la microbiota. Actualmente existen diferentes métodos para analizar la microbiota, y las técnicas de secuenciación del ARN ribosómico 16S son las más comúnmente utilizadas ¹⁴⁶. La secuenciación permite la detección de taxones específicos de forma directa y aporta información de la abundancia relativa de los mismos.

La microbiota se puede evaluar en términos de su diversidad, que podría definirse como el número de especies diferentes que presenta un determinado ecosistema. Se clasifica en varios tipos que son alfa, que se refiere a la diversidad individual, y beta, que se refiere a la diversidad entre dos comunidades diferentes. Existen varios índices que son utilizados para evaluar la diversidad, como la riqueza, que es un índice de la alfa diversidad que indica el número total de especies presente en una determinada muestra. Normalmente una alta diversidad se asocia con un estado de salud mejor ¹⁴⁷. Sin embargo, es difícil definir una composición de la microbiota saludable ya que está directamente condicionada por factores como la dieta o el consumo de fármacos, y es muy cambiante en el tiempo. No obstante, cambios en la microbiota o disbiosis producen una serie de consecuencias en el ser humano que se asocia directamente con el desarrollo de diferentes patologías ¹⁴⁸.

El análisis de la microbiota, especialmente a través de la identificación de perfiles característicos, ha sido utilizado como una herramienta valiosa para el estudio de diferentes patologías hepáticas. Esto ha permitido obtener una mayor comprensión de la relación entre la microbiota y la salud hepática, y podría llegar a ser útil en el diagnóstico y el tratamiento de estas enfermedades. Por ejemplo, un estudio que evaluó la microbiota intestinal en pacientes de HCC con cirrosis y NAFLD, mostró que el descenso de bacterias como *Akkermansia* y *Bifidobacterium* podría estar correlacionado con la inflamación sistémica y condicionar el desarrollo de la hepatocarcinogénesis ¹⁴⁹. En otro estudio, se observó como en los casos avanzados de NAFLD la presencia del género *Bacteroides* fue mayor ¹⁵⁰. Por lo que la microbiota podría estar implicada o ser una consecuencia en el proceso de fibrosis observados en los estados avanzados de esta patología.

Por ello, el análisis de la composición de la microbiota en el DILI podría permitir encontrar un patrón diferencial diagnóstico frente a otras patologías hepáticas, y ampliar el conocimiento sobre el posible papel de la microbiota en la patogénesis de la enfermedad. En la siguiente figura se esquematizan los siguientes puntos en los cuales se enfoca este estudio doctoral:

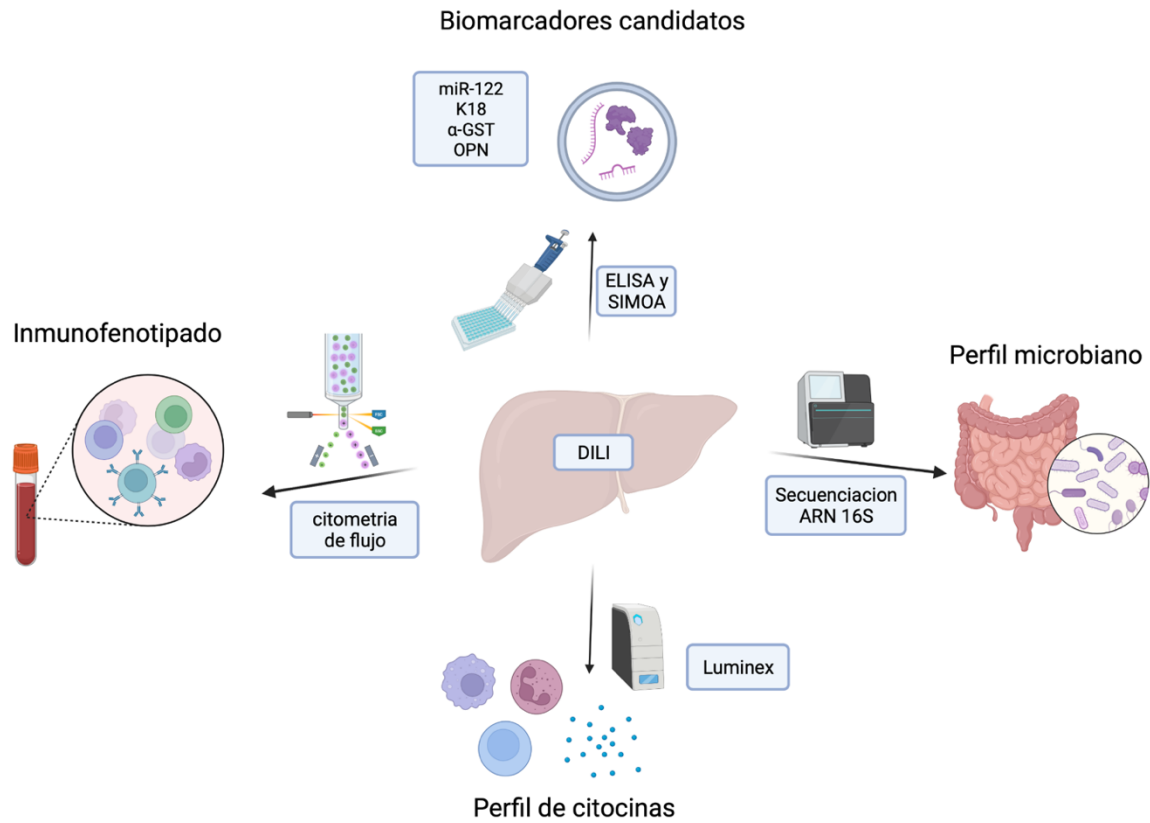


Figura 5. Nuevos horizontes en el diagnóstico y estudio del mecanismo de DILI. El inmunofenotipado se analiza mediante citometría de flujo. Los biomarcadores candidatos osteopontina (OPN), citoqueratina-18 (K18), α -glutatión-S-transferasa (α -GST) y microARN-122 (miR-122) se analizan mediante ensayo ELISA y SIMOA. El perfil de la microbiota se analizará mediante la secuenciación del ARN 16S. EL perfil de citocinas se evalúa mediante ensayo Luminex Multiplex. DILI: Daño hepático inducido por fármacos.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



En base a los antecedentes tratados se plantean la siguientes **HIPÓTESIS**:

1. *Los biomarcadores candidatos séricos miR-122, OPN, α -GST, K18 y ccK18, podrían tener potencial diagnóstico y pronóstico en el daño hepático inducido por fármacos (DILI).*
2. *El sistema inmunitario adaptativo podría estar involucrado en el desarrollo de DILI y presentar un patrón característico de pérdida de la tolerancia inmune que contribuiría a su gravedad y evolución.*
3. *Los pacientes con DILI podrían presentar una composición de la microbiota intestinal diferente a la de los pacientes con daño hepático agudo no DILI y controles con el hígado sano, y en consecuencia tener un aumento potencial de la permeabilidad intestinal y de la translocación bacteriana, lo que podría aumentar su susceptibilidad al desarrollo de DILI.*

Con objeto de contrastar estas hipótesis, se proponen los siguientes **OBJETIVOS** fundamentales:

Objetivos

1. *Validar y cualificar biomarcadores candidatos de daño hepático en muestras seriadas de DILI, daño hepático agudo no DILI y controles con el hígado sano.*
 - 1.1. *Validar los biomarcadores OPN, α -GST, K18 y ccK18 mediante ELISA.*
 - 1.2. *Validar miR-122 mediante la plataforma SIMOA (Quanterix).*
2. *Estudiar el papel del sistema inmune adaptativo en casos de DILI en comparación con casos de daño hepático agudo no DILI y controles con el hígado sano.*
 - 2.1. *Realizar un análisis comparativo de los perfiles de poblaciones linfocitarias funcionales, mediante citometría de flujo, en muestras seriadas de sangre periférica desde la detección de DILI hasta la normalización del perfil hepático, entre pacientes con DILI, daño hepático agudo no DILI y sujetos control*

con el hígado sano y perfiles hepáticos normales en el momento de la recogida de muestras.

2.2. Comparar el nivel de los puntos de control inmunitarios (receptores linfocitarios y ligandos monocitarios, "immune-checkpoints") para analizar su contribución a la inmunotolerancia/pérdida en el DILI, su gravedad y evolución.

2.3. Comparar los niveles de citocinas pro y antiinflamatorias, y quimiocinas, entre los tres grupos de estudio, utilizando el inmunoensayo múltiple Affymetrix procartaplex, con el objetivo de identificar un perfil diferencial en pacientes con DILI.

3. Estudiar el papel de la microbiota intestinal en casos de DILI, en casos con daño hepático agudo no DILI y controles con el hígado sano.

3.1. Comparar los patrones de la microbiota (distribución bacteriana) entre las tres poblaciones de estudio mediante pirosecuenciación.

**Evaluación de biomarcadores candidatos diagnósticos y
pronósticos en el daño hepático inducido por fármacos frente
a otras formas de daño hepático agudo**



INTRODUCCIÓN

Los resultados del estudio de colaboración a nivel internacional del Consorcio *Safer and Faster Evidence-based Translation* mostraron que la OPN, K18, ccK18, la α -GST y el miR-122, entre otros, son biomarcadores candidatos prometedores en la evaluación del DILI ¹²⁰.

La OPN parece desempeñar un papel importante en una serie de trastornos hepáticos ¹³². Aunque la función exacta de la OPN en las enfermedades hepáticas no se ha dilucidado por completo, se han detectado niveles elevados en la sangre periférica de pacientes con DILI, en particular en aquellos con un mal pronóstico ¹²⁰.

La citoqueratina-18, en particular la ccK18, es un posible biomarcador para la detección de fibrosis en niños con enfermedad del hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica en poblaciones adultas ¹⁵¹⁻¹⁵³. También se ha comunicado que los pacientes con lesión hepática relacionada con el alcohol presentan niveles séricos de citoqueratina-18 más elevados que los controles sanos ¹⁵⁴. En cuanto al DILI, existen pruebas de que los niveles séricos de citoqueratina-18 aumentan tanto en pacientes con DILI intrínseco (sobredosis de paracetamol) ¹⁵⁵ como en pacientes con DILI idiosincrásico ¹²⁰. Además, se ha descrito que la magnitud de K18 y ccK18 en suero se correlaciona con la gravedad clínica en afecciones hepáticas como la descompensación aguda y ACLF ¹⁵⁶.

La α -GST es otro biomarcador que se ha asociado con elevaciones plasmáticas en pacientes que presentan daño hepático tanto agudo como crónico. La α -GST muestra una correlación positiva con la ALT y la AST ¹²⁷, y debido a su vida media más corta, podría ser un biomarcador más sensible para detectar la mejoría o el empeoramiento del daño hepático ¹⁵⁷.

Los miRNAs pueden liberarse activamente de la célula en una fase temprana del daño celular, antes de que mediante un análisis bioquímico convencional pueda detectar la lesión. Esto se ha observado para miR-122 en el daño hepático inducido por APAP, donde se observó un gran aumento de sus niveles antes de la detección de síntomas de daño hepático o incluso de elevaciones de aminotransferasas ¹⁵⁵.

La aparición de nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos específicos de DILI no sólo influirá en la atención de los pacientes en la clínica, sino que también podría beneficiar a la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos fármacos más seguros. Por lo tanto, el objetivo principal fue evaluar la utilidad de miR-122, K18, ccK18, α -GST y OPN como biomarcadores diagnósticos y pronósticos, comparando los niveles de los

mismos en DILI frente a pacientes con daño hepático agudo no DILI (ALI del inglés *acute liver injury*) y controles con el hígado sano (HLC del inglés *healthy liver controls*). En este estudio se evaluó la especificidad de los biomarcadores incluyendo el grupo ALI, con daño hepático agudo de otras etiologías, lo cual ha sido pasado por alto en muchos estudios anteriores que evaluaron biomarcadores potenciales para el DILI. El objetivo planteado en este apartado se corresponde con el objetivo 1 de esta tesis doctoral: “Validación y cualificación de biomarcadores candidatos de daño hepático en muestras seriadas de DILI, daño hepático agudo no DILI y controles con el hígado sano”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos y protocolo de estudio

Los casos de DILI fueron seleccionados de entre los presentados al Registro Español de DILI; una red de colaboración establecida en 1994 para identificar prospectivamente casos de DILI de forma estandarizada. Los criterios de DILI en el momento de la inclusión de los sujetos en el estudio fueron: $ALT \geq 5x LSN$ o $ALT \geq 3x LSN + BT \geq 2x LSN$ o $FA \geq 2x LSN$. Se realizaron pruebas serológicas y bioquímicas para descartar lesiones hepáticas por VH (virus de la hepatitis A (VHA), VHB, VHC, virus de la hepatitis E (VHE), citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein-Barr (VEB)) y pruebas de imagen para descartar trastornos de las vías biliares, enfermedades vasculares y tumores. También se descartaron causas alternativas de lesión hepática, como la AIH y las enfermedades metabólicas. Se evaluó la causalidad de todos los casos presentados, inicialmente mediante una evaluación clínica por parte del médico responsable y mediante la adjudicación realizada por un panel de tres expertos y, posteriormente, aplicando la escala de causalidad RUCAM. El patrón de daño hepático se definió como hepatocelular, colestásico o mixto basándose en el valor R, valor cociente de ALT y FA, ambos expresados como múltiplo del LSN según Aithal *et al.* El grupo ALI utilizado en este estudio cumplía los mismos criterios bioquímicos de inclusión que los casos DILI pero, tras una evaluación completa, se les diagnosticó una enfermedad hepática aguda diferente a DILI. Los HLC presentaban un perfil hepático normal en el momento de la recogida de muestras y no habían sufrido ningún episodio de DILI previamente. Este grupo estaba formado por empleados de la Universidad de Málaga que se sometieron a su reconocimiento médico anual. El protocolo del estudio, que se ajusta a las directrices éticas de la Declaración de Helsinki, fue aprobado por el Comité Ético Local del Hospital

Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, España. Todos los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado antes de ser incluidos en el estudio.

Recogida y preparación de muestras

Se recogieron muestras seriadas de los pacientes con DILI y ALI los días 1 (reconocimiento), 7 y ≥ 30 días hasta la normalización del perfil hepático, siempre y cuando fue posible. En el caso de HLC, sólo se recogió una muestra de sangre en una única visita. Tras la extracción, se realizaron alícuotas de plasma y suero y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los análisis.

Análisis de los biomarcadores candidatos

La OPN, K18, ccK18 y α -GST se analizaron utilizando kits ELISA comerciales. La OPN se analizó en muestras de plasma de 29 DILI, 34 ALI y 31 HLC utilizando el kit Enzo ADI-900-142 Osteopontin (*human*) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY). La citoqueratina-18 se analizó en muestras de suero de 32 DILI, 33 ALI y 43 HLC utilizando PEVIVA M65 EpiDeath ELISA (VLVbio, Nacka, Suecia) que mide el total de K18 soluble liberado por las células muertas (necróticas y apoptóticas), mientras que el kit PEVIVA M30 Apoptosense ELISA (VLVbio, Nacka, Suecia) se utilizó para detectar ccK18 (sólo apoptosis). La alfa-GST se midió en muestras de plasma de 30 DILI, 31 ALI y 33 HLC utilizando el kit TE 1056 Human alpha GST ELISA (TECO medical group, Sissach, Suiza). Los niveles de miR-122 se analizaron en colaboración con la empresa DestiNA Genomics, que ha desarrollado un método de sonda única para detectar microARN del suero humano utilizando matrices de una única molécula, como se ha descrito previamente ¹⁵⁸. Este análisis se realizó en un subconjunto de la cohorte total, que constaba de 13 sujetos con DILI, 20 con ALI y 25 con HLC. Los niveles de los biomarcadores candidatos se estandarizaron dividiendo las concentraciones de los pacientes por el valor medio correspondiente del grupo HLC. Los valores de los biomarcadores convencionales (ALT, AST, FA, BT, INR y creatinina) se obtuvieron a partir de análisis de sangre realizados, como parte de la evaluación clínica, el mismo día de las extracciones de las muestras.

Análisis estadístico

El rendimiento diagnóstico potencial de los biomarcadores se determinó mediante el análisis de la curva (AUC del inglés *area under the curve*) característica del operador (ROC del inglés *receiver operator characteristic*) comparando el AUC entre los tres grupos, mientras que el rendimiento pronóstico potencial se analizó comparando las AUC entre los pacientes (DILI y ALI) que fallecieron o requirieron un trasplante de hígado frente a los pacientes que se recuperaron espontáneamente. Las asociaciones entre los biomarcadores candidatos y los parámetros bioquímicos convencionales se determinaron mediante un análisis de correlación de Spearman. Todas las pruebas estadísticas fueron hipótesis de 2 colas realizadas al nivel de significación de 0.05 y se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism (9.3.1) y RStudio (4.0.5).

RESULTADOS

Descripción de la cohorte del estudio

En este estudio se analizaron muestras de sangre de 32 pacientes de DILI, 34 de ALI y 43 de HLC. La edad media de los pacientes con DILI fue de 50 años y el 34% eran mujeres. La mayoría de los casos de DILI fueron causados por medicamentos convencionales, principalmente antibióticos. Sólo 7 pacientes desarrollaron DILI debido al uso de HDS, incluyendo esteroides anabólicos androgénicos, solos o en combinación con medicamentos convencionales. En el grupo ALI, la edad media fue de 49 años y el 50% eran mujeres. Las etiologías del grupo ALI fueron principalmente la VH (59%) y la AIH (26%). El 44% de los casos presentaban fibrosis en diversos estadios. El grupo HLC tenía una edad media de 50 años, y el 56% eran mujeres. Las características clínicas y demográficas de la población total del estudio se muestran en la Tabla 2.

Rendimiento de los biomarcadores

Los resultados normalizados de los biomarcadores candidatos en la visita 1 se compararon mediante análisis de curvas ROC (Tabla 3). Todos los biomarcadores fueron capaces de distinguir entre DILI y HLC con un AUC >0.75. El miR-122 presentó el valor de AUC más alto (1.0) debido a una detección muy limitada en el grupo HLC, seguido de ccK18 (0.97), K18 (0.96), OPN (0.77) y α -GST (0.75). Del mismo modo, todos los biomarcadores fueron capaces de distinguir entre ALI y HLC con un AUC >0.75. Sin

embargo, todos los biomarcadores candidatos presentaron una capacidad menor de distinguir entre DILI y ALI. Los mayores valores de AUC se detectaron para cck18 (0.79) y K18 (0.77), seguidos de ALT (0.76). La subdivisión de los casos de ALI en VH (n=20) y AIH (n=9) mejoró sustancialmente la capacidad de ccK18 (0.98) y K18 (0.97) para distinguir entre DILI y AIH, mientras que DILI frente a VH mostró valores de AUC de 0.71 y 0,69, respectivamente. No se detectaron diferencias llamativas para los demás biomarcadores candidatos (Tabla 4).

Tabla 2. Comparación de datos demográficos y características clínicas entre pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI), daño hepático agudo no DILI (ALI) y pacientes control con el hígado sano sin antecedentes de DILI (HLC).

	DILI N=32	ALI N=34	HLC N=43
Edad (años), media ±DE	50 ±16	49 ± 21	50 ±10
Mujeres, %	34	50	56
IMC (kg/m²), media ±DE	26 ±3.2	25 ±4.5	25 ±4.1
Diabetes mellitus, %	13	18	4.7
Hipertensión, %	25	26	2.3
Características del episodio hepático, %			
Ictericia	59	85	NA
Hospitalización	66	84	NA
Tipo de daño, %			
Hepatocelular	52	79	NA
Colestásico	19	8.8	NA
Mixto	29	12	NA
Parámetros de laboratorio en la visita 1 (media ±DE)			
BT, mg/dL	9.8 ± 13	12 ± 8.9	0.6 ± 0.3
AST, UI/L	182± 165	784 ± 756	23 ± 4.6
ALT, UI/L	379 ± 324	1093 ± 1119	22 ± 7.1
FA, UI/L	287 ± 286	232 ± 139	54 ± 16
INR	1.08 ±0.2	1.3 ±0.4	SD
Gravedad, %			
Leve	38	2.9	NA
Moderado	59	47	NA
Grave	0	29	NA
Fatal o trasplante	3.1	21	NA

ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; DE: desviación estándar; FA: fosfatasa alcalina; IMC: índice de masa corporal; INR: tiempo de protombina normalizado; NA: no aplica; SD: sin datos.

Tabla 3. Rendimiento de los biomarcadores analizados. Se indican los valores de curva ROC obtenidos en muestras de la visita 1 de pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI) y daño hepático agudo no DILI (ALI), además de controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI (HLC).

Biomarcador	Grupos (n)	AUC	95% IC	Índice de Youden	Sensibilidad*	Especificidad*
ALT	DILI (32) vs HLC (40)	1.000#	1.000 – 1.000#	52.5#	1#	1#
	ALI (34) vs HLC (40)	1.000#	1.000 – 1.000#	54#	1#	1#
	DILI (32) vs ALI (34)	0.760	0.643 – 0.877	280.5	0.824	0.625
	DILI (29) vs HLC (31)	0.771	0.645 – 0.897	1.2	0.774	0.793
OPN	ALI (33) vs HLC (31)	0.758	0.641 – 0.874	1.3	0.806	0.606
	DILI (29) vs ALI (33)	0.507	0.360 – 0.654	1.2	0.394	0.759
	DILI (32) vs HLC (43)	0.970	0.939 – 1.000	1.2	0.814	1.000
	ALI (33) vs HLC (43)	0.992	0.980 – 1.000	2.4	0.977	0.939
ccK18	DILI (32) vs ALI (33)	0.794	0.684 – 0.904	12.6	0.667	0.844
	DILI (32) vs HLC (43)	0.958	0.914 – 1.000	4.7	1	0.813
K18	ALI (33) vs HLC (43)	0.979	0.953 – 1.000	4.2	0.976	0.909
	DILI (32) vs ALI (33)	0.768	0.6490 – 0.887	32.7	0.545	0.969
	DILI (30) vs HLC (33)	0.752	0.623 – 0.881	1.7	0.939	0.633
	ALI (31) vs HLC (33)	0.893	0.812 – 0.974	1.2	0.818	0.871
α-GST	DILI (30) vs ALI (31)	0.645	0.506 – 0.783	2.9	0.710	0.567
	DILI (13) vs HLC (24)	1.000##	1.000 – 1.000##	0.5##	1.000##	1.000##
miR-122	ALI (20) vs HLC (24)	0.998##	0.991 – 1.000##	0.3##	1.000##	0.950##
	DILI (13) vs ALI (20)	0.531	0.332 – 0.729	9.3	0.400	0.923

*En el punto de corte óptimo

#ALT se utilizó para definir la lesión hepática (DILI y ALI)

Resultado de la detección limitada en HLC

ALT: alanina aminotransferasa; α -GST: α -glutación-S-transferasa; AUC: área bajo la curva ROC; ccK18: citoqueratina-18 escindida por caspasa; IC: intervalo de confianza; K18: citoqueratina-18 total; miR-122: microARN-122; OPN: osteopontina.

Tabla 4. Rendimiento de los biomarcadores analizados. Se indican los valores de curva ROC obtenidos en muestras de la visita 1 de pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI), hepatitis autoinmune (AIH) y hepatitis vírica (VH).

Biomarcadores	Grupos (n)	AUC	95% IC
ALT	DILI (32) vs AIH (9)	0.875	0.766-0.984
	DILI (32) vs VH (20)	0.764	0.630-0.898
OPN	DILI (29) vs AIH (9)	0.540	0.327-0.753
	DILI (29) vs VH (20)	0.591	0.419-0.764
ccK18	DILI (32) vs AIH (8)	0.977	0.933-1.000
	DILI (32) vs VH (20)	0.705	0.556-0.855
K18	DILI (32) vs AIH (8)	0.969	0.906-1.000
	DILI (32) vs VH (20)	0.686	0.525-0.847
α-GST	DILI (30) vs AIH (8)	0.633	0.460-0.807
	DILI (30) vs VH (18)	0.640	0.481-0.800
miR-122	DILI (13) vs AIH (3)	0.641	0.123-1.000
	DILI (13) vs VH (18)	0.526	0.318-0.733

ALT: alanina aminotransferasa; α -GST: α -glutación-S-transferasa; AUC: área bajo la curva ROC; ccK18: citoqueratina-18 escindida por caspasa; IC: intervalo de confianza; K18: citoqueratina-18 total; miR-122: microARN-122; OPN: osteopontina.

Progresión de los biomarcadores durante el episodio hepático

La progresión de los biomarcadores a lo largo del tiempo, es decir, en las visitas 1, 2 y 3, se representa en la Figura 6. Los niveles de todos los biomarcadores candidatos disminuyeron notablemente después de la primera visita en paralelo con la disminución de los biomarcadores convencionales (ALT, AST, FA y BT), reflejando la normalización del perfil hepático acercándose a los niveles observados en el grupo HLC. La citoqueratina-18 (K18 y ccK18) presentó los mayores incrementos en comparación con HLC tanto en DILI como en ALI, que de hecho fueron mayores que los de ALT y la AST en los grupos correspondientes. Por el contrario, la OPN presentó un aumento moderado en comparación con los HLC, pero de igual forma tanto en DILI como en ALI. Todas las elevaciones de los biomarcadores candidatos en las tres visitas fueron mayores en los ALI que en los DILI. Sin embargo, se encontró la misma tendencia para el nivel de los biomarcadores convencionales.

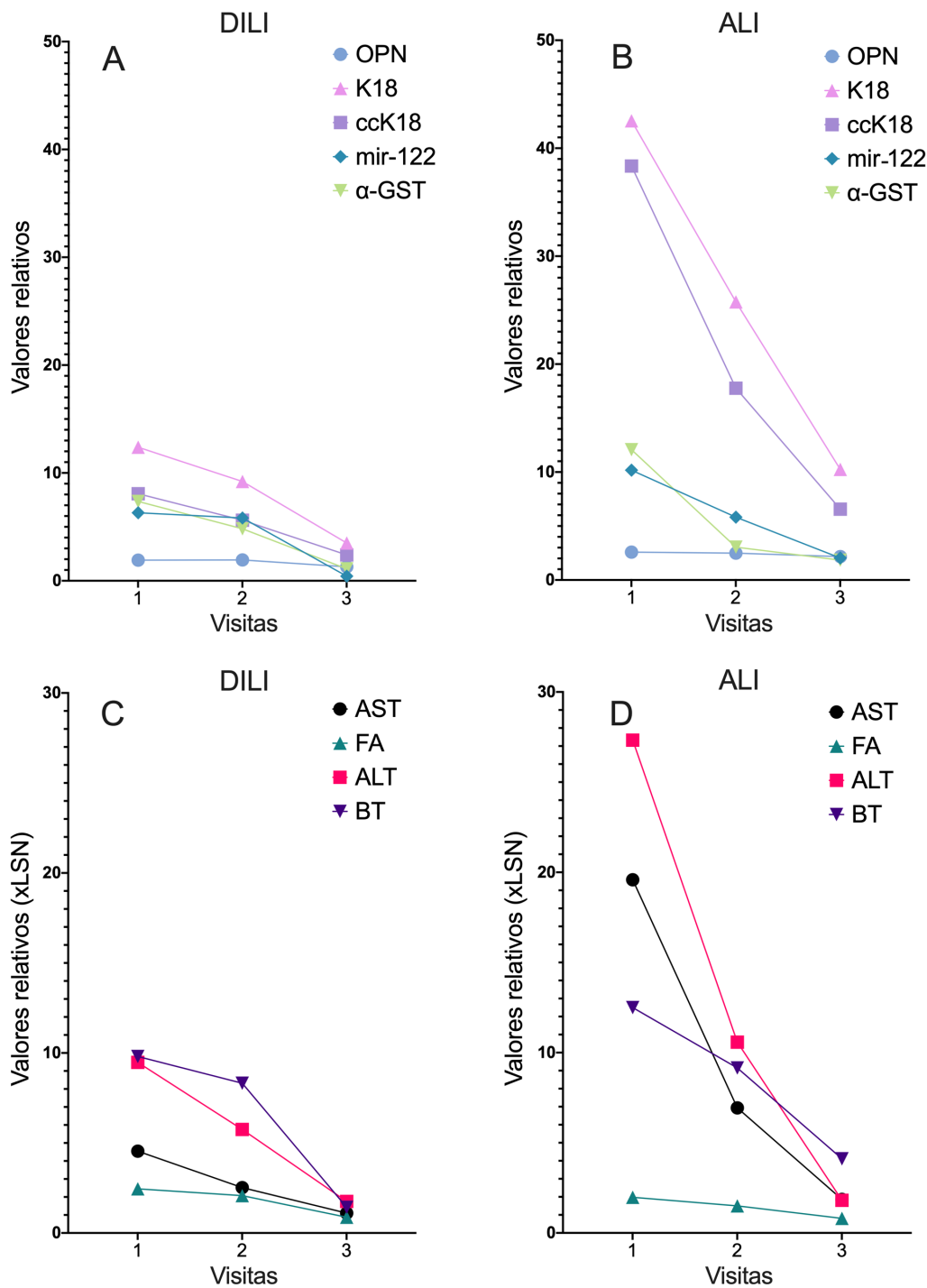


Figura 6. Progresión de los biomarcadores a lo largo del tiempo. (A) Valores relativos de los biomarcadores candidatos osteopontina (OPN), citoqueratina-18 total (K18), citoqueratina-18 escindida por caspasa (ccK18), α -glutación-S-transferasa (α -GST) y microARN-122 (miR-122) en la visita 1 (día de detección), 2 (7 días después de la detección) y 3 (>30 días después de la detección) en 32 pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI). (B) Valores relativos de (OPN, K18, ccK18, α -GST y miR-122 en las visitas 1, 2 y 3 en 34 pacientes con daño hepático agudo no DILI (ALI). (C) Valores relativos de los biomarcadores hepáticos tradicionales aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA) y bilirrubina total (BT) en las visitas 1, 2 y 3 en 32 pacientes con DILI. (D) Valores relativos de los biomarcadores hepáticos tradicionales AST, ALT, FA y BT en las visitas 1, 2 y 3 en 34 pacientes con ALI.

Potencial pronóstico

Para determinar el potencial pronóstico de los biomarcadores se compararon las AUC en la visita 1 entre los pacientes con DILI y ALI, que fallecieron o necesitaron un trasplante hepático (n=8, 1 paciente con DILI y 7 pacientes con ALI), y los que se recuperaron espontáneamente (n=58, 31 pacientes con DILI y 27 pacientes con ALI). El miR-122 no se incluyó en este estudio, ya que este biomarcador se analizó en una subpoblación más pequeña, la cual sólo incluía pacientes que se recuperaron espontáneamente. Además de K18, ccK18, OPN y α -GST, también se analizó el rendimiento de los biomarcadores convencionales de daño hepático como AST, ALT, BT e INR (Figura 7). El valor AUC más alto se observó para el INR (0.96), mientras que la ALT (0.49) y la α -GST (0.55) presentaron los potenciales pronósticos más bajos. Entre los biomarcadores candidatos, la OPN obtuvo el AUC más alto (0.86). Al comparar los AUC de la OPN e INR no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que la OPN es un biomarcador pronóstico prometedor para evaluar la gravedad del daño hepático.

Correlación entre los biomarcadores candidatos y los parámetros bioquímicos convencionales

El análisis de correlación entre los biomarcadores candidatos y los biomarcadores bioquímicos convencionales (AST, ALT, FA, BT, creatinina e INR) se determinó mediante el coeficiente de correlación de rangos de Spearman (Figura 3). Los biomarcadores miR-122, K18 y ccK18 mostraron una fuerte correlación con AST ($\rho=0.86-0.92$, $p<0.0001$) y ALT ($\rho=0.83-0.88$, $p<0.0001$). Del mismo modo, α -GST se correlacionó significativamente con AST y ALT, aunque la fuerza de las correlaciones fue más débil ($\rho=0.72-0.74$, $p<0.0001$) que la observada para miR-122, K18 y ccK18. Ninguno de los biomarcadores candidatos se correlacionó fuertemente con la FA. La correlación más alta se observó para miR-122 ($\rho=0.67$, $p<0.0001$). También se detectaron correlaciones significativas entre miR-122, K18, ccK18 y α -GST. Se detectaron correlaciones muy fuertes entre K18 y ccK18 ($\rho=0.94$, $p<0.0001$), así como entre miR-122 y K18 ($\rho=0.88$, $p<0.0001$) y ccK18 ($\rho=0.86$, $p<0.0001$). Las correlaciones entre α -GST y miR-122, K18 y ccK18 fueron ligeramente más débiles, pero aún significativas ($\rho=0.66-0.73$, $p<0.0001$). La OPN se diferenció de los demás biomarcadores candidatos en que no mostró correlaciones muy fuertes con ninguno de los demás biomarcadores, ni

candidatos ni convencionales. La correlación más fuerte se observó con el INR ($\rho=0.46$, $p<0.001$).

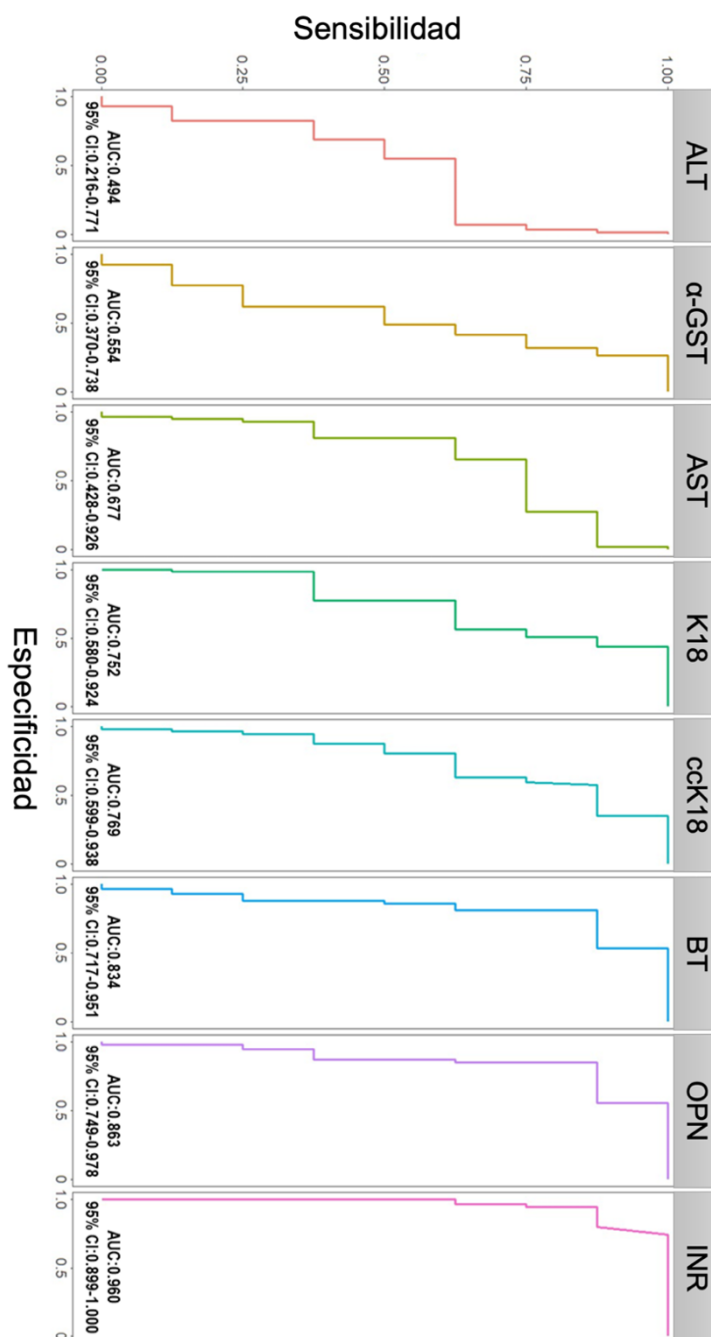


Figura 7. Evaluación del potencial pronóstico de los biomarcadores. Análisis de curva ROC para determinar el potencial de la osteopontina (OPN), citoqueratina-18 total (K18), citoqueratina-18 escindida por caspasa (ccK18) y α -glutación-S-transferasa (α -GST); biomarcadores hepáticos tradicionales aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA) y bilirrubina total (BT) y tiempo de protombina normalizado (INR). Los valores de los biomarcadores en el momento de la detección de la lesión hepática se compararon entre 8 pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI) y daño hepático agudo no DILI (ALI) que fallecieron o precisaron un trasplante de hígado y 58 pacientes con DILI y ALI que se recuperaron espontáneamente, y se calcularon las áreas bajo la curva ROC (AUC) y 95% de intervalo de confianza (IC) para determinar el potencial pronóstico de cada biomarcador.

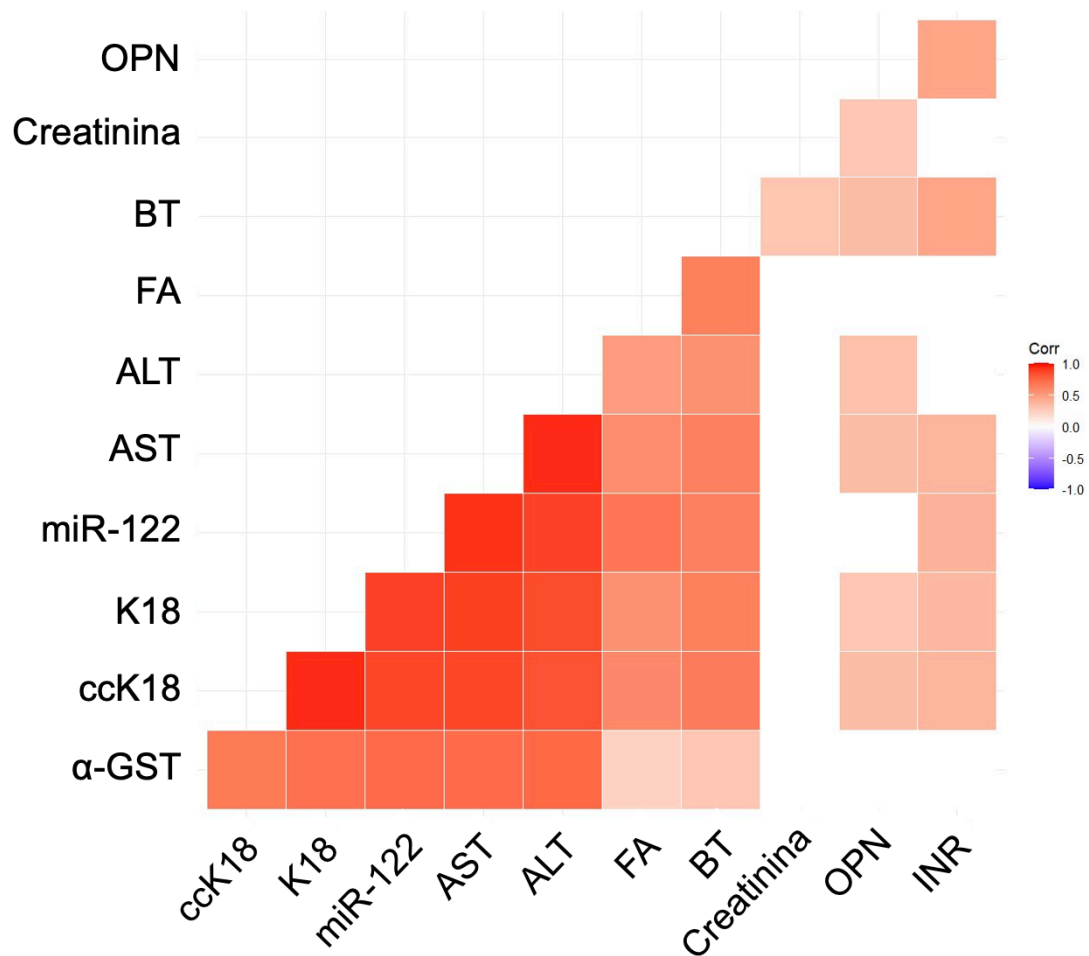


Figura 8. Mapa de calor de correlación de Spearman. Se muestran los resultados de los biomarcadores candidatos osteopontina (OPN), citoqueratina-18 total (K18), citoqueratina-18 escindida por caspasas (ccK18), α -glutación-S-transferasa (α -GST) y microARN-122 (miR-122) y los biomarcadores convencionales, incluidos la aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA) y bilirrubina total (BT), creatinina y el tiempo de protombina normalizado (INR) en la visita 1. El color rojo indica correlación positiva y el azul correlación negativa. Las correlaciones no significativas se indican en color blanco.

DISCUSIÓN

Este estudio evaluó el rendimiento de un panel de biomarcadores candidatos previamente identificados ¹²⁰, para determinar su potencial diagnóstico y pronóstico en el DILI. Los biomarcadores utilizados convencionalmente para analizar el perfil hepático son capaces de identificar diferentes afecciones hepáticas, incluido el DILI, pero no son capaces de distinguirlo específicamente. Por lo tanto, es muy importante incluir otros grupos con lesiones hepáticas agudas no relacionadas con DILI a la hora de probar nuevos biomarcadores candidatos, pudiendo así determinar la detección de DILI de forma más específica. Este aspecto se ha abordado en este estudio, ya que se ha comparado el rendimiento de los biomarcadores tanto en DILI como en otras etiologías hepáticas y controles sin alteraciones del perfil hepático. Esto ha permitido determinar perfiles específicos de estos biomarcadores según la etiología. Esta comparación es un aspecto importante que hasta la fecha se ha pasado por alto en muchos estudios en los cuales se han evaluado biomarcadores.

Los resultados confirman los hallazgos de Church *et al* ya que todos los biomarcadores candidatos analizados fueron capaces de distinguir entre DILI y HLC (AUC >0.75). Sin embargo, mientras en este estudio se encontró que la mayor AUC fue para miR-122, seguido de ccK18 y K18, en el estudio de Church *et al* se obtuvo el mayor valor de AUC para la ccK18, seguido de K18 y miR-122. Es posible que las diferencias en los resultados de los estudios se deban a variaciones en la cohorte, los agentes causales del DILI y la proporción de lesiones hepáticas de tipo hepatocelular, colestásico y mixto. Además, miR-122 se analizó en una subpoblación más pequeña en este estudio y para su análisis se utilizó una técnica diferente a la empleada por Church *et al* ¹²⁰.

En cuanto a la diferenciación entre DILI y otras lesiones hepáticas, los biomarcadores candidatos evaluados mostraron una limitada capacidad discriminativa. Las dos formas de la citoqueratina-18, ccK18 y K18, presentaron los mayores valores de AUC, siendo similares al obtenido para la ALT. La similitud con la ALT en los análisis ROC puede explicarse por la fuerte correlación positiva que se observó entre ccK18, y K18, con ALT. La K18 y la ccK18 se liberan al torrente sanguíneo durante la necrosis y la apoptosis, respectivamente, y pueden acumularse con el tiempo resultando en niveles incrementados en el torrente sanguíneo, de forma similar a lo que ocurre con la ALT cuando se rompe la membrana celular ¹⁵⁹. El hecho de que ccK18, K18 y ALT fueran capaces de distinguir entre DILI y ALI con un valor de AUC de alrededor de 0.75 debe interpretarse con

precaución, ya que esto puede deberse a que los pacientes con ALI tenían en general valores de ALT más altos al inicio del episodio. Sin embargo, esto no es inusual cuando se comparan los valores tempranos de ALT durante otros tipos de daño hepático agudo como VH y AIH con los de pacientes con DILI.

El potencial diagnóstico de ccK18, que presentó el valor AUC más alto al comparar DILI y ALI, se ilustra en el siguiente ejemplo. Donaghy *et al* informaron de que el 15% de los 881 pacientes con ictericia hepatocelular que acudieron a la clínica Jaundice Hotline tras ser remitidos por médicos de atención primaria eran casos de DILI ¹⁶⁰. Considerando una prevalencia de DILI del 15% en el entorno clínico de atención especializada junto con la especificidad y sensibilidad en el punto de corte óptimo para ccK18 basado en nuestro análisis, los valores predictivos positivo y negativo para DILI serían 0.430 y 0.935, respectivamente. Por lo tanto, en pacientes con ictericia y una prueba ccK18 positiva, la probabilidad previa a la prueba de un diagnóstico de DILI del 15% aumenta a una probabilidad posterior a la prueba del 43%. Curiosamente, se observó que la K18 y ccK18 distinguían mejor la AIH de la DILI que la VH de DILI. Esto podría estar relacionado con el hecho de que la diferencia en el valor medio de ALT era mayor entre la AIH y DILI que entre la VH y DILI. Otra explicación podría ser una mayor proporción de fibrosis en los pacientes con AIH que en los pacientes con VH. Aunque se consideró que todos los pacientes con AIH tenían un debut de la enfermedad, algunos pudieron haber tenido AIH no diagnosticada durante un periodo de tiempo indeterminado, lo que podría haber llevado a la aparición de fibrosis. Por lo que la proporción de casos con fibrosis puede haber sido mayor en los pacientes con AIH en comparación con los pacientes con VH aguda. La citoqueratina-18 sérica (tanto K18 como ccK18) se ha descrito en la progresión de la fibrosis hepática en pacientes con NASH ¹⁶¹. En la cohorte actual, el 44% de los pacientes con AIH presentaban fibrosis de diferentes grados comprobada mediante biopsia.

Los hallazgos de Church *et al* sugieren que la K18 y ccK18 podrían ser útiles para predecir el pronóstico de los pacientes con enfermedad hepática. Los niveles elevados de estas proteínas en una etapa temprana de la enfermedad pueden indicar un mayor riesgo de muerte o necesidad de trasplante de hígado en los pacientes ¹²⁰. Los resultados en el estudio actual fueron menos prometedores, con valores de AUC más bajos respecto al estudio de Church *et al*. Sin embargo, es posible que esto se deba a que la cohorte del estudio actual incluyó un número notablemente menor de pacientes con un peor

pronóstico, lo que podría haber llevado a que el "verdadero" potencial pronóstico de K18 y ccK18 no se reflejara con exactitud en el análisis.

Cabe señalar que las proteínas K18 y ccK18 no son específicas del hígado y que, por lo tanto, sus niveles séricos aumentan con afecciones que afectan a otros órganos, así como con diversos adenocarcinomas ¹⁶². A pesar de ello, K18 y ccK18 podrían ser potencialmente útiles para la detección temprana de DILI, especialmente durante el desarrollo de fármacos, basándose en el hecho de que las elevaciones séricas de la citoqueratina-18, en particular la proteína total, aparecen antes que la ALT en la lesión hepática inducida por acetaminofeno y, en consecuencia, es más sensible ¹⁶³. Estos biomarcadores candidatos también pueden proporcionar información sobre el mecanismo subyacente del DILI, ya que reflejan la muerte celular necrótica y apoptótica. Por lo tanto, estos biomarcadores candidatos, así como la OPN y los microARN, han sido aceptados en el Programa de Calificación de Biomarcadores de la Food and Drug Administration (FDA) de EEUU como parte del paquete de trabajo DILI del Consorcio *Translational Safety Biomarker Pipeline* (TransBioLine) ¹⁶⁴.

La α -GST y miR-122 presentaron un potencial menor para distinguir entre pacientes con DILI y ALI. Tal vez esto no sea demasiado sorprendente si se tiene en cuenta que se ha descrito que ambos aumentan en diferentes enfermedades hepáticas ^{157,165}. Sin embargo, es interesante señalar que también se ha descrito que ambos son más sensibles que ALT y AST y, por lo tanto, detectables en muestras de suero antes de las elevaciones de transaminasas. Además, proporcionan indicaciones más precisas de la progresión del daño hepático debido a que ambos tienen una vida media más corta ^{157,166}. El diseño del presente estudio no permitió determinar si α -GST y miR-122 aparecen antes de las elevaciones de transaminasas en pacientes con DILI y ALI. Sin embargo, esto podría ser una característica valiosa durante los ensayos clínicos en los que se realiza un estrecho seguimiento de los pacientes mientras están sometidos a nuevos tratamientos farmacológicos.

La OPN difería de los demás biomarcadores candidatos en este estudio en que tenía el menor potencial para diferenciar entre pacientes con DILI y ALI. Además, se observó que estaba débilmente correlacionada con las transaminasas ALT y AST, mientras que estaba más fuertemente correlacionada con el INR. Esto está en consonancia con propuestas anteriores de que la OPN tiene un potencial pronóstico en DILI y otras afecciones hepáticas ^{120,167}, lo cual también ha respaldado el análisis ROC realizado en

este estudio entre pacientes que se recuperaron espontáneamente y pacientes con desenlace fatal/trasplante hepático.

Aunque se ha demostrado que la OPN se detecta durante muchas enfermedades hepáticas, su función no se conoce del todo. Se cree que cuando se produce un daño hepático, las KC, y los linfocitos T, liberan OPN y otras citocinas que van a atraer neutrófilos y macrófagos. Esto genera un entorno inflamatorio que puede causar necrosis tisular y desempeña un papel importante en el desarrollo de la fibrosis hepática ¹⁶⁸. Otros estudios sugieren que el OPN podría desempeñar un importante papel regenerativo durante las respuestas inmunitarias. Esto se ve respaldado por un estudio sobre los niveles séricos de OPN en pacientes con FHF de diferentes etiologías, en el que se observó que los pacientes que sobrevivieron tenían de hecho niveles de OPN más elevados que aquellos que fallecieron o necesitaron un trasplante de hígado ¹³⁵. En cambio, en un estudio de 43 pacientes con FHF (de los que 28 fallecieron) y 45 pacientes con hepatitis aguda autolimitada, se observó que los niveles séricos de OPN eran significativamente más elevados en los que no sobrevivieron y que los pacientes con niveles de OPN más elevados en suero tenían un peor pronóstico. Los autores sugirieron que los niveles elevados de OPN en la FHF aguda reflejaban una regeneración más activa de las células madre hepáticas en comparación con la lesión hepática subaguda, y que la OPN puede estar asociada tanto a la activación celular inflamatoria como a la regeneración hepática ¹⁶⁹. El hecho de que se detectaran diferencias limitadas en la OPN entre DILI y ALI en el estudio actual puede sugerir similitudes en los mecanismos inmunitarios subyacentes en ambos grupos. Se necesitan más estudios para determinar el papel exacto de la OPN en la lesión hepática.

Una limitación de este estudio es el número relativamente pequeño de casos incluidos en los análisis. Para alcanzar la mayor potencia estadística posible, se optó por utilizar todos los casos en los análisis originales, a expensas de no disponer de una cohorte de validación independiente. Esto dio como resultado una buena potencia estadística (>90%) para ccK18, K18 así como ALT al comparar DILI y ALI en el análisis del rendimiento de los biomarcadores, pero una potencia estadística limitada para los resultados de los biomarcadores restantes (<80%). Además, el análisis de los subgrupos de ALI en comparación con DILI sólo mostró una elevada potencia estadística (>90%) para ccK18, K18 así como ALT cuando se comparó con AIH. Todos los biomarcadores candidatos comparados entre HV y DILI mostraron una potencia estadística menor (<80%). Del mismo modo, el potencial pronóstico que se ha obtenido de los biomarcadores candidatos

se basa en pocos casos con resultado de muerte/trasplante hepático, por lo que los resultados deben considerarse preliminares. No obstante, la potencia estadística fue notable (>90%) para BT, OPN, ccK18, K18 e INR, mientras que fue <80% para AST, ALT y α -GST. Por lo tanto, es importante tener en cuenta estas limitaciones al interpretar los resultados del estudio y se requiere de futuras investigaciones con un mayor número de pacientes para confirmar estos hallazgos.

Otra limitación de este estudio fue la heterogeneidad de la cohorte de ALI, que incluía diversas etiologías. Además, el grupo de ALI se asoció a una mayor gravedad que la detectada en los DILI (menor proporción de casos leves y moderados, y mayor proporción de casos graves y mortales/trasplante hepático). No obstante, estas diferencias también se han observado en un análisis reciente del registro ProEuroDILI. Este registro incluye actualmente más de 200 casos de DILI y 100 casos de ALI, con una tendencia similar de una mayor gravedad observada entre los casos de ALI ¹⁷⁰.

En resumen, este estudio evaluó el comportamiento de varios biomarcadores candidatos previamente identificados como nuevas herramientas potenciales en el diagnóstico y pronóstico del DILI. La inclusión de un grupo de daño hepático agudo no DILI ha permitido caracterizar mejor la especificidad de los biomarcadores candidatos. Los cinco biomarcadores evaluados (K18, ccK18, OPN, α -GST y miR-122) permitieron distinguir claramente a los pacientes con daño hepático de aquellos sin lesión. Sin embargo, tuvieron menos éxito a la hora de diferenciar entre DILI y ALI. La ccK18 fue el biomarcador con la mayor capacidad para distinguir entre DILI y ALI. Además, tanto ccK18 como K18 mostraron una alta capacidad para distinguir entre DILI y AIH, resultados prometedores que requieren confirmación en futuros estudios. Este estudio también corrobora los hallazgos previos de que la OPN tiene el mayor potencial pronóstico de los biomarcadores. No obstante, todos los biomarcadores candidatos evaluados en este estudio requieren de una mayor validación en grandes estudios independientes para determinar su verdadero potencial. Nuevos biomarcadores que permitan una detección y un pronóstico más eficientes de DILI no sólo facilitarán el manejo clínico de los casos, sino que también podrían mejorar la forma en que se supervisa la seguridad hepática durante el desarrollo de nuevos fármacos.



**Perfil linfocitario y expresión de los immune-checkpoints en el
daño hepático inducido por fármacos: Un estudio del
inmunofenotipado**



INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico es importante en el DILI⁵⁸, ya que los metabolitos del fármaco pueden actuar como haptenos y desencadenar la activación de linfocitos T. Aunque el hígado está diseñado para generar tolerancia inmunológica, la pérdida de esta tolerancia podría ser un factor clave en el desarrollo del DILI⁵⁷. De hecho, se han relacionado otras enfermedades hepáticas que también tienen problemas de tolerancia inmunológica como la AIH, la cirrosis biliar primaria y la colangitis esclerosante primaria¹⁷¹⁻¹⁷³.

Además de la presentación del antígeno a través de los complejos HLA, la generación de la activación de los linfocitos T depende igualmente de otras señales procedentes de los immune-checkpoints estimuladores e inhibidores que se unen a sus correspondientes ligandos (Figura 9). El CD28 es el receptor de membrana coestimulador más importante para la activación de los linfocitos T, que se une a los ligandos CD80 y CD86 presentes en las APC. Otro receptor coestimulador es ICOS (CD278) que, cuando se une a su ligando ICOS-L (CD275), proporciona señales estimulantes para la activación de los linfocitos T. A diferencia de CD28, ICOS es un receptor inducible y su efecto parece menos potente que el del CD28, aunque se cree que desempeña un papel complejo en la producción de anticuerpos con cambio de isotipo¹⁷⁴.

Los receptores CTLA-4 (CD152) y PD-1 (CD279) ejercen efectos inhibidores sobre la activación de los linfocitos T. El CTLA-4 compite con el CD28 por los mismos ligandos (CD80 y CD86) y se une con mayor afinidad, limitando la actividad de los linfocitos T. En cambio, PD-1 limita la actividad de los linfocitos T en los tejidos periféricos cuando se une a su ligando PD-L1. Los receptores CTLA-4 y PD-1 tienen efectos inhibitorios sobre la activación de los linfocitos T, pero CTLA-4 limita la actividad de los linfocitos T en una fase más temprana de la activación, mientras que PD-1 lo hace más tarde y en los tejidos periféricos.¹⁷⁵

Las variaciones en las poblaciones de leucocitos periféricos pueden indicar una respuesta inflamatoria o infección en el cuerpo, ya que diferentes tipos de leucocitos son movilizados a tejidos y órganos específicos para combatir la inflamación y facilitar la reparación tisular¹⁷⁶. La tasa de reclutamiento de leucocitos y la naturaleza de las células reclutadas en respuesta a las señales inflamatorias pueden determinar la gravedad de una enfermedad¹⁷⁷.

En este estudio, se propuso determinar la “huella inmunológica” de DILI mediante el análisis por citometría de flujo de la sangre periférica y compararla con la de otras formas

de daño hepático y con la de HLC. También se propuso determinar el nivel de leucocitos que presentan tanto receptores como ligandos de los immune-checkpoints, para corroborar que una respuesta inmunitaria adaptativa es fundamental en el desarrollo de DILI. Este estudio se corresponde con el objetivo 2 de este estudio doctoral: “*Estudio del papel del sistema inmune adaptativo en casos de DILI en comparación con casos de daño hepático agudo no DILI y controles con el hígado sano*”.

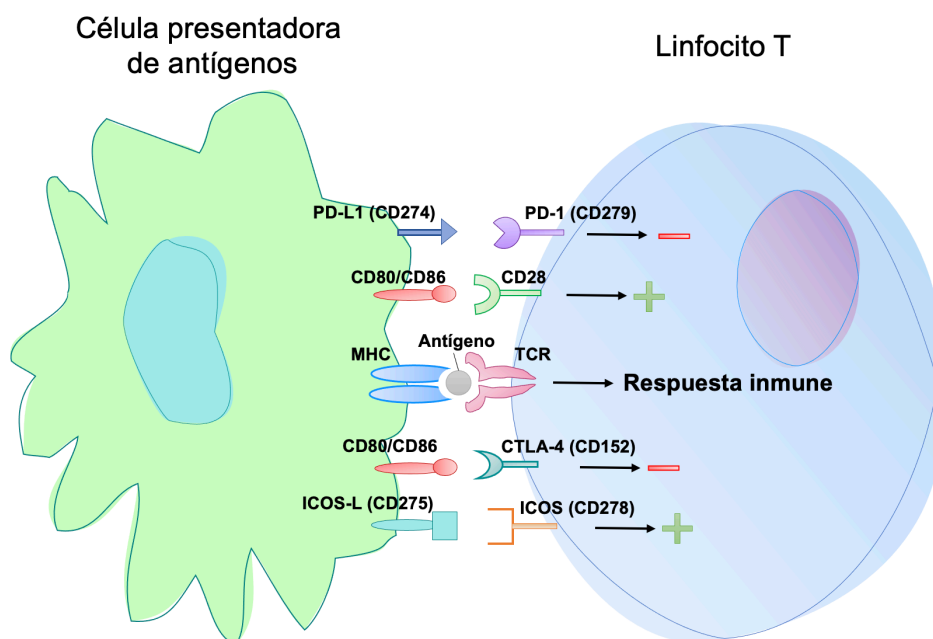


Figura 9. Presentación esquemática de los immune-checkpoints. Los antígenos unidos a las moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA) en las células presentadoras de antígenos son reconocidos por los receptores de los linfocitos T. Los receptores de los immune-checkpoints CD28 e ICOS (CD278), cuando se unen a sus ligandos CD80/CD86 e ICOS-L (CD275), proporcionan una señal coestimuladora para la activación de las células T. Por el contrario, CTLA-4 (CD152) y PD-1 (CD279) se unen a los ligandos CD80/86 y PD-L1 para ejercer una señal inhibidora, que limita la activación de los linfocitos T.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos y protocolo de estudio

Los casos de DILI agudo idiosincrásico se obtuvieron de los enviados al Registro Español de DILI; una red de colaboración establecida en 1994 para identificar prospectivamente los casos de DILI de forma estandarizada. Todos los pacientes con DILI cumplían al menos uno de los siguientes 3 criterios bioquímicos de DILI en el momento del reclutamiento del estudio: (i) $ALT \geq 5x \text{ LSN}$, (ii) $ALT \geq 3x \text{ LSN} + BT \geq 2x \text{ LSN}$, y (iii) $FA \geq 2x \text{ LSN}$ ²⁵. Se realizaron pruebas serológicas y bioquímicas para descartar lesiones

hepáticas por hepatitis víricas (VHA, VHB, VHC, VHE, CMV y VEB) y pruebas de imagen para descartar trastornos de la vía biliar. También se descartaron causas alternativas de lesión hepática, como AIH. Todos los casos presentados se evaluaron para determinar la causalidad inicialmente mediante una evaluación clínica y posteriormente aplicando la causalidad RUCAM. Los grupos de control de lesión hepática aguda VH, AIH y daño hepático agudo de etiología desconocida (UKE del inglés *unknown etiology*) utilizados en este estudio cumplían los mismos criterios bioquímicos de inclusión que los casos de DILI, mientras que los pacientes con NAFLD, con menores elevaciones del perfil hepático, se identificaron a partir de la detección de esteatosis en biopsias hepáticas y/o ecografías abdominales. El grupo VH estaba formado por pacientes infectados por VHA (46%), VHB (23%), VHC (7.7%), VHE (7.7%), CMV (7.7%) y VEB (7.7%). El grupo UKE estaba formado por casos de daño hepático agudo con sospecha inicial de DILI, pero que no pudieron ser diagnosticados con suficiente certeza en base a la información disponible. Los HLC presentaban un perfil hepático normal en el momento de la recogida de muestras y no habían sufrido previamente ningún episodio conocido de DILI. Este grupo estaba formado por empleados universitarios voluntarios que se sometieron a su examen médico anual en el Área de medicina del trabajo de la Universidad de Málaga en la Universidad de Málaga. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético local del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, España, y todos los sujetos aportaron su consentimiento informado.

Recogida y preparación de muestras

Se recogieron prospectivamente muestras de sangre seriadas de pacientes con DILI, VH, AIH y UKE a los días 1, 7 y ≥ 30 de la detección del daño hepático. En el caso de los pacientes con NAFLD y HLC, las muestras de sangre se extrajeron en una única visita. Tras la extracción, las muestras de sangre se marcaron inmediatamente con diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos específicos, y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se trataron con tampón de lisis (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) para eliminar los eritrocitos. Tras el lisado, las muestras se lavaron y se suspendieron en tampón fosfato salino (PBS del inglés *phosphate buffered saline*) antes del análisis mediante citometría de flujo. Debido a las dificultades para detectar las células que presentan receptores de membrana CTLA-4 extracelulares, la presencia de este immune-

checkpoint se determinó de forma intracelular. Por lo tanto, las células se trataron con una solución permeabilizante (Becton Dickinson), según las instrucciones del fabricante, antes de la tinción con anticuerpos monoclonales, de forma similar a Matsubara *et al*¹⁷⁸.

Citometría de flujo multiparamétrica

La citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro BD FACSVerser Universal Loader. Los datos obtenidos de las mediciones se recogieron y analizaron mediante el uso del software de análisis de citometría de flujo Kaluza (Beckman Coulter, Indianápolis, IN). Se realizaron “gatings” (o selecciones), basados en el tamaño y la complejidad celular, para seleccionar e identificar poblaciones específicas de linfocitos y monocitos. Posteriormente, las diferentes poblaciones de leucocitos se detectaron en función de la expresión de diferentes receptores de membrana específicos, como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Combinación de marcadores utilizados para analizar diferentes poblaciones de linfocitos. También se indican los marcadores utilizados para analizar las células que expresan los diferentes immune-checkpoints (receptores y ligandos) tanto en los linfocitos como en los monocitos.

Poblaciones linfocitarias	
Linfocitos T colaboradores	CD4+/CD45+
Naive	CD4+/CD45RO-/CD45+
Memoria	CD4+/CD45RO+/CD45+
Activados	CD4+/HLA-DR+/CD45+
Linfocitos T citotóxicos	CD8+/CD45+
Naive	CD8+/CD45RO-/CD45+
Memoria	CD8+/CD45RO+/CD45+
Activados	CD8+/HLA-DR+/CD45+
Células B	CD4-/CD20 + /CD45+
Linfocitos T reguladores	CD4+/CD25 ^{bright} /CD127 ^{dim} /CD45+
Células NK	CD3-/CD16+/CD56+/CD45+
Células NKT	CD3+/CD16+/CD56+/CD45+
Th1	CD4+/CD183+
Th2	CD4+/CD194+/CD196-
Th9	CD4+/CD194-/CD196+
Th17	CD4+/CD194+/CD196+
Th22	CD4+/CD194+/CD196+/CCR10+
CD28+	CD4+/CD28+
CTLA-4 (CD152)+*	CD4+/CD152+
ICOS (CD278)+	CD4+/CD278+
PD-1 (CD279)+	CD4+/CD279+
Poblaciones monocitarias	
CD80+	CD11b/Mac-1+/CD80+
CD86+	CD11b/Mac-1+/CD86+
ICOS-L (CD275)+	CD11b/Mac-1+/CD275+
PD-1L (CD274) +	CD11b/Mac-1+/CD274+

^a Intracelularmente tras la permeabilización.

Análisis estadístico

Se compararon los tamaños de las diferentes poblaciones de leucocitos entre los grupos de pacientes y de control mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, seguidas de un análisis post hoc mediante un test de Mann-Whitney. Todas las pruebas estadísticas fueron de hipótesis de dos colas con un nivel de significancia de 0.05. Debido a la naturaleza exploratoria del estudio, los valores p presentados no están corregidos y se consideró un error tipo I (α) de 0.05 para rechazar la prueba de hipótesis¹⁷⁹. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

Descripción de la cohorte del estudio

En este estudio, se analizaron muestras de sangre seriadas de 12 pacientes con DILI, 13 con VH, 9 con AIH y 15 con UKE y una única muestra de sangre de 20 pacientes con NAFLD. Además, se incluyeron 54 HLC sin ninguna afección hepática como grupo de control. La Tabla 6 muestra las características demográficas y clínicas de las poblaciones del estudio. La edad media variaba entre los 44 años del grupo de HV y los 58 años del grupo de AIH. Las mujeres predominaban entre los pacientes con DILI, AIH y HLC, mientras que los hombres eran más frecuentes entre los pacientes con VH, NAFLD y UKE. De los pacientes con DILI, el 83% desarrolló DILI debido a medicamentos convencionales y el 17% se asoció al uso de HDS. Con respecto a las elevaciones del perfil hepático, se observaron elevaciones importantes de ALT en los grupos VH, AIH y UKE, algo menores en el grupo DILI, y relativamente bajas en el grupo NAFLD. Del mismo modo, se detectaron elevaciones sustanciales de la BT en los grupos de AIH y UKE, mientras que las de los pacientes con DILI y HV eran menores, pero a su vez fueron mayores que las observadas en los pacientes con NAFLD. De los pacientes con NAFLD, se consideró que el 33% tenía un estadio de fibrosis F0, el 13% un estadio F1, el 6.7% un estadio F2, el 20% un estadio F3 y el 27% un estadio F4. La mayor proporción de casos de muerte/trasplante hepático se produjo entre los casos de AIH, seguidos por los de UKE, DILI y HV (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de los datos demográficos y las características clínicas entre los pacientes con DILI, VH, AIH, UKE, NAFLD y HLC.

	DILI N=12	VH N=13	AIH N=9	UKE N=15	NAFLD N=20	HLC N=54
Edad (años), media ±DE	55 ±15	44 ±20	57±19	55±24	53 ±13	50 ±11
Mujeres, %	58	31	67	40	40	59
IMC (kg/m²), media ±DE	23.8 ±5.6	24.5 ±4.0	26.9 ±5.2	24.9 ±2.8	30.4 ±3.8	24.6 ±4.3
Diabetes mellitus, %	17	23	0	13	N/D	3.8
Hipertensión, %	25	15	33	33	N/D	19
Características del episodio hepático , %						
Ictericia	58	62	100	67	0	N/A
Hospitalización	67	77	100	87	0	N/A
Tipo de daño, %						
Hepatocelular	55	62	100	53	N/A	N/A
Colestásico	36	15	0	20	N/A	N/A
Mixto	9.1	23	0	27	N/A	N/A
Parámetros de laboratorio en la visita 1 (media ± DE)						
BT, mg/dL	6.3 ± 7.1	7.4 ± 5.7	17 ± 9.1	9.5 ± 9.6	0.7 ±	0.6 ± 0.3
AST, UI/L	240 ± 217	671 ± 935	846 ± 534	638 ± 678	48 ±	24 ± 4.3
ALT, UI/L	417 ± 375	1279 ± 1615	906 ± 616	783 ± 734	79	22 ± 9.1
FA, UI/L	257 ± 197	240 ± 127	233 ± 169	237 ± 134	88	59 ± 12
Gravedad, %						
Leve	33	7.7	0	13	N/A	N/A
Moderado	58	85	67	60	N/A	N/A
Grave	0	0	11	6.7	N/A	N/A
Fatal o trasplante	8.3	7.7	22	20	N/A	N/A

ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; BT: bilirrubina total; DILI: daño hepático inducido por fármacos; FA: fosfatasa alcalina; HLC: controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI; IMC: índice de masa corporal; N/A: aplica; NAFLD: enfermedad de hígado graso no alcohólico; UKE: daño hepático agudo de etiología desconocida; VH: hepatitis viral.

Variaciones en las poblaciones de leucocitos

Se encontraron diferencias significativas en los recuentos de leucocitos ($p=0.0047$), neutrófilos ($p=0.004$) y monocitos ($p<0.0001$), pero no en los recuentos de linfocitos, entre los grupos (Tabla 7). Sin embargo, el grupo de DILI sólo se diferenció de los HLC ($p=0.037$) y de AIH ($p=0.023$) en el recuento de monocitos y de AIH ($p=0.0404$) en el recuento de leucocitos. La cohorte con resultados más llamativos fue la de la AIH, que tenía recuentos de leucocitos ($p=0.0027$), neutrófilos ($p=0.0006$) y monocitos ($p<0.0001$) significativamente mayores que los de los HLC.

Se comparó la proporción de poblaciones específicas de linfocitos entre los diferentes grupos de daño hepático y los HLC mediante citometría de flujo, y se evaluó la presencia de receptores y ligandos específicos de los immune-checkpoints, tanto en los linfocitos como en los monocitos de los diferentes grupos (Figura 10). En la Tabla 7 se presentan los porcentajes medios de cada una de las poblaciones celulares en los diferentes grupos de estudio en el día 1. Se encontraron proporciones similares de linfocitos T colaboradores (CD4+) en el día 1 en los diferentes grupos de estudio. Sin embargo, se detectaron diferencias en la proporción de linfocitos T colaboradores activados ($p=0.0003$), presentando el DILI una proporción significativamente mayor que los HLC (14% frente al 6.3%, $p<0.0001$) y el NAFLD (14% frente al 8.2%, $p=0.0150$). Además, los grupos VH (14% frente al 6.3%, $p=0.0031$) y NAFLD (8.2% frente al 6.3%, $p=0.031$) también presentaron una proporción de linfocitos T colaboradores activados significativamente mayor que los HLC. Sólo el grupo VH difería significativamente de los HLC (29% frente a 21%, $p=0.001$) en la proporción de linfocitos T citotóxicos totales (CD8+). Por el contrario, varios grupos presentaban un mayor nivel de linfocitos T citotóxicos activados en comparación con los HLC, entre los que se encontraba el DILI (31% frente al 15%, $p=0.0003$), VH (39% frente al 15%, $p<0.0001$) y AIH (32% frente al 15%, $p=0.0105$). Con respecto a las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores, las distribuciones de células Th1 ($p=0.0311$) y Th9 ($p=0.0026$) mostraron diferencias significativas. Se detectó un mayor nivel de células Th1 en DILI (52% frente a 42%, $p=0.0358$) y NAFLD (53% frente a 42%, $p=0.0062$) en comparación con los HLC. El grupo NAFLD también demostró un mayor nivel de Th9 (25% frente a 18%, $p=0.0267$), mientras que los grupos UKE y VH presentaron niveles inferiores a los HLC (13% frente a 18%, $p=0.0159$ y 13% frente a 18%, $p=0.0112$, respectivamente).

Tabla 7. Recuento absoluto y porcentaje de poblaciones de leucocitos en muestras de sangre periférica de pacientes con DILI, VH, AIH y UKE en el momento de la detección del daño hepático, en comparación con los pacientes con NAFLD y HLC, analizados por citometría de flujo.

	DILI n=12	VH n=13	AIH n=9	UKE n=15	NAFLD n=20	HLC n=54	<i>p</i>
Recuento de células, media (x10⁹/L) ±DE							
Leucocitos	6.5 ±3.0	7.0 ±2.9	9.2* [§] ±3.2	8.9* ±6.6	ND	5.9 ±1.8	0.0054
Linfocitos	1.6 ±0.7	2.3 ±1.7	1.5 ±0.5	1.8 ±1.1	ND	1.8 ±0.7	0.4295
Neutrófilos	4.2 ±2.2	3.7 ±2.2	6.5* ±2.9	6.1* ±6.5	ND	3.4 ±1.4	0.004
Monocitos	0.6* ±0.3	1.4* ±2.1	1.0* [§] ±0.3	0.8* ±0.4	ND	0.4 ±0.1	<0.0001
Poblaciones linfocitarias							
Linfocitos T colaboradores (% CD45)	43 ±11	42 ±13	44 ±6.0	43 ±11	43 ±8.6	46 ±7.2	0.8247
Naive (% CD4)	25 ±13	40 ±13	31 ±12	33 ±16	27 ±12	35 ±13	0.0719
Memoria (% CD4)	71 ±12	58 ±14	66 ±11	65 ±16	70 ±12	63 ±13	0.2851
Activados (% CD4)	14* ±8.8	14* ±8.2	9.8 ±4.6	9.5 ±7.5	8.2* [§] ±3.7	6.3 ±3.1	0.0003
Linfocitos T citotóxicos (% CD45)	24 ±9.9	29* ±9.6	22 ±7.4	25 ±10	19 ±7.1	21 ±5.5	0.0277
Naive (% CD8)	17 ±9.7	25 ±19	21 ±12	18 ±16	23 ±12	29 ±16	0.1015
Memoria (% CD8)	49 ±12	57 ±19	53 ±15	49 ±9	48 ±14	46 ±16	0.6656
Activados (% CD8)	31* ±14	39* ±24	32* ±17	27 ±21	22 ±15	15 ±10	0.0002
Linfocitos T reguladores (% CD4)	8.0 ±1.9	8.1 ±2.4	9.0 ±3.0	8.9 ±2.9	7.1 ±2.2	7.2 ±1.9	0.1275
Th1 (% CD4)	52* ±13	44 ±11	44 ±7.9	41 ±13	53* ±14	42 ±11	0.0311
Th2 (% CD4)	9.5 ±4.0	14 ±5.4	12 ±6.5	13 ±5.3	11 ±4.4	12 ±4.9	0.3997
Th9 (% CD4)	20 ±7.5	13* ±6.1	19 ±7.1	13* ±5.1	25* ±11	18 ±5.5	0.0026
Th17 (% CD4)	13 ±5.6	14 ±5.3	19 ±9.5	14 ±4.9	16 ±6.6	13 ±4.4	0.5051
Th22 (% CD4)	3.2 ±1.6	3.3 ±2.2	4.4 ±2.8	4.3 ±2.4	4.0 ±1.4	4.4 ±1.8	0.4178
Células B (% CD45)	11 ±6.8	7.7 ±3.6	11 ±7.0	6.5* ±4.8	11 ±4.6	9.8 ±4.3	0.0197
Células NK (% CD45)	14 ±11	8.8 ±6.6	9.6 ±3.9	12 ±6.2	12 ±5.4	12 ±5.9	0.2834
Células NKT(% CD45)	0.5 ±0.5	1.4 ±1.5	0.6 ±0.3	0.6 ±1.0	0.5 ±0.8	0.6 ±0.8	0.1585

CD28+ (% CD4)	91 ±9.3	91 ±8.0	92 ±5.4	93 ±11	96 ±5.9	96 ±4.8	0.2230
ICOS+ (% CD4)	5.1 ±4.2	8.7* ±5.7	3.9* ±1.1	2.7 ±1.8	1.8 ±0.7	2.3 ±0.9	<0.0001
CTLA-4+ (% CD4)	28* ±8.0	30* ±15	38* ±8.7	24* ±11	18 [§] ±4.6	18 ±6.2	<0.0001
PD-1+ (% CD4)	13 ±8.5	23* ±11	15 ±7.2	12 ±7.7	10 ±5.9	9.3 ±5.2	0.0131
Poblaciones monocitarias							
CD80+ (% CD11b)	7.9 ±3.3	10 ±6.3	12 ±8.6	13 ±8.5	10 ±5.8	9.2 ±4.4	0.6693
CD86+ (% CD11b)	9.5 ±5.1	9.5 ±2.3	9.1 ±5.3	11 ±3.9	12 ±3.5	11 ±3.5	0.2561
ICOS-L+ (% CD11b)	15 ±6.2	15 ±6.8	12 ±8.6	15 ±7.4	16 ±3.9	13 ±4.2	0.0797
PD-L1+ (% CD11b)	5.3* ±1.8	9.1* ±4.4	10* [§] ±5.2	8.1* ±5.6	5.0* ±1.3	3.9 ±1.8	<0.0001

AIH: hepatitis autoinmune; DILI: daño hepático inducido por fármacos; HLC: controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI; NAFLD: enfermedad de hígado graso no alcohólico; UKE: daño hepático agudo de etiología desconocida; VH: hepatitis viral.

**Diferencias estadísticamente significativas con HLC ($p < 0.05$).*

§Diferencias estadísticamente significativas con DILI ($p < 0.05$).

También se encontraron variaciones en la proporción de linfocitos B, pero sólo los UKE mostraron diferencias significativas frente a los HLC (6.5% frente a 9.8%, $p=0.0014$). No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio para ninguna de las demás poblaciones de linfocitos. Los niveles observados en las diferentes poblaciones leucocitarias que se ha mencionado se aproximaron a los niveles detectados en el grupo HLC, en las visitas posteriores a los días 7 y ≥ 30 como se ilustra en la Figura 11. Únicamente los linfocitos Th1 en el DILI mostraron un descenso medio menos evidente en la última visita. No obstante, la diferencia de las células Th1 en la última visita, entre los DILI y los HLC, no fue estadísticamente significativa.

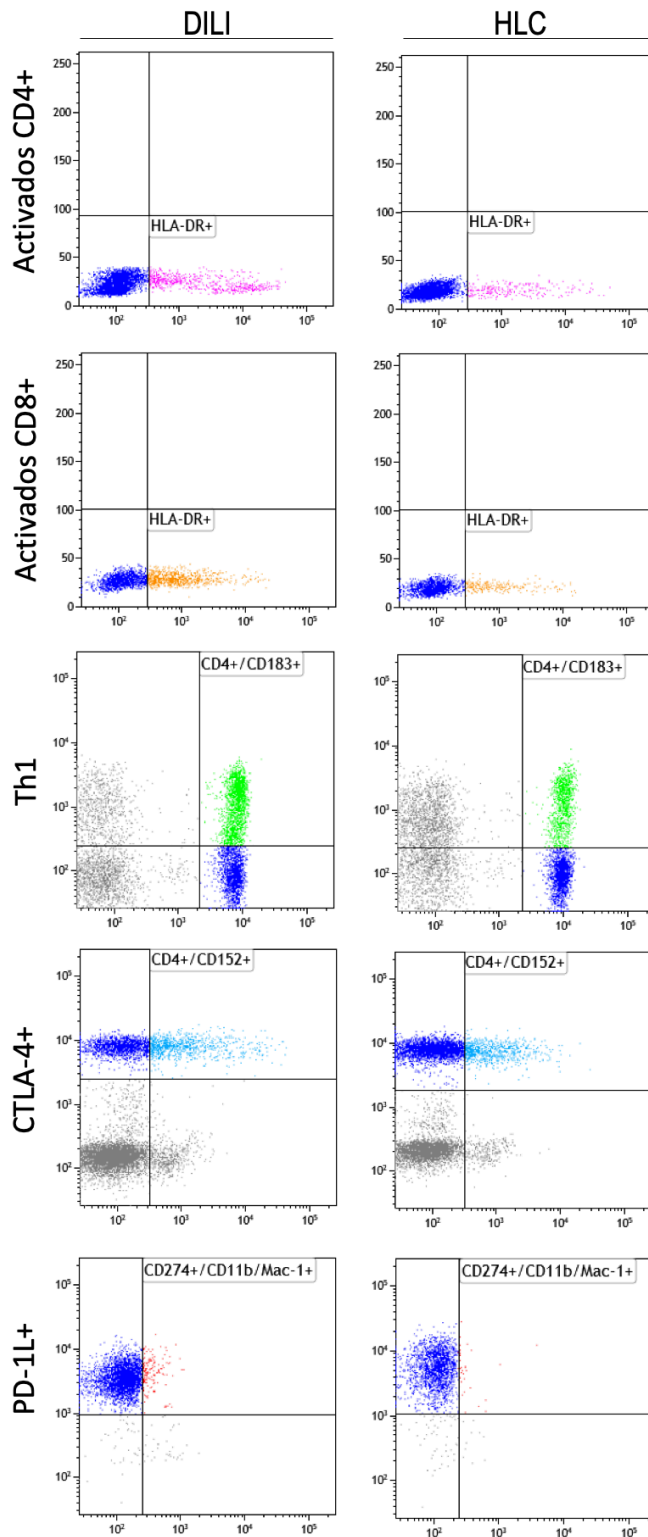


Figura 10. Comparación de los resultados de la citometría de flujo de un caso representativo de daño hepático inducido por fármacos (DILI) y de un control con el hígado sano sin antecedentes de DILI (HLC). Las poblaciones de linfocitos T colaboradores activados, linfocitos T citotóxicos activados, Th1, linfocitos T colaboradores que presentan CTLA-4 y monocitos que presentan PD-1L, resultaron ser significativamente mayores en la cohorte de DILI.

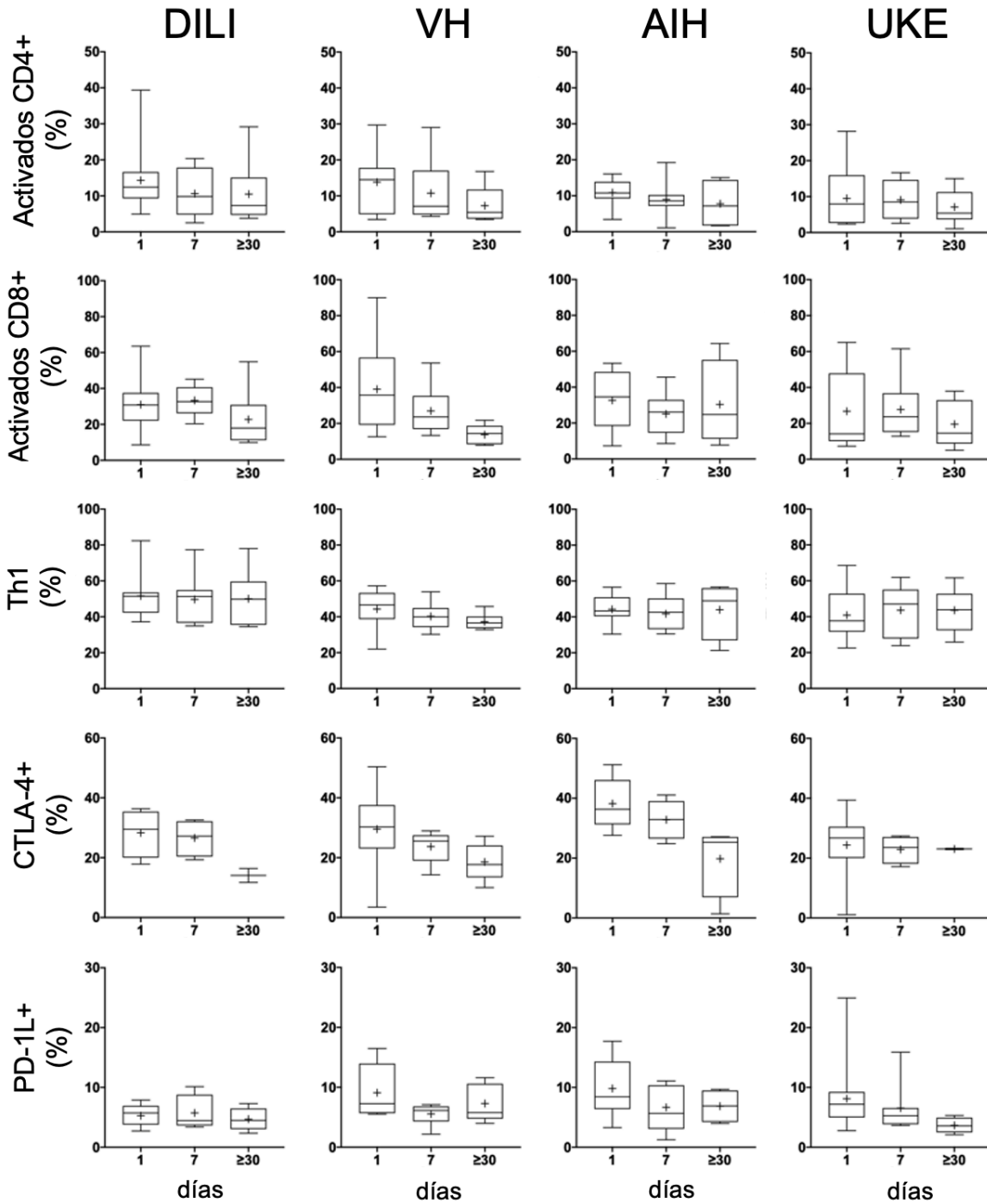


Figura 11. Estudio longitudinal de las poblaciones leucocitarias que mostraron diferencias significativas. Se muestran los resultados para los grupos de daño hepático inducido por fármacos (DILI), hepatitis viral (VH), hepatitis autoinmune (AIH) y daño hepático agudo de etiología desconocida (UKE). La mediana se representa como la línea horizontal dentro del diagrama de caja y la media como el signo +. La parte superior y la inferior del diagrama representan los percentiles 75 y 25, respectivamente.

Variaciones en los immune-checkpoints

También se determinó el nivel de receptores y ligandos de los immune-checkpoints en los linfocitos T colaboradores y en los monocitos activados, respectivamente, para demostrar una posible respuesta inmunitaria adaptativa (Tabla 7). En cuanto a los immune-checkpoints coestimuladores, para las células CD28+, no se detectaron diferencias entre ninguno de los grupos de pacientes y los HLC, lo que es coherente con la expresión constitutiva de este receptor. Sin embargo, se detectaron niveles significativamente mayores de linfocitos T ICOS+ en el grupo VH (8.7% frente a 2.3%, $p<0.0001$) y en AIH (3.9% frente a 2.3%, $p=0.0001$). El nivel de linfocitos T ICOS+ en el DILI fue superior al de los HLC (5.1% frente a 2.3%), pero no llegó a mostrar diferencias estadísticamente significativas. En lo que respecta a los immune-checkpoints coinhibidores, se encontraron diferencias significativas en el nivel intracelular de CTLA-4 entre los grupos de estudio ($p<0.0001$). El nivel de CTLA-4 fue significativamente mayor en DILI que en HLC (28% frente a 18%, $p=0.0192$), y que en NAFLD (28% frente a 18%, $p=0.0227$). Del mismo modo, los grupos VH (30% frente al 18%, $p=0.0068$), AIH (38% frente al 18%, $p<0.0001$) y UKE (24% frente al 18%, $p=0.0120$) mostraron un mayor nivel de CTLA-4 en comparación con los HLC. No se detectaron diferencias significativas en el nivel del receptor PD-1 entre los DILI y los HLC. Sólo los VH presentaron un nivel de PD-1 significativamente mayor que los HLC (23% frente a 9.3%, $p=0.0005$).

En cuanto a los immune-checkpoints evaluados que se detectan en los monocitos activados, sólo el nivel de PD-L1 difería entre los grupos ($p<0.0001$). Todos los subgrupos presentaron un mayor nivel de expresión de PD-L1 que los HLC (DILI: 5.3% frente a 3.9%, $p=0.0452$; HV: 9.1% frente a 3.9%, $p<0.0001$; AIH: 10% frente a 3.9%, $p=0.0004$; UKE: 8.1% frente a 3.9%, $p<0.0001$; y NAFLD: 5.0% frente a 3.9%, $p=0.0104$). Además, el aumento de la expresión en los casos de AIH fue ligeramente significativo en comparación con los DILI (10% frente al 5.3%, $p=0.0418$).

DISCUSIÓN

La citometría de flujo permite caracterizar las poblaciones de linfocitos (inmunofenotipado) en muestras celulares complejas, como la sangre periférica. Dado que la infiltración de linfocitos en el hígado se produce durante muchas enfermedades, el inmunofenotipado de la sangre periférica podría reflejar los cambios relacionados con la inmunidad asociados a una condición específica. En este estudio, se analizaron las poblaciones generales de linfocitos (principales subconjuntos celulares de linfocitos funcionales), y la expresión de marcadores celulares implicados en la regulación de la respuesta inmunitaria (immune-checkpoints), en el DILI en comparación con otras afecciones hepáticas no inducidas por fármacos y con controles sanos, para apoyar la implicación de una respuesta inmunitaria adaptativa en el desarrollo de la enfermedad. La proporción de linfocitos T colaboradores activados (CD4+/HLA-DR+) y de linfocitos T citotóxicos activados (CD8+/HLA-DR+) aumentó significativamente en una fase temprana del DILI, y aún más en los casos de VH en comparación con los HLC. A diferencia de otros marcadores de activación, el HLA-DR+ se considera un marcador de activación tardía ¹⁸⁰. Esto sugiere el inicio de la activación de los linfocitos T en el DILI antes de la detección de la enfermedad, lo cual está en consonancia con una respuesta inmunitaria adaptativa. Las moléculas HLA-DR+ se expresan de forma constitutiva en los linfocitos B y en las APCs, pero también se ha demostrado que lo pueden expresar los linfocitos T activados ¹⁸¹. Además, también se ha observado la expresión de HLA-DR+ en diferentes subpoblaciones de linfocitos T reguladores (Treg) con actividad supresora, los cuales desempeñan una función importante en el mantenimiento de la autotolerancia y en la prevención de la autoinmunidad ¹⁸². En el presente estudio, aunque no se determinó la presencia de HLA-DR en los linfocitos Treg, es poco probable que el aumento significativo de células CD4+/HLA-DR+ hallado corresponda a los linfocitos Treg inmunosupresores, ya que el nivel de Treg no difirió del observado en el grupo HLC. Además, los niveles de células CD4+/HLA-DR+ fueron notablemente superiores a la proporción de Treg. Esto apunta a un papel activo tanto de los linfocitos T CD4+ como de los CD8+ en el desarrollo de DILI, y está en consonancia con hallazgos anteriores de ensayos basados modelos celulares ^{59,183}. Sorprendentemente, se detectó un aumento de los linfocitos Th1, un linaje de linfocitos T CD4+ efectores, en los pacientes con DILI en comparación con los pacientes con VH. La razón detrás de esto no está clara, pero podría

incluir diferencias en la liberación de citocinas entre las dos condiciones y la posterior polarización de las células T.

Se podría plantear la hipótesis de que la tendencia a un menor recuento de linfocitos y un menor nivel de activación de los linfocitos T en el DILI en comparación con la VH (aunque no alcance significación estadística), podría indicar que la respuesta de los linfocitos T en DILI es oligoclonal, mientras que las infecciones virales con diversos antígenos inmunógenos suelen dar lugar a una respuesta policlonal de los linfocitos T. Si el fármaco causante forma un neoantígeno mediante haptenización con un péptido endógeno único, es probable que se produzca una respuesta de células T monoclonal/oligoclonal. Sin embargo, actualmente no se dispone de información sobre los repertorios de receptores de células T Vbeta implicados en DILI.

También se observó un aumento de la proporción de linfocitos T colaboradoras que expresan el receptor costimulador ICOS en DILI, aunque el aumento no fue estadísticamente significativo. ICOS se expresa débilmente en las células T naive y se regula rápidamente en los linfocitos T colaboradores y citotóxicos activados ¹⁷⁴. Por lo tanto, el aumento del nivel de ICOS en DILI está en consonancia con la activación de las células T y con una respuesta inmunitaria adaptativa, similar a la que se produce en el grupo de VH.

Se detectó un aumento del nivel de PD-L1 en los monocitos en todos los grupos de pacientes, incluido el DILI, mientras que el aumento de PD-1 en los linfocitos T fue más evidente en los pacientes con VH. El nivel de PD-1 aumenta durante la fase sintomática de la hepatitis vírica aguda y disminuye después de la recuperación ¹⁸⁴. La regulación transitoria de PD-1 y PD-L1 también se produce durante otras formas de infecciones agudas y se cree que es una forma de regular la tolerancia periférica ¹⁸⁵. Es probable que esto sea lo que está ocurriendo en el DILI. El aumento del nivel de PD-1 detectado también se asocia con el agotamiento de los linfocitos T (deterioro de la proliferación y la función efectora), pero esto ocurre generalmente durante la infección/inflamación persistente. Sin embargo, la disminución de los niveles de PD-1 a lo largo del tiempo observada en este estudio sugiere que esta regulación se relaciona con la tolerancia periférica en lugar del agotamiento de los linfocitos T.

El CTLA-4 se cuantificó intracelularmente, ya que sufre una rápida internalización. De hecho, Qureshi *et al* demostraron que el 80% del CTLA-4 unido a la membrana se internalizaba en 5 minutos y que este proceso no cambia durante la activación de las células T, como se creía inicialmente ¹⁸⁶. Sin embargo, se sabe que la expresión transitoria

de CTLA-4 en la superficie celular aumenta en los linfocitos T CD4+ durante la fase temprana de las respuestas de los linfocitos T. El aumento de CTLA-4 intracelular detectado en los DILI (así como en los grupos HV, AIH y UKE) podría indicar una acumulación de la expresión de CTLA-4 desde el inicio de la respuesta inmunitaria, asumiendo que la expresión del receptor es superior a la degradación intracelular ¹⁸⁷. Por lo tanto, la disminución de los niveles intracelulares de CTLA-4 mientras el paciente se recupera del episodio de daño hepático podría reflejar la reducción de la presentación del antígeno y la subsiguiente activación de las células T, basándose en los hallazgos de los estudios *in vitro* de la estimulación del receptor de las células T ¹⁸⁸.

Este estudio ha proporcionado nueva información sobre el papel del sistema inmune en el DILI, pero no está exento de limitaciones. Es posible que el uso de muestras de sangre periférica no refleje plenamente las reacciones inmunitarias que tienen lugar en el hígado. El uso de tejido hepático sería sin duda más informativo, pero es menos factible de obtener, ya que raramente se realizan biopsias en pacientes con DILI que se recuperan sin mayores problemas. Además, las poblaciones utilizadas en este estudio son relativamente pequeñas y los resultados requieren una confirmación adicional en cohortes independientes.

En conclusión, este es, hasta donde se sabe, el primer estudio longitudinal que presenta datos sobre diferentes poblaciones de leucocitos en pacientes con DILI agudo idiosincrásico y pacientes con afecciones hepáticas adicionales. Los datos indican un aumento de los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados durante la fase aguda de DILI, que se aproximan a los valores normales a medida que se produce la normalización del perfil hepático. Estos datos apoyan la implicación de una respuesta inmune adaptativa en el DILI, en línea con las hipótesis previas. Una mejor comprensión del mecanismo subyacente del DILI permitirá el desarrollo de biomarcadores diagnósticos y pronósticos específicos, lo que facilitará la evaluación clínica y el manejo de esta enfermedad.

**Análisis de los niveles séricos de citocinas y quimiocinas en el
daño hepático inducido por fármacos y otras variedades de
daño hepático agudo**



INTRODUCCIÓN

Las citocinas son proteínas de pequeño tamaño que se encargan principalmente de la comunicación intercelular. Para llevar a cabo su función se liberan de forma extracelular, se unen en receptores localizados en otras células y producen una respuesta. Tienen un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria y pueden tener actividad tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Además, participan en otros procesos como por ejemplo la embriogénesis o en el desarrollo del cáncer.

Las citocinas se denominan quimiocinas cuando desarrollan quimiotaxis celular, activando y atrayendo diferentes tipos celulares leucocitarios hacia zonas donde se les necesitan. Las células detectan un gradiente de concentración de estas quimiocinas y son atraídas hacia la zona donde la concentración es mayor. Los receptores celulares para estas quimiocinas están acoplados a proteínas G en la membrana celular de los leucocitos. El papel de las citocinas en el DILI se plantea por la importancia de estas moléculas en la regulación de las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. Un estudio exploratorio realizado por Li *et al* analizó el perfil de citocinas en diferentes etiologías de que cursaron ALF, entre las cuales se encontraba DILI. Detectaron citocinas como IL-17 e IL-21 en los pacientes de DILI, aunque no encontraron diferencias significativas en los niveles entre los diferentes grupos analizados ¹⁸⁹. En otros estudios con DILI, han mostrado que existen aparentemente cambios en el perfil de citocinas periféricas, que podrían indicar su posible papel como biomarcadores del daño hepático ^{145,190}. La investigación de los niveles de citocinas podría contribuir a caracterizar los mecanismos iniciales de daño hepático e identificar si existe un patrón o “*huella de señalización inmunitaria*” característico en DILI frente a otras patologías hepáticas.

Por ello, el objetivo de este estudio fue analizar la utilidad como biomarcador los niveles de citocinas/quimiocinas pro y antiinflamatorias circulantes en pacientes DILI, frente tanto a otras patologías hepáticas como a HLC, y evaluar el papel que desempeñan en el mecanismo de DILI. Este estudio, junto con la realización del inmunofenotipado, ha servido para alcanzar la realización del objetivo 2 de este estudio doctoral: “*Estudio del papel del sistema inmune adaptativo en casos de DILI en comparación con casos de daño hepático agudo no DILI y controles con el hígado sano*”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos y protocolo de estudio

Los casos de DILI agudo idiosincrásico se obtuvieron a partir de los remitidos al Registro Español de DILI, una red de colaboración establecida en 1994 para identificar prospectivamente los casos de DILI de forma estandarizada. Los criterios bioquímicos de DILI en el momento de la inclusión de los pacientes en el estudio fueron: $ALT \geq 5 \times LSN$ o $ALT \geq 3 \times LSN + BT \geq 2 \times LSN$ o $FA \geq 2 \times LSN$ ²⁵. Se realizaron pruebas serológicas y bioquímicas para descartar lesiones hepáticas por hepatitis víricas (VHA, VHB, VHC, VHE, VMC y VEB) y pruebas de imagen para descartar trastornos de la vía biliar. También se descartaron causas alternativas de lesión hepática, como la AIH. Todos los casos presentados fueron evaluados para determinar la causalidad, inicialmente mediante una evaluación clínica y posteriormente aplicando la escala de causalidad RUCAM. Los grupos de control de la lesión hepática, VH y AIH utilizados en este estudio cumplía los mismos criterios bioquímicos de inclusión que los casos de DILI. La gravedad de la lesión hepática en los dos grupos de pacientes se evaluó utilizando el índice de gravedad definido por Aithal *et al*²⁵. Los HLC presentaban un perfil hepático normal en el momento de la recogida de muestras y no habían sufrido previamente ningún episodio conocido de DILI. Este grupo estaba formado por empleados universitarios voluntarios que se sometieron a su examen médico anual en el "Área de medicina del trabajo de la Universidad de Málaga", en la Universidad de Málaga. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético local del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, España, y todos los sujetos dieron su consentimiento informado.

Recogida de muestras

Se recogió una muestra de sangre de los pacientes con DILI, VH y AIH en el momento de la detección del daño. De igual forma, se recogió una muestra de sangre en una única visita de los HLC. Tras la extracción de la muestra de sangre en tubos BD Vacutainer de suero con gel separador, se centrifugó a 2000 g durante 15 minutos a 4°C, se prepararon alícuotas en criotubos y se almacenaron a -80 °C, hasta la realización de los análisis.

Ensayo Luminex

La evaluación de las citocinas se realizó mediante inmunoensayo multiplex con la tecnología de Luminex xMAP Procartaplex (ThermoFisher, Waltham, MA). Se diseñó un panel compuesto de 17 citocinas y quimiocinas diferentes: GM-CSF, INF-gamma, IL-1 beta, IL-12p70, IL-13, IL-18, IL-4, TNF-alfa, IL-10, Eotaxina, GRO-alfa, IL-8, MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1beta, RANTES y SDF-1alfa. Todos los valores obtenidos se normalizaron con respecto a los controles HLC.

Análisis estadístico

Para realizar los análisis únicamente se consideraron aquellas citocinas/quimiocinas que se detectaron en >60% de las muestras. Los niveles obtenidos de las diferentes citocinas y quimiocinas se compararon entre los grupos de pacientes y control mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, seguidas de un análisis post-hoc de comparaciones múltiples de Dunn. Todas las pruebas estadísticas fueron de hipótesis de dos colas con un nivel de significancia de 0.05. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

Descripción de la cohorte del estudio

En este estudio se analizaron muestras de sangre de 25 pacientes de DILI, 20 de VH, 8 de AIH y 27 HLC. La edad media de los pacientes con DILI fue de 48 años y el 40% eran mujeres. La mayoría de los casos de DILI fueron causados por medicamentos convencionales (88%), principalmente antibióticos. Los grupos VH y AIH tenían una edad media de 46 y 54 años, y el 42 y 75%. eran mujeres, respectivamente. Además, los grupos VH y AIH mostraron mayores niveles de AST y ALT que los DILI. En los tres grupos DILI, VH y AIH el tipo de patrón de daño predominante fue el hepatocelular (61%, 71% y 100%, respectivamente). Las características clínicas y demográficas de la población total del estudio se muestran en la Tabla 10.

Cambios en los perfiles de citocinas y quimiocinas

En este estudio, se analizaron los niveles de 17 citocinas y quimiocinas en pacientes DILI, VH, AIH y HLC. Solo 6 de las 17 citocinas/quimiocinas (MIP-1beta, RANTES, SDF-1alfa, IL-18, Eotaxina y MCP-1) mostraron niveles detectables en >60% de las muestras. De estos MIP-1beta, RANTES, SDF-1alfa e IL-18, mostraron niveles significativamente diferentes entre los grupos de pacientes (Figura 17). Los niveles de MIP-1beta y RANTES fueron más altos en los DILI en comparación con los HLC (1.55 veces frente a 1, $p=0.0011$; 1.97 veces frente a 1, $p=0.0001$, respectivamente), y los niveles de MIP-1beta fueron también más altos en los pacientes VH y AIH en comparación con los controles (2.04 veces frente a 1; $p<0.0001$; 2.48 veces frente a 1; $p<0.0001$). Sin embargo, los niveles de MIP-1beta fueron más bajos en los pacientes con DILI en comparación con aquellos con VH o AIH, pero solo siendo significativo frente a AIH (1.55 veces frente a 2.48 ; $p=0.0476$). No hubo diferencias significativas en los niveles de RANTES entre los pacientes con DILI, VH y AIH. Los niveles de SDF-1alfa fueron más altos en los pacientes con DILI, VH y AIH en comparación con los controles (1.35 veces frente a 1, $p=0.0210$; 1.97 veces frente a 1; $p<0.0001$; 1.76 veces frente a 1; $p=0.0002$, respectivamente), y también fueron más altos en los pacientes con VH en comparación con los pacientes con DILI (1.97 veces frente a 1.35; $p=0.0048$). Los niveles de IL-18 fueron más altos en los pacientes con DILI, VH y AIH en comparación con los controles (148.1 veces frente a 1, $p=0.0032$; 121.1 vs 1; $p<0.0001$; 193.2 vs 1; $p=0.0001$, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de Eotaxina y MCP-1 entre los grupos analizados.

Tabla 8. Comparación de datos demográficos y características clínicas entre pacientes con DILI, VH, AIH y HLC.

	DILI N=25	VH N=20	AIH N=8	HLC N=27
Edad (años), media ±DE	48 ±16	46 ±19	54 ±20	49 ±11
Mujeres, %	40	42	75	52
IMC (kg/m²), media ±DE	25.3 ±4.6	23.8 ±3.4	25.1 ±3.4	23.9 ±3.7
Diabetes mellitus, %	16	17	0	4
Hipertensión, %	20	18	38	0
Características del episodio hepático, %				
Ictericia	57	53	75	N/A
Hospitalización	68	73	100	N/A
Tipo de daño, %				
Hepatocelular	61	71	100	N/A
Colestásico	30	12	0	N/A
Mixto	9	18	0	N/A
Parámetros de laboratorio en la visita 1 (media ±DE)				
BT, mg/dL	8.0 ±12	9.3 ±8.22	17 ±11	0.6 ±0.3
AST, UI/L	192 ±186	889 ±1259	879 ±432	24 ±4.4
ALT, UI/L	411 ±340	1320 ±1518	1071 ± 475	23 ±8.6
FA, UI/L	214 ±186	210 ±101	152 ±31	52 ±13.7
Gravedad, %				
Leve	44	5	12	N/A
Moderado	48	65	25	N/A
Grave	4	20	38	N/A
Fatal o trasplante	4	10	25	N/A

AIH: hepatitis autoinmune; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; BT: bilirrubina total; DILI: daño hepático inducido por fármacos; FA: fosfatasa alcalina; HLC, controles con hígado sano; IMC: índice de masa corporal; N/A: aplica; VH: hepatitis viral.

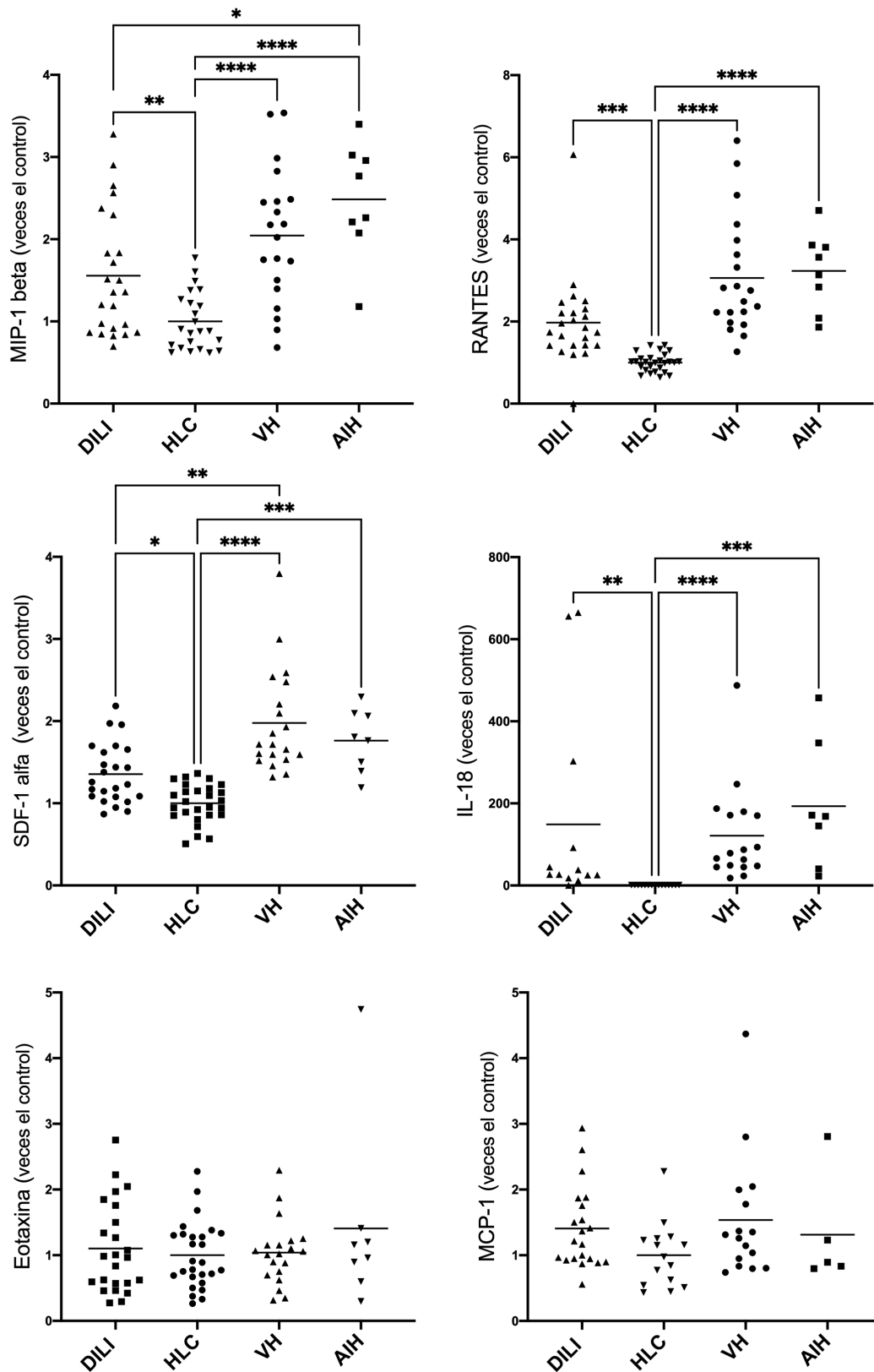


Figura 12. Niveles de las citocinas/quimiocinas MIP-1beta, RANTES, SDF-1alfa, IL-18, MCP-1 y Eotaxina detectadas en suero de pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI), hepatitis viral (VH), hepatitis autoinmune (AIH) y controles con el hígado sano (HLC). Análisis estadístico: Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

DISCUSIÓN

La implicación del sistema inmune innato y adaptativo en el DILI es cada vez más evidente. Las citocinas son moléculas que participan en la regulación de la respuesta inmune y son de gran importancia en el desarrollo de diferentes patologías. En el DILI, el perfil de citocinas en sangre periférica podría reflejar el estado inmunitario del hígado durante la lesión, aportando información del mecanismo fisiopatológico. Además, la búsqueda de un perfil específico de citocinas en sangre se ha planteado como posible biomarcador diagnóstico y pronóstico de DILI.

En este estudio se encontró que cuatro citocinas/quimiocinas (MIP-1beta, RANTES, SDF-1alfa e IL-18) mostraron niveles significativamente diferentes entre los grupos de pacientes. Los niveles de MIP-1beta fueron más altos en los pacientes con DILI en comparación con los HLC, pero más bajos en comparación con aquellos con VH o AIH. Estos resultados van en consonancia con los obtenidos en un estudio realizado por Bonkovsky *et al* en el cual se detectó un aumento de los niveles de MIP-1beta en los DILI frente a los controles, y también en un subgrupo de AIH y VH. MIP-1 beta, también conocida como CCL4, es una proteína inflamatoria que es liberada por células inmunes como macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Tiene dos funciones principales que son atraer a células inmunes hacia zonas con infección microbiana y promover la inflamación. Además, puede activar células NK y promover la liberación de otras citocinas proinflamatorias ¹⁹¹.

En este estudio se detectó un aumento en el nivel de RANTES en la sangre periférica en los casos de DILI en comparación con HLC, pero no en comparación con VH y AIH. Estos resultados difieren del estudio de Bonkovsky *et al* donde se observaron niveles más bajos de RANTES en todos los grupos con daño hepático en comparación con los controles sanos ¹⁹². Sin embargo, en otro estudio se mostró un aumento de los niveles séricos de RANTES tanto en pacientes DILI como en modelo de ratón de daño hepático agudo por APAP ¹⁹³. Las diferencias observadas entre el estudio actual y el de Bonkovsky *et al* podría deberse a las diferencias observadas entre los grupos de estudio. Los grupos de DILI analizados en el estudio de Bonkovsky *et al* tenían un mayor grado de daño celular, reflejado en los niveles más elevados de transaminasas, respecto al grupo DILI utilizado en este estudio actual. Además, cabe destacar que los autores vieron que los casos de DILI que tenían peor desenlace tenían los niveles más bajos de RANTES ¹⁹². Sin embargo, en el estudio presente no se ha podido hacer dicha comprobación por el

limitado número de casos con un desenlace grave. La quimiocina RANTES, en el hígado, cumple la función de reclutar y activar linfocitos T y NK cuando se produce un daño ^{194,195}. Los niveles de SDF-1alfa también fueron más altos en los pacientes con DILI, VH y AIH en comparación con los HLC, y también fueron más altos en los pacientes con VH en comparación con los pacientes con DILI. Esta quimiocina no se analizó en el estudio de Bonkovsky *et al* y hay pocos estudios donde hayan evaluado su nivel en patologías hepáticas. En modelos de ratón de daño hepático agudo por tetracloruro de carbono cuando se inyectaba una dosis de este compuesto se producía un incremento de los niveles de SDF-1alfa, la cual parece que va a participar en la regeneración hepática uniéndose a receptores presentes en las LSECs del hígado, y las cuales van a coordinar dicha regeneración ¹⁹⁶. Por lo que parece que SDF-1alfa podría desempeñar un papel regenerador en el DILI. Sin embargo, también se ha visto que está implicada en procesos de inflamación crónica y fibrosis, como se observa en la infección crónica de VHC y VHB ¹⁹⁷. Por lo que SDF-1alfa podría estar implicada tanto en la regeneración del tejido como en el desarrollo de diferentes condiciones patológicas ¹⁹⁸. Las elevaciones de estas tres quimiocinas en el DILI, al igual que en los otros grupos de daño, parecen indicar que desde el tejido hepático dañado se produce su liberación en la sangre, y reclutarán diferentes tipos celulares que serán decisivos en el desenlace de la enfermedad.

Además, se observó un incremento de los niveles de la citocina IL-18 en los pacientes con DILI, VH y AIH en comparación con HLC. Su papel en el daño hepático por fármacos se ha evaluado en modelos por APAP. Parece que la IL-18 podría desempeñar un papel perjudicial en el desarrollo del daño promoviendo la inflamación, ya que su neutralización produjo una mejora del daño. Además, los autores destacan un posible mecanismo de IL-18 incrementando la expresión de INF-gamma y FasL que son factores que empeoran el daño por APAP ¹⁹⁹.

A pesar de la gran sensibilidad de la técnica utilizada únicamente 6 citocinas/quimiocinas fueron detectadas en >60% de las muestras. Por lo que probablemente otras de las citocinas y quimiocinas analizadas en el panel pueden estar aumentadas en los casos de DILI pero no se ha podido detectar su presencia en este estudio. Esto es debido a que probablemente los niveles de estas citocinas y quimiocinas estén a muy bajas concentraciones en la sangre periférica dificultando en gran medida su detección. Cabe destacar también que las poblaciones utilizadas en este estudio son relativamente

pequeñas y los resultados requieren una confirmación adicional en cohortes independientes.

En conclusión, los niveles incrementados detectados de citocinas y quimiocinas en sangre periférica de los casos DILI en la fase aguda del daño, podrían reflejar un reclutamiento de células inmune de la periferia que participan en la progresión del daño. Sin embargo, en este estudio no se logró identificar un patrón específico de DILI que permita su utilización como biomarcador en la distinción frente a otras patologías hepáticas. A pesar de ello, los resultados obtenidos permiten esclarecer aún más el mecanismo patológico detrás de la enfermedad en la fase aguda del daño.



**Microbiota intestinal en pacientes con daño hepático inducido
por fármacos: un estudio exploratorio**



INTRODUCCIÓN

Las reacciones inmunitarias y el metabolismo de los fármacos son dos procesos que se consideran de fundamentales en el desarrollo del DILI ^{200,201}. La composición de la microbiota intestinal puede afectar a ambos procesos y, por lo tanto, podría tener un impacto en la susceptibilidad al DILI. La microbiota comensal es esencial para mantener el sistema inmunitario activo y de que éste tenga la capacidad de distinguir entre microorganismos "beneficiosos" y "perjudiciales". Es decir, es fundamental para el mantenimiento de la tolerancia a los antígenos inocuos al mismo tiempo que induce respuestas protectoras frente a los patógenos ²⁰². Además, varios estudios han demostrado que la microbiota puede modificar el metabolismo de los fármacos, ya sea actuando directamente sobre ellos o a través de la modulación de los mecanismos del huésped, como puede ser la alteración del nivel de expresión génica ⁹⁴.

Se cree que las variaciones en la composición de la microbiota intestinal contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo las relacionadas con el hígado ⁸³. El desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal, conocido como disbiosis, puede provocar permeabilidad intestinal y aumentar la translocación de productos microbianos al hígado a través de la vena porta, lo que puede conducir a un mayor estado inflamatorio del hígado y, en consecuencia, a una mayor susceptibilidad a DILI idiosincrásico ¹¹⁴.

A pesar de las observaciones que apoyan el papel importante de la microbiota intestinal en muchas afecciones hepáticas, las pruebas experimentales sobre su papel en el DILI idiosincrásico son limitadas. En este estudio se propuso realizar un análisis exploratorio sobre la composición de la microbiota en pacientes con DILI en comparación con pacientes ALI y con HLC. Correspondiendo con el objetivo 3 de este estudio doctoral: *“Estudio del papel de la microbiota intestinal en casos de DILI, en casos con daño hepático agudo no DILI y controles con el hígado sano”*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos y protocolo de estudio

Los casos de DILI agudo idiosincrásico se obtuvieron a partir de presentados al Registro Español de DILI, una red de colaboración establecida en 1994 para identificar prospectivamente los casos de DILI de forma estandarizada. Los criterios bioquímicos de

DILI en el momento de la inclusión de los pacientes en el estudio fueron: $ALT \geq 5x$ LSN o $ALT \geq 3x$ LSN + $BT \geq 2x$ LSN o $FA \geq 2x$ LSN²⁵. Se realizaron pruebas serológicas y bioquímicas para descartar lesiones hepáticas por hepatitis víricas (VHA, VHB, VHC, VHE, VMC y VEB) y pruebas de imagen para descartar trastornos de la vía biliar. También se descartaron causas alternativas de lesión hepática, como la AIH. Todos los casos presentados fueron evaluados para determinar la causalidad, inicialmente mediante una evaluación clínica y posteriormente aplicando la escala de causalidad RUCAM. El grupo de control ALI utilizado en este estudio cumplía los mismos criterios bioquímicos de inclusión que los casos de DILI. Este grupo corresponde a pacientes con una enfermedad hepática aguda no relacionada con los fármacos, incluyendo un 50% de VH, un 23% de AIH y un 27% de otras formas de lesión hepática aguda. La gravedad de la lesión hepática en los dos grupos de pacientes se evaluó utilizando el índice de gravedad definido por Aithal *et al.* Los HLC presentaban un perfil hepático normal en el momento de la recogida de muestras y no habían sufrido previamente ningún episodio conocido de DILI. Este grupo estaba formado por empleados universitarios voluntarios que se sometieron a su examen médico anual en el "Área de medicina del trabajo de la Universidad de Málaga", en la Universidad de Málaga. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético local del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, España, y todos los sujetos dieron su consentimiento informado.

Recogida y preparación de muestras

Las muestras fecales de DILI y ALI se obtuvieron al inicio del daño (en el plazo de una semana desde la detección del daño hepático). Además, se recogió una segunda muestra fecal en una fase posterior de la progresión de la enfermedad (>30 días desde la detección del daño hepático) de 10 pacientes con DILI y 9 con ALI. Las muestras fecales de HLC se recogieron en una única visita. Todos los participantes del estudio proporcionaron las muestras fecales en los tubos de muestra suministrados, que se mantuvieron a 4°C no más de 24 horas antes de ser enviadas a los investigadores del estudio en el hospital. Posteriormente, se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ADN.

Extracción de ADN

El ADN bacteriano total se extrajo y aisló utilizando el kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Sin embargo, se

incluyeron algunas modificaciones en el proceso para mejorar la extracción de ADN de bacterias difíciles de lisar según Nistal *et al* ²⁰³. Estas modificaciones incluyeron un paso inicial de homogeneización con perlas de granate de 0.7 mm y un aumento de la temperatura de lisis a 90°C. La concentración final de ADN se cuantificó mediante NanoDrop. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su secuenciación.

Preparación de librerías y secuenciación

La amplificación de la región hipervariable del ARNr 16S V3-V4 se llevó a cabo mediante el uso del oligonucleótido directo *16S V3 314F* (5'-TCGTCGCAGCGTCAGATGTGTAAGACAGCCTACGGNGGCWGCAG-3') y el oligonucleótido reverso *V4 805R* (5'GTCTCGTGGCTCGAGATGTGTAAGAGAGACGACTACHVGGTATCTAATCC3') con secuencias de nucleótidos del adaptador de Illumina añadidas. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 3 min a 95 °C, seguidos de 25 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C, y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Cada mezcla de reacción (25 µl) contenía 5 ng de ADN genómico, 0.5 µl de cebador directo de PCR de amplicón (0.2 µM), 0.5 µl de cebador inverso de PCR de amplicón (0.2 µM) y 12.5 µl de 2× KAPA Hifi HotStart Ready Mix (Roche, Basilea, Suiza). Seguidamente, se llevó a cabo la purificación de los productos de PCR mediante el uso de perlas AgencourtAMPure XP (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar el exceso de cebadores y dímeros de cebadores. Posteriormente, se realizó una segunda PCR de índice, utilizando 5 µl de cada amplicón como molde y se añadieron índices duales y adaptadores de secuenciación de Illumina a cada amplicón utilizando el kit Nextera XT Index v2 (Illumina Inc., San Diego, CA). Durante este paso, la amplificación se realizó en las siguientes condiciones: 3 min a 95 °C, seguido de 8 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C, y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Para continuar, las librerías metagenómicas 16S construidas se purificaron con perlas AMPure XP de Agencourt. La cuantificación de la librería, el control de calidad y la distribución del tamaño medio se determinaron con el Agilent TapeStation 4200. Las librerías se normalizaron y se agruparon a 40 nM basándose en los valores cuantificados. Las muestras agrupadas se desnaturalizaron y se diluyeron hasta una concentración final de 6pM con un control del 30% de PhiX (Illumina Inc., San Diego, CA). Finalmente, los

amplicones se sometieron a la secuenciación utilizando el kit de reactivos MiSeq V3 en el sistema MiSeq de Illumina.

Análisis bioinformático

Las muestras se analizaron utilizando la aplicación Illumina BaseSpace 16S Metagenomics v1.0.1.0 (<https://basespace.illumina.com/home/index>) para filtrar y ensamblar las secuencias brutas. Una vez filtradas, se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) utilizando el algoritmo UCLUST, con un umbral de similitud de 0.97. Con el fin de determinar la posición taxonómica bacteriana de cada OTU, las secuencias se alinearon con la base de datos de referencia 16S Greengenes (versión 13.8) utilizando parámetros predeterminados. Esta plataforma utiliza la versión curada por Illumina de la base de datos taxonómica GreenGenes y el clasificador RDP (Ribosomal Database Project) descrito por Wang *et al* ²⁰⁴. Además, se utilizó el software Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME versión 1.9.0) para verificar los resultados²⁰⁵. Las secuencias limpiadas se normalizaron a 10000 lecturas por muestra antes de ser analizadas.

Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas de las variaciones en la composición de la microbiota entre los diferentes grupos de estudio se realizaron utilizando el software STAMP v2.1.3 ²⁰⁶ y el software GraphPad Prism 9.0.2. Las diferencias en la composición bacteriana a distintos niveles taxonómicos entre los diferentes grupos de estudio se compararon mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, seguidas de análisis post-hoc utilizando el método de Tukey-Kramer con una corrección mediante el método FDR de Storey para comparaciones múltiples. La diversidad alfa se midió mediante el índice de riqueza de Chao1, el índice de diversidad de Simpson inverso y el índice de uniformidad de Simpson utilizando Mothur v1.44 ²⁰⁷. Los índices de riqueza, diversidad y uniformidad también se compararon entre los 3 grupos de estudio utilizando las pruebas de Kruskal-Wallis, seguidas de un análisis post-hoc utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. En cuanto a la β -diversidad, el análisis de componentes principales (PCA del inglés *principal component analysis*) se realizó utilizando la versión 4.0.5 de R (R Core Team 2021). Todas las pruebas estadísticas fueron de hipótesis de dos colas realizadas al nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS

Descripción de la cohorte del estudio

En este estudio se analizaron muestras fecales de 13 pacientes con DILI, 22 pacientes con ALI y 58 HLC. La Tabla 8 presenta las características demográficas y clínicas de las poblaciones del estudio. La edad media varió entre los 49 años del grupo de HLC y los 52 años del grupo de DILI y ALI. Las mujeres predominaban en el grupo de HLC, mientras que los hombres eran más frecuentes entre los pacientes con DILI y ALI. En cuanto a las elevaciones del perfil hepático, se observaron mayores elevaciones de ALT en el grupo de ALI que en el de DILI, pero con elevaciones de BT similares en los dos grupos. La mayoría de los pacientes con DILI y ALI sufrieron una lesión hepática leve o moderada con una recuperación completa, mientras que una pequeña proporción de pacientes de ambos grupos murió o requirió un trasplante de hígado como consecuencia directa del episodio hepático. De los pacientes con DILI, el 73% desarrolló la enfermedad debido al uso de medicamentos convencionales, mientras que el 27% se relacionó con el uso de HDS. Además, el 69% de los pacientes con DILI, el 50% de los pacientes con ALI y el 8.8% de los HLC habían recibido al menos un tratamiento con antibióticos en los 3 meses anteriores a la recogida de muestras.

Tabla 9. Comparación de datos demográficos y características clínicas entre pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI), daño hepático agudo no DILI (ALI) y controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI(HLC).

	DILI N=13	ALI N=22	HLC N=58
Edad (años), media ±DE	52 ±15	52 ±20	49 ±11
Mujeres, %	38	45	59
IMC (kg/m²), media ±DE	26.4 ±4.9	24.5 ±4.0	24.6 ±4.2
Diabetes mellitus, %	15	14	3.6
Hipertensión, %	23	23	18
Características del episodio hepático, %			
Ictericia	62	68	N/A
Hospitalización	85	82	N/A
Tipo de daño, %			
Hepatocelular	69	73	N/A
Colestásico	15	9.1	N/A
Mixto	15	18	N/A
Parámetros de laboratorio en la visita 1 (media ±DE)			
BT, mg/dL (media ±DE)	10 ±10	12 ±9.7	0.7 ±0.3
AST, UI/L (media ±DE)	287 ±248	674 ±669	25.7 ±4.4
ALT, UI/L (media ±DE)	503 ±354	1061 ±1191	21.8 ±6.4
FA, UI/L (media ±DE)	181 ±87	235 ±135	53.4 ±10.7
Gravedad, %			
Leve	38	14	N/A
Moderado	54	50	N/A
Grave	0	32	N/A
Fatal o trasplante	7.7	4.5	N/A

ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; BT: bilirrubina total; DE: desviación estándar; FA: fosfatasa alcalina; IMC: índice de masa corporal;

Análisis de la microbiota fecal

Se analizaron 112 muestras fecales mediante secuenciación del ADN bacteriano. De las 23 muestras de DILI, 13 se recogieron en una fase temprana del episodio hepático y 10 correspondieron a una segunda muestra recogida de los mismos pacientes en un momento posterior de la progresión de la enfermedad. Del mismo modo, 22 muestras correspondieron a pacientes con ALI en una fase temprana y 9 en una fase posterior. Se obtuvo una media de 164172 lecturas (rango: 44083 - 297766) por muestra.

Diversidad α

Los tres grupos diferían significativamente en la riqueza bacteriana fecal determinada mediante el índice de riqueza de Chao 1 ($p=0.0048$). Se observó una riqueza significativamente menor en el grupo DILI, en el momento del inicio del daño hepático, en comparación con el grupo HLC (122 frente a 154, $p=0.0072$). Del mismo modo, el grupo ALI presentó una riqueza menor que los HLC (128 frente a 154), aunque la diferencia no alcanzó significación estadística. La diversidad bacteriana (índice de diversidad de Simpson inverso) también presentó diferencias entre los tres grupos ($p=0.0112$). Se detectó una menor diversidad tanto en DILI como en ALI, pero sólo ALI mostró diferencias significativas en comparación con HLC (7.14 vs 9.61, $p=0.0281$). No se detectaron diferencias en la uniformidad (índice de uniformidad de Simpson) entre los tres grupos. En el caso de DILI, tanto la riqueza como la diversidad aumentaron en la segunda muestra, acercándose a los valores observados en HLC (Figura 12).

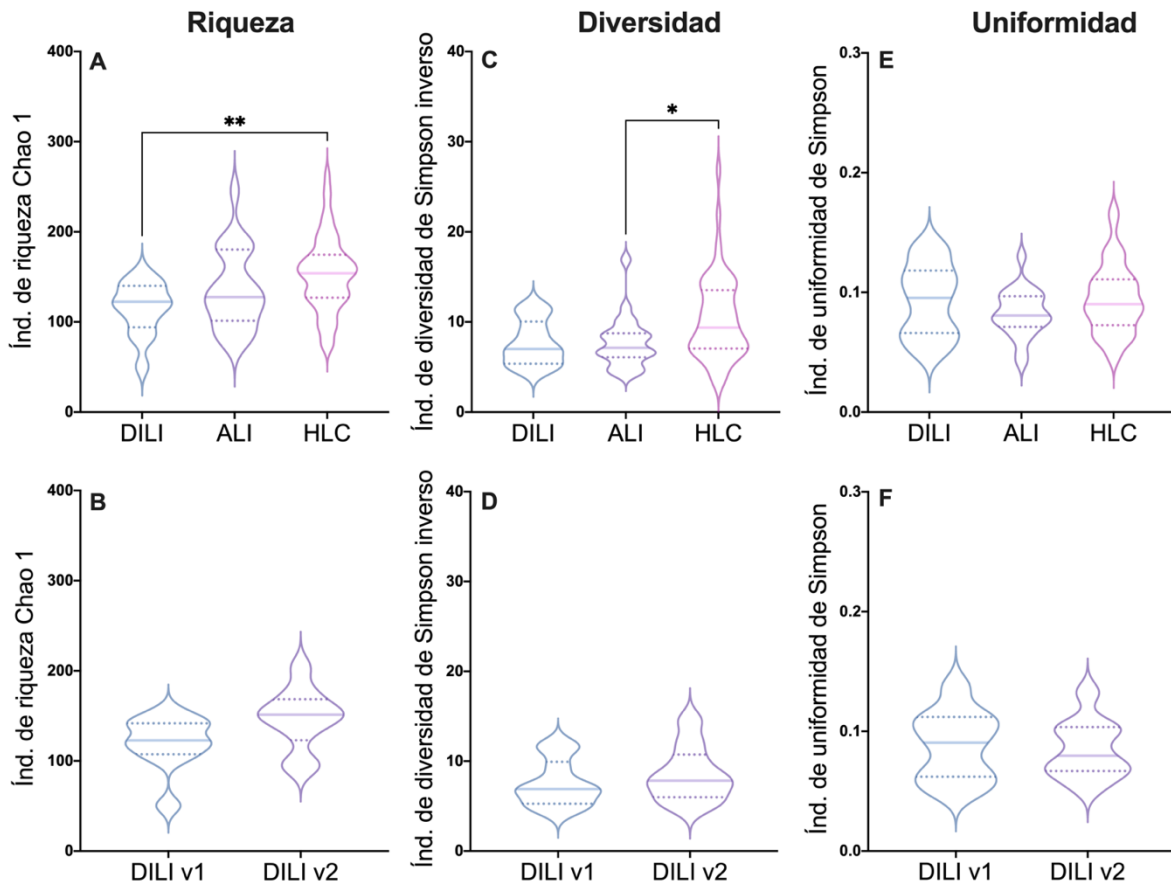


Figura 13. Comparación de la α -diversidad entre pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI), daño hepático agudo no DILI (ALI) y controles con hígado sano sin antecedentes de DILI (HLC). A. Índice de riqueza de Chao 1 en DILI y ALI en la visita 1 y HLC. B. Índice de riqueza de Chao 1 en DILI visita 1 y 2. C. Índice de diversidad Simpson inverso en DILI y ALI en la visita 1 y HLC. D. Índice de diversidad de Simpson inverso en DILI visita 1 y 2. E. Índice de uniformidad de Simpson en DILI y ALI en la visita 1 y HLC. F. Índice de uniformidad de Simpson en DILI en las visitas 1 y 2. Análisis estadístico: Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Para examinar los posibles efectos del tratamiento reciente con antibióticos, se compararon el índice de riqueza de Chao 1 y el índice de diversidad de Simpson inverso entre las muestras de la primera visita de 9 pacientes con DILI, que habían tomado antibióticos, y 4 pacientes con DILI que no los habían tomado. No se detectaron diferencias significativas ni en la riqueza ni en la diversidad, probablemente debido al limitado número de muestras. No obstante, los pacientes de DILI que tuvieron un tratamiento antibiótico reciente presentaron un índice de riqueza de Chao 1 ligeramente

inferior (122 frente a 125), así como un índice de diversidad de Simpson inverso más bajo (6.4 frente a 8.9).

La riqueza bacteriana también se analizó mediante diagramas de Venn a nivel de familias y géneros (Figura 13). Se encontró, que la primera muestra fecal de los pacientes con DILI contenía 103 familias, en comparación con 136 en los ALI y 181 en los HLC. Se identificó un conjunto de 84 familias que constituían la microbiota compartida entre los tres grupos. Se detectaron familias únicas en cada uno de los grupos, 7 en los DILI, 14 en los ALI y 51 en HLC. Además, se observó una tendencia similar a nivel de género, con un número total de 248 géneros en DILI, 346 en ALI y 524 en HLC, de los cuales 192 se detectaron en todos los grupos.

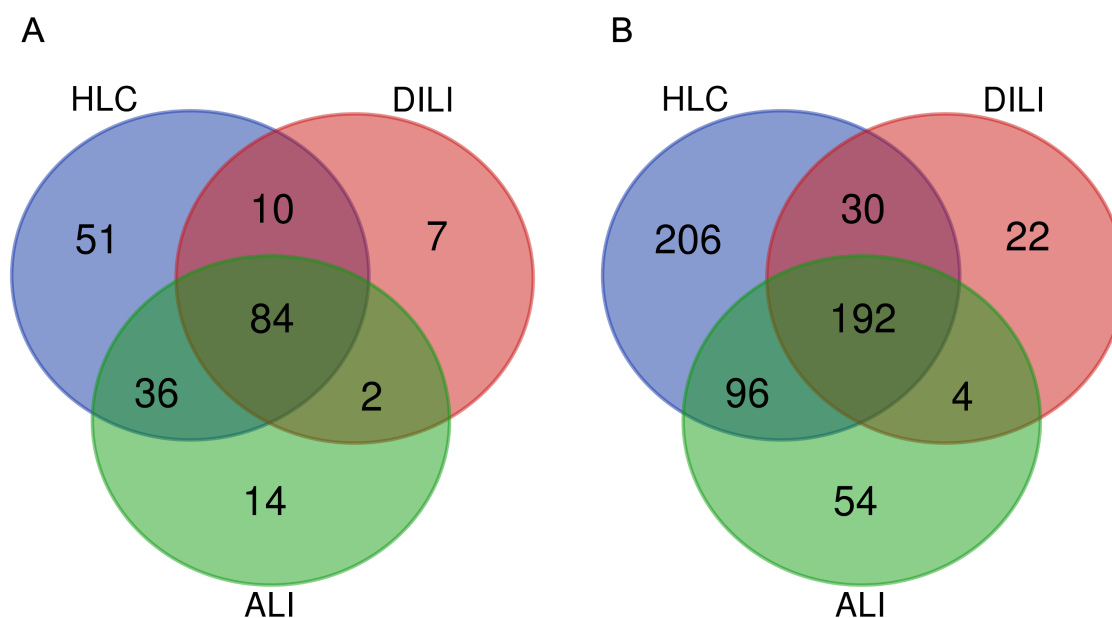


Figura 14. Diagrama de Venn que compara la microbiota fecal en pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI), daño hepático agudo no DILI (ALI) y controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI (HLC) a nivel de familia (A) y género (B).

Diversidad β

Un análisis de PCA de las principales 112 familias bacterianas (presentes en al menos el 10% de las tres cohortes del estudio) mostró que la diversidad total captada por los dos componentes superiores era del 11% y del 5.6%. Los tres grupos se solapaban de manera significativa y no se apreciaba una clara diferencia entre las comunidades bacterianas de los grupos DILI, ALI y HLC en ninguno de los ejes PC1 ni PC2 (Figura 14).

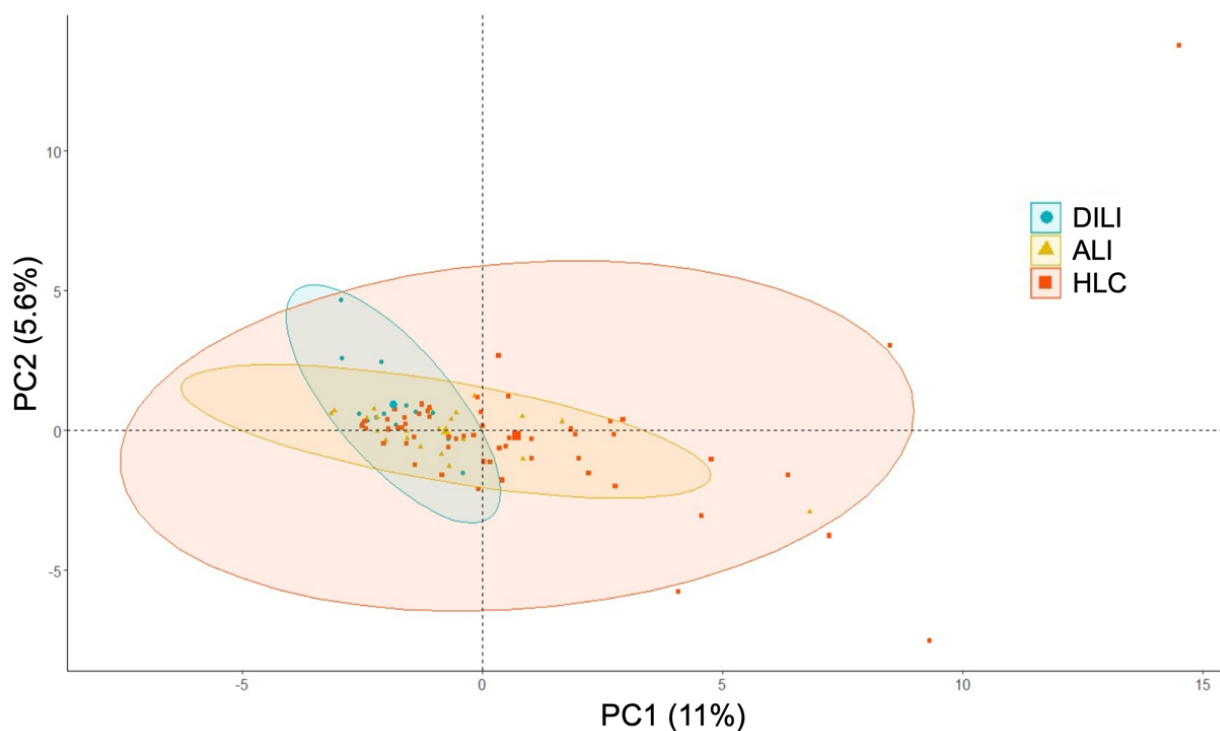


Figura 15. Gráfico de un análisis de componentes principales (PCA) del grupo de daño hepático inducido por fármacos (DILI), daño hepático aguda no DILI (ALI) y controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI (HLC).

En la Figura 15 se muestra una representación gráfica de la abundancia relativa de las principales familias bacterianas en los tres grupos de estudio. Se detectó una menor abundancia de Ruminococcaceae y Eubacteriaceae en DILI en comparación con HLC. Por el contrario, el grupo de DILI presentó una mayor abundancia de Veillonellaceae, Acidaminococcaceae y Streptococcaceae que el grupo de HLC. En los 10 pacientes con DILI de los que se recogieron dos muestras fecales, la abundancia de Ruminococcaceae y Eubacteriaceae aumentó en la segunda muestra, mientras que la de Veillonellaceae disminuyó.

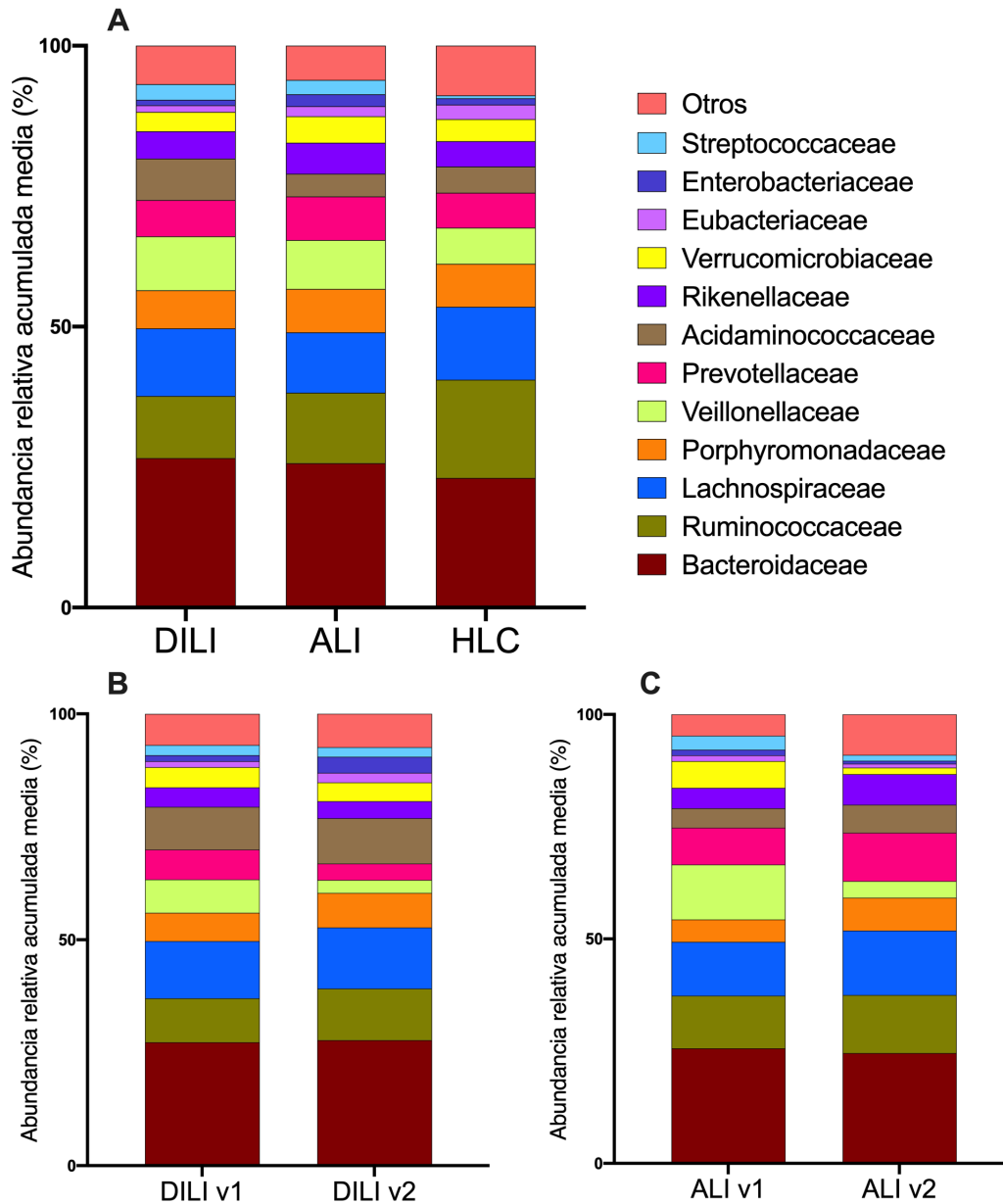


Figura 16. Abundancia relativa a nivel de familia. A. Composición de la microbiota que muestra las 12 familias más abundantes en muestras fecales de pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI) y daño hepático agudo no DILI (ALI) en la visita 1 y controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI (HLC). B. DILI en las visitas 1 y 2. C. ALI en las visitas 1 y 2.

A nivel de género, *Dialister*, *Gemmiger* y *Eubacterium* fueron menos abundantes en DILI en comparación con HLC. En cambio, *Bacteroides*, *Phascolarctobacterium*, *Veillonella* y *Roseburia* se detectaron con mayor frecuencia en DILI que en HLC (Figura 16). En las segundas muestras fecales de los pacientes con DILI, *Veillonella* y *Eubacterium* disminuyeron y aumentaron, respectivamente, acercándose a los niveles detectados en HLC.

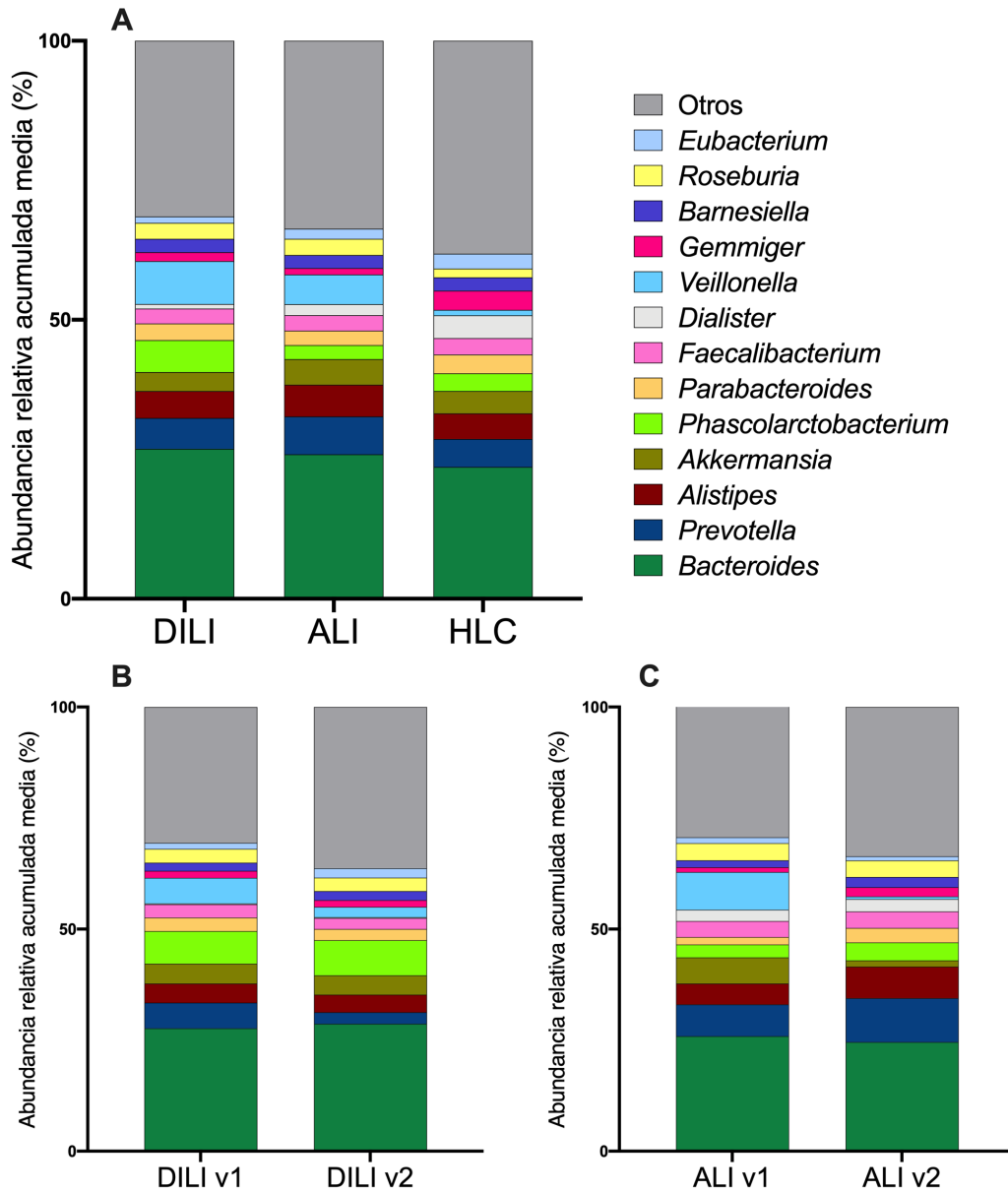


Figura 17. Abundancia relativa a nivel de género. A. Composición de la microbiota que muestra los 13 géneros más abundantes en las muestras fecales de pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI) y daño hepático agudo no DILI (ALI) en la visita 1 y controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI (HLC). B. DILI en las visitas 1 y 2. C. ALI en las visitas 1 y 2.

Al analizar la composición de la microbiota estadísticamente, se encontró que sólo dos de las principales familias detectadas en DILI diferían significativamente de las observadas en los HLC (Tabla 9). La familia Ruminococcaceae fue significativamente menos frecuente entre los pacientes con DILI (11% frente a 17%, $p < 0.02$), mientras que Streptococcaceae fue significativamente más frecuente en DILI (2.85% frente a 0.51%, $p < 0.01$). Además, se encontró que varias familias bacterianas menos abundantes ($< 1\%$

de la frecuencia relativa) fueron significativamente diferentes en el grupo de DILI. Campylobacteraceae fue significativamente más abundante en DILI en comparación con HLC (0.015% frente a 0.001%, $p<0.001$) y ALI (0.015% frente a 0.002%, $p<0.01$). Además, las familias Christensenellaceae (0.022% frente a 0.122%, $p<0.05$) y Clostridiaceae_3 (0% frente a 0.012%, $p<0.05$) fueron significativamente más abundantes en el grupo DILI que en el HLC.

A nivel de género, *Veillonella* (7.69% frente a 0.98%, $p<0,001$), *Streptococcus* (2.85% frente a 0.49%, $p<0.01$) y *Campylobacter* (0.016% frente a 0.001%, $p<0.001$) fueron significativamente más abundantes en DILI en comparación con HLC. *Campylobacter* fue significativamente también más frecuente en los pacientes DILI que en ALI (0.016% frente a 0.003%, $p<0.01$). Por el contrario, *Christensenella* (0.023% frente a 0.134%, $p<0.05$) y *Coprococcus* (0.19% frente a 0.82%, $p<0.01$) fueron significativamente menos abundantes en el grupo DILI que en el grupo HLC.

Tabla 10. Abundancia relativa media de familias y géneros bacterianos en muestras fecales de pacientes con daño hepático inducido por fármacos (DILI), daño hepático agudo no DILI (ALI) y controles con el hígado sano sin antecedentes de DILI (HLC).

	DILI	ALI	HLC	<i>p</i>
Familia (%)				
Acidaminococcaceae	7.322	4.050	4.725	0.390
Bacteroidaceae	26.41	25.65	23.20	0.369
Campylobacteraceae	0.015 ^{ab}	0.002	0.001	0.024
Christensenellaceae	0.022 ^a	0.059	0.122	0.013
Clostridiaceae_2	0.171	0.143	0.635	0.013
Clostridiaceae_3	0 ^a	0.008	0.012	0.021
Clostridiales_Incertae_Sedis_XIV	0.030	0.05 ^a	0.378	0.004
Enterobacteriaceae	1.031	2.116	1.113	0.459
Enterococcaceae	0.115	0.026	0.001	0.013
Eubacteriaceae	1.187	1.758	2.575	0.190
Lachnospiraceae	12.04	10.73	12.97	0.252
Porphyromonadaceae	6.896	7.673	7.660	0.390
Prevotellaceae	6.540	7.729	6.179	0.390

Rikenellaceae	4.830	5.587	4.460	0.439
Ruminococcaceae	11.01 ^a	12.38	17.48	0.013
Streptococcaceae	2.850 ^a	2.630	0.508	0.004
Veillonellaceae	9.560	8.790	6.383	0.390
Verrucomicrobiaceae	3.430	4.690	3.920	0.252
Género (%)				
<i>Akkermansia</i>	3.435	4.577	4	0.341
<i>Alistipes</i>	4.795	5.690	4.58	0.408
<i>Alkaliphilus</i>	0.151	0.142	0.658	0.039
<i>Bacteroides</i>	26.86	25.88	23.62	0.351
<i>Barnesiella</i>	2.38	2.36	2.36	0.378
<i>Campylobacter</i>	0.016 ^{ab}	0.003	0.001	0.040
<i>Christensenella</i>	0.023 ^a	0.056	0.134	0.027
<i>Clostridium_IV</i>	1.021	1.181	2.306	0.027
<i>Coprococcus</i>	0.190 ^a	0.486	0.819	0.006
<i>Dialister</i>	0.808	1.960	4.082	0.341
<i>Ethanoligenens</i>	0.004	0.008	0.035	0.027
<i>Eubacterium</i>	1.14	1.81	2.66	0.159
<i>Faecalibacterium</i>	2.66	2.765	2.949	0.416
<i>Fusicatenibacter</i>	0.458	0.358	1.062	0.039
<i>Gemmiger</i>	1.626	1.128	3.452	0.039
<i>Parabacteroides</i>	2.98	2.61	3.38	0.351
<i>Phascolarctobacterium</i>	5.70	2.49	3.15	0.351
<i>Prevotella</i>	5.545	6.791	5.02	0.359
<i>Roseburia</i>	2.866	2.885	1.592	0.213
<i>Streptococcus</i>	2.854 ^a	2,692	0.490	0.006
<i>Turicibacter</i>	0.002	0.003	0.080	0.014
<i>Veillonella</i>	7.687 ^a	5.327	0.980	0.027

^aDiferencias estadísticamente significativas comparado con HLC ($p < 0.05$)

^bDiferencias estadísticamente significativas comparado con ALI ($p < 0.05$)

DISCUSIÓN

Existe una creciente evidencia de la relación entre la composición de la microbiota intestinal y diversas enfermedades hepáticas, incluyendo el DILI idiosincrásico ¹¹³. Sin embargo, aún existen pocos estudios para confirmar esta hipótesis. En este estudio se comparó la composición de la microbiota fecal de pacientes con DILI con ALI y HLC, con el objetivo de explorar su posible papel en esta enfermedad. Con respecto a la diversidad α , se observó una reducción significativa de la riqueza en el grupo DILI, con una tendencia similar para la diversidad, a pesar de que la uniformidad observada fue similar a la del grupo HLC. De hecho, el grupo DILI presentó más similitudes con el grupo ALI que con el grupo HLC. Los resultados observados en ALI coinciden con hallazgos anteriores sobre la disminución de la diversidad α en varias afecciones hepáticas, incluidas VH y AIH ^{208,209}. Se ha observado una disminución en la diversidad de la microbiota intestinal como una característica común de la disbiosis relacionada con enfermedades, y cada vez hay más evidencia de su implicación en muchas afecciones hepáticas y autoinmunes ²¹⁰.

Las variaciones en la composición de la microbiota a nivel de familias y géneros específicos fueron menos evidentes en el grupo DILI. Esto podría deberse en cierta medida a la gran heterogeneidad en un grupo con un tamaño muestral relativamente pequeño. Además, en este estudio no se tuvieron en cuenta las diferencias que pueden estar asociadas a los hábitos alimentarios, lo cual se sabe que tienen un gran impacto en la composición de la microbiota. No obstante, se detectó una disminución significativa de Ruminococcaceae, que es una de las principales familias bacterianas implicadas en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA). Los SCFA están implicados en diferentes funciones que incluyen la regulación inmunitaria y la protección de los tejidos. Por lo tanto, cambios en las bacterias productoras de SCFA que conduzca a una alteración de su funcionalidad, podría favorecer la susceptibilidad a ciertas enfermedades. Respecto a esto, se ha observado una menor abundancia de esta familia en diversas patologías hepáticas incluyendo la enfermedad hepática alcohólica y el NAFLD, así como la progresión de la cirrosis ²¹¹⁻²¹³. En este estudio también se detectó en DILI un aumento significativo en la abundancia de Streptococcaceae, así como de Veillonellaceae y Acidaminococcaceae. Estas familias bacterianas incluyen patógenos oportunistas y su enriquecimiento en la microbiota intestinal normal puede estar asociado a un mayor riesgo de enfermedades. Curiosamente, se ha observado un aumento en la abundancia de

Streptococcaceae, Veillonellaceae y Acidaminocaceae asociado al consumo de IBP ²¹⁴. El uso de esta clase de fármacos se ha asociado con un mayor riesgo de afecciones autoinmunes, pero aún no se comprende el mecanismo subyacente ²¹⁵. Aunque el estudio mencionado no se centró específicamente en el daño hepático, destaca el hecho de que el uso de ciertos fármacos que alteran la microbiota comensal se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar distintas enfermedades. La microbiota y el sistema inmune mantienen una relación de homeostasis, en la que no mantener la integridad de la barrera intestinal puede aumentar las respuestas inmunitarias y generar un mayor estado inflamatorio.

Además, varios estudios han demostrado que existe una relación bidireccional entre la microbiota y los fármacos. Por un lado, la microbiota puede modificar el metabolismo de los fármacos directa o indirectamente. Por otro lado, los fármacos pueden modificar la composición de la microbiota intestinal ²¹⁶. Los antibióticos son probablemente la clase de fármacos que tiene el mayor impacto sobre la composición de la microbiota intestinal, aunque estos cambios suelen ser breves y revierten una vez que se suspende el tratamiento. En este estudio, una proporción considerable de los pacientes con DILI, y en menor medida con ALI, había recibido algún tipo de tratamiento antibiótico en los tres meses previos a la detección del daño hepático. Este hecho debe tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados, ya que el tratamiento podría haber contribuido a algunos de los cambios en la composición de la microbiota que se han detectado. De hecho, algunos de los resultados obtenidos son similares a los observados en un estudio anterior donde se evaluó el efecto de la exposición a los antibióticos en la microbiota intestinal de adultos sanos. En ese estudio, Palleja *et al* encontraron que varias especies dentro de la familia Ruminococcaceae disminuyeron en cantidad, mientras que las especies de la familia Veillonellaceae aumentaron, las cuales pueden actuar como patógenos oportunistas ²¹⁷. De manera similar a los hallazgos de este estudio, la mayoría de los cambios observados por Palleja *et al* volvieron con el tiempo a los valores de referencia que tenían previamente al tratamiento antibiótico. Por lo tanto, hay que considerar que algunos de los cambios en la composición de la microbiota de este estudio pueden no ser el resultado del DILI, sino más bien del tratamiento con antibióticos u otros tipos de medicamentos antes del episodio de DILI. No obstante, estos cambios podrían predisponer al paciente a una mayor susceptibilidad de sufrir la enfermedad. Se plantea si este podría explicar, en cierta medida, la alta frecuencia de casos identificados de DILI causados por antibióticos.

En conclusión, este fue un estudio exploratorio sobre la relación entre la composición de la microbiota intestinal y el DILI. Aunque el tamaño de las muestras fue pequeño se obtuvieron resultados prometedores que apuntan a un posible papel de la microbiota en el DILI. Sin embargo, los resultados hay que tomarlos con cautela y deben confirmarse en cohortes independientes. Se encontró una reducción general de la α -diversidad con una disminución prominente de la riqueza bacteriana en los pacientes con DILI, en comparación con ALI y HLC. Además, la disminución detectada en la abundancia de bacterias comensales, como Ruminococcaceae, junto con el aumento de la abundancia de patógenos oportunistas detectados en el grupo de DILI podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de DILI. Se espera que este estudio inspire nuevas investigaciones en este campo, ya que podría proporcionar nuevos conocimientos sobre el mecanismo de DILI idiosincrásico.



DISCUSIÓN GENERAL



Este estudio doctoral se enfoca en dos líneas de investigación importantes en el DILI, que son la búsqueda de biomarcadores y el estudio del mecanismo de esta enfermedad. Respecto a la búsqueda de biomarcadores se evaluó el potencial diagnóstico y/o pronóstico en el DILI de los biomarcadores séricos candidatos miR-122, OPN, α -GST, K18 y ccK18. Estos biomarcadores fueron seleccionados en base a resultados obtenidos en estudios previos que han destacado su potencial en detectar el DILI. Aunque estudios como el de Church *et al* han examinado varios biomarcadores potenciales en grandes grupos de pacientes con DILI, carecen de un grupo de control con otras causas de daño hepático ¹²⁰. Sin embargo, este estudio doctoral supera esta limitación al incluir dicho grupo control, lo que representa una gran innovación y relevancia en el estudio de esta enfermedad.

Todos los biomarcadores evaluados, al igual que en el estudio de Church *et al*, mostraron un buen rendimiento en la distinción de los grupos de DILI y ALI en comparación con los HLC, aunque resultaron menos eficientes para diferenciar DILI de ALI. La ccK18 y K18 fueron los biomarcadores que mejor permitieron diferenciar el DILI frente a ALI. Sin embargo, es posible que la heterogeneidad del grupo ALI tuviera un efecto en los resultados y que los biomarcadores tengan un rendimiento diferente según las diferentes patologías. De hecho, cuando se realizó una subdivisión del grupo ALI en AIH y VH, los resultados para la ccK18 mejoraron para la distinción entre DILI y AIH. Es posible que esta mejora en la capacidad de distinguir DILI de AIH se deba a que el grupo AIH presentó un nivel mayor de las transaminasas que DILI, enzimas las cuales correlacionaron fuertemente con la ccK18. Otra posible explicación es que los pacientes con AIH tienen una mayor cantidad de fibrosis en comparación con aquellos con VH, debido a que algunos pacientes con AIH pueden haber tenido la enfermedad no diagnosticada por un tiempo indeterminado, lo que puede llevar al desarrollo de fibrosis. Tanto K18 como ccK18 en la sangre se han evaluado como indicadores de la progresión de la fibrosis hepática en pacientes con NASH ¹⁶¹. Por otro lado, la OPN mostró potencial para distinguir a los pacientes con daño hepático que necesitaron trasplante hepático o tuvieron un desenlace fatal de aquellos que se recuperaron, similar a lo que se encontró para INR. Esto sugiere que la OPN podría ser un biomarcador útil para predecir el pronóstico en pacientes con daño hepático.

Hasta la fecha otros estudios han realizado la evaluación de estos biomarcadores en otras patologías hepáticas no relacionadas con el consumo de fármacos. En muchos de estos estudios, mostraron elevaciones y potencial diagnóstico frente a los controles sanos. Sin

embargo, era necesario la realización de un estudio comparativo como este estudio doctoral, que examina el comportamiento de los biomarcadores en el DILI frente a estas patologías para evaluar posibles diferencias y el verdadero potencial diagnóstico para el DILI. El hecho de que estos biomarcadores no tengan una buena capacidad de distinción de DILI frente a otras patologías hepáticas limita su utilidad diagnóstica en la clínica. Sin embargo, sí que podrían tener un gran potencial en ensayos clínicos debido a las características que presentan. Algunos de ellos como α -GST y miR-122 muestran una fuerte correlación con ALT, e incluso se propone que podrían tener una mayor sensibilidad que la ALT ^{157,166}. Además, tanto la α -GST como el miR-122, son más específicos del hígado que la ALT, la cual sufre elevaciones en la sangre en diferentes condiciones que no son el daño hepático. El uso de este tipo de biomarcadores podría mejorar el tiempo de detección de hepatotoxicidad en los ensayos clínicos y ayudaría a identificar mejor el daño hepático.

Otra gran novedad que presenta este estudio de tesis doctoral es la metodología utilizada para el análisis del miR-122 en muestras de pacientes. Los miRNAs se suelen cuantificar mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT q-PCR del inglés *real time quantitative-PCR*), como fue realizado en el estudio de Church *et al.* Este método de PCR, a pesar de su simplicidad conceptual y práctica, carece de un consenso de cómo debe realizarse, lo que puede conducir a deficiencias técnicas que afectan el rendimiento del ensayo. Además, el uso de diferentes genes de referencia para la normalización puede dificultar la comparación de los resultados entre diferentes estudios. En este estudio doctoral el análisis del miR-122 se realizó en las instalaciones de DestiNA Genomics, una empresa colaboradora que ha desarrollado un método “single-molecule arrays” que utiliza la tecnología de Quanterix mediante la plataforma SIMOA. Con esta metodología se puede detectar una única molécula de miRNA en una determinada muestra, y no necesita la utilización de polimerasas para amplificar la secuencia ¹⁵⁸. Su utilización supone un método novedoso y alternativo a la RT q-PCR en la identificación y detección de miRNAs como biomarcadores. Además, estos resultados, en colaboración con DestiNA Genomics, han permitido crear las bases para el desarrollo de un ensayo multiplex con el objetivo de establecer un panel de diferentes biomarcadores para DILI. Este nuevo panel presentará la gran novedad que, mediante la tecnología desarrollada por DestiNA Genomic, se podrán analizar varios biomarcadores de diferente naturaleza (miRNAs y proteínas) de forma simultánea en una misma muestra. La combinación de diferentes biomarcadores

podría tener un mayor potencial que el uso de biomarcador aislados en el diagnóstico de enfermedades como el DILI.

La evaluación de los biomarcadores también aporta información sobre el mecanismo patológico del DILI. Alguno de ellos, como la K18, actúan como DAMPs, y por lo tanto pueden participar activando a las células del sistema inmune innato a través de los receptores PRR. Además, la K18 es sustrato de las caspasas durante la apoptosis del hepatocito generando la forma ccK18 la cual se libera de la célula. En cambio, cuando se produce la necrosis del hepatocito se libera la K18 en su forma completa al espacio extracelular. En las muestras de DILI se detectó un incremento de ambas formas de la citoqueratina 18 respecto a los controles sanos, lo cual parece indicar que en el DILI durante el daño hepático los hepatocitos pueden estar sufriendo tanto un proceso de muerte celular controlada (apoptosis) como descontrolada (necrosis). La elevación de α -GST en sangre también indica un daño en el hepatocito, ya que se libera del citoplasma cuando se rompe la membrana celular. Además, se plantea que la α -GST podría tener un papel activo en controlar el proceso de proliferación celular y muerte celular a través de la vía JNK ²¹⁸. La OPN es una proteína que participa en numerosas funciones, siendo importante en la regulación del sistema inmune. Puede actuar como quimiocina atrayendo diferentes tipos de células leucocitarias, como monocitos, a zonas inflamadas, desarrollando un ambiente proinflamatorio. La OPN también puede inducir la liberación de la proteína del cuadro 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1 del inglés *high-mobility group box-1*) ²¹⁹ que es un DAMP que se une a diferentes receptores, principalmente el TLR4, generando la activación de macrófagos, el reclutamiento de células periféricas como neutrófilos y la liberación de citocinas inflamatorias en la zona dañada del hígado ²²⁰. Sin embargo, el rol de la OPN durante un daño hepático no está del todo claro, ya que también se ha visto que podría participar en la regeneración tisular en algunas patologías ¹³². Los resultados de este estudio doctoral muestran un incremento de la OPN en todos los grupos de daño frente a los controles sanos. Si la OPN en estos casos refleja un mayor grado de daño, o si por el contrario la OPN es mayor en estos pacientes para combatir el mayor grado de daño, necesita de más comprobaciones. Para ello, se necesita la inclusión de casos de ALF que lleguen a recuperarse espontáneamente, un grupo control que no fue representado en este estudio doctoral. Sin embargo, lo que sí parece claro es que el mayor nivel de OPN durante el episodio de DILI, independientemente del grado de daño, indica una participación del sistema inmune dado un proceso inflamatorio hepático. En cuanto al miR-122, podría tener un papel activo modulando la respuesta inmune en patologías

hepáticas. En modelo celular de NAFLD se ha visto que cuando se inhibe el miR-122 se reduce tanto la acumulación lipídica como la inflamación en este modelo. Los autores han planteado que el miR-122 podría actuar sobre TLR4 y activar la vía NF-kb que conduce a la liberación de citocinas proinflamatorias promoviendo el daño ²²¹. En base a estos hallazgos los mayores niveles de miR-122 liberados ante la muerte de los hepatocitos observados en el DILI, podrían indicar una mayor activación del sistema inmune, lo cual va en consonancia con la mayor activación observada del sistema inmune en el momento agudo del daño.

La detección de estos biomarcadores en sangre de los pacientes DILI apoya la idea de que el sistema inmune participa en el desarrollo de la enfermedad. Aunque en el DILI la participación del sistema inmune innato se presupone, la implicación del sistema inmune adaptativo y la tolerancia inmune está más en entredicho. Los estudios que más sustentan el papel del sistema inmune adaptativo en DILI son los estudios genéticos que permitieron la identificación de variantes alélicas de HLA asociadas a un mayor riesgo de desarrollar DILI por el consumo de determinados fármacos ²²². Se han propuesto varias hipótesis sobre cómo los fármacos podrían activar el sistema inmune adaptativo, siendo la teoría del hapteno una de las más aceptadas.

Además, en cuanto a la búsqueda de biomarcadores, el conocer las diferentes poblaciones celulares leucocitarias que están presente en el hígado en el momento agudo del daño podría aportar información del mecanismo del daño y podría permitir la identificación de biomarcadores diagnósticos. Sin embargo, ya que en el DILI no se suelen realizar biopsias, hay pocos estudios que describan las poblaciones linfocitarias presentes en el hígado durante el momento agudo. Para evitar la falta de tejido hepático en la investigación del DILI, en este estudio doctoral se propuso la utilización de la técnica del inmunofenotipado mediante citometría de flujo en sangre periférica. Esta una técnica que permite la caracterización de múltiples poblaciones celulares a la vez en la sangre de los pacientes, y podría reflejar lo que está ocurriendo a nivel hepático en el DILI. Además, su aplicación en patologías inmunitarias, como la leucemia o el linfoma, ha permitido la identificación de perfiles celulares que pueden ser utilizados como diagnóstico. Es decir, el inmunofenotipado es una técnica útil tanto para obtener información sobre el mecanismo de una enfermedad, y el papel del sistema inmune en ella, como para describir un patrón específico de las células del sistema inmune que puede ser utilizado como biomarcador. En este estudio doctoral fue la primera vez que se realizó un análisis amplio

de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune adaptativo, mediante la técnica del inmunofenotipado en pacientes con DILI.

Este estudio ha confirmado la implicación del sistema inmune adaptativo en el desarrollo del DILI, evidenciando un incremento de la activación de los linfocitos CD4+ y CD8+, lo cual es indicativo de una respuesta adaptativa en el momento agudo del daño. Sin embargo, el grupo VH mostró la misma tendencia que los casos de DILI, salvo que presentó mayores niveles de linfocitos CD8+ activados, posiblemente debido a que en el DILI la respuesta de las células T es oligoclonal. Esto significa que involucra un menor número de linfocitos y un bajo nivel de activación, mientras que las infecciones virales suelen tener una respuesta policlonal con un mayor número de linfocitos y un mayor nivel de activación. Esto podría deberse a que el fármaco causante crea un neoantígeno mediante la unión con un péptido endógeno, mientras que los virus suelen presentar varios antígenos. Sin embargo, actualmente no se tiene una comprensión completa de los mecanismos inmunológicos implicados en DILI. En un caso recientemente reportado de daño hepático por para-aminobenzoato de potasio, utilizado para tratar la enfermedad de Peyronie, se observó que el paciente mostraba niveles altos de linfocitos CD3+T activados (HLA-DR+). El marcador CD3+ es expresado por los linfocitos T CD4+ y CD8+, por lo que sus resultados coinciden con los encontrados en este estudio doctoral. Además, los autores realizaron la cinética de expresión del HLA-DR en los CD3+ y vieron que el nivel de activación de HLA-DR descendía conforme se producía la normalización del perfil hepático ²²³, al igual que en este estudio doctoral. Por otro lado, cabe destacar que las células Treg y algunas células CD8+ pueden expresar el complejo HLA-DR y tener actividad supresora en la respuesta inmune ^{224, 225}. Por lo que, la activación de HLA-DR en células CD4+ y CD8+ puede estar relacionada tanto con una respuesta inmune agresiva como con la supresión de la respuesta inmune en pacientes con DILI. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en el porcentaje total de células Treg en los DILI en comparación con controles sanos, lo que sugiere que la activación puede estar ocurriendo en células CD4+ que promueven la respuesta inmune. Otro resultado llamativo fue el aumento significativo de la población Th que mostraron los DILI en el momento agudo del daño frente a controles sanos. Los linfocitos T colaboradores desde un precursor Th0 pueden diferenciarse, según la procedencia del antígeno que se le presente y de las citocinas del microambiente, tanto en Th1 o Th2. Los linfocitos T colaboradores Th1 impulsan una respuesta inmune adaptativa liderada por células, mientras que los linfocitos T auxiliares Th2 promueven una respuesta inmune

adaptativa basada en anticuerpos. Es común que las respuestas inmunes adaptativas sean una combinación equilibrada de ambas respuestas celulares e inmunes a anticuerpos. Sin embargo, en la hipótesis de DILI, debido a que la forma predominante en la que se presentan los neoantígenos producidos por los fármacos es a través del HLA-I, la respuesta inmune adaptativa más común suele ser de tipo celular ⁵⁸. Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan esta hipótesis ya que además de un incremento de los niveles de Th1 no se observaron cambios en el nivel de los linfocitos B que median la respuesta inmune humoral. Sería interesante comprobar en estudios siguientes si los Th1 presentan el receptor HLA-DR+ e identificar si esa subpoblación es la mayoritariamente efectora de los CD4+ en los DILI.

Para corroborar la posible pérdida de la tolerancia inmune en los DILI se planteó comparar el nivel de los "immune-checkpoints" (receptores linfocitarios y ligandos monocitarios) y analizar su contribución a la inmunotolerancia en el DILI, su gravedad y evolución. En el DILI la tolerancia inmune inherente al hígado se plantea como mecanismo de adaptación que normalmente ante un daño celular causado por el fármaco podría frenar el daño sin que se llegue a desarrollar la enfermedad. Sin embargo, la participación de otros factores, pueden conducir a que se altere esta tolerancia y se produzca un daño. La hipótesis de la pérdida de tolerancia en el DILI está respaldada por la detección de casos DILI debido al tratamiento con inmunoterapia contra el cáncer, en concreto con inhibidores de los immune-checkpoints, con los cuales se busca promover la respuesta inmune frente a las células cancerosas. Además, el tratamiento de ratones PD-1 -/- con amodiaquina combinado con anticuerpos anti-CTLA-4, que bloquean este immune-checkpoint, permitió generar un modelo murino de daño hepático similar al DILI. El tratamiento combinado mostró un mayor aumento de ALT en los ratones que cuando se les trató con el fármaco sólo ⁷⁵. Por lo que el CTLA-4 parece llevar a cabo una función importante en el mantenimiento de la tolerancia inmune en el DILI.

El aumento del nivel de PD-L1 en los monocitos periféricos parecen destacar el papel de esta población celular en el proceso de tolerancia a través de la unión de PD-L1 con PD-1. La unión de PD-L1 con PD-1, expresado en los linfocitos, produce la inhibición de la activación de éstos. Sin embargo, cabe destacar que los monocitos no son la única población de leucocitos que expresan PD-L1, por lo que sería interesante comprobar la expresión de este marcador en otras poblaciones celulares que podrían estar participando en el mantenimiento de la tolerancia inmune.

Para reforzar los resultados obtenidos mediante la técnica del inmunofenotipado se propuso la realización los niveles de citocinas pro y antiinflamatorias junto a quimiocinas. Las citocinas y quimiocinas determinan la comunicación entre las diferentes células inmunes en el momento del daño y son claves en el trascurso de la enfermedad. Además, algunos autores han destacado el potencial de las citocinas como biomarcadores ya que se han identificado perfiles específicos en sangre asociados a ciertas patologías. El aumento de las quimiocinas MIP-1beta, RANTES y SDF-1alfa en los DILI soporta los resultados obtenidos mediante el inmunofenotipado y la activación de los linfocitos T observada. Estas quimiocinas son moléculas que son liberadas por diferentes células del sistema inmune en respuesta a daños o inflamación en los tejidos. Tienen efectos proinflamatorios y quimiotácticos, lo que significa que atraen a otros tipos de células, como monocitos o linfocitos, hacia tejidos donde se produce daño celular. Se ha comprobado que las células residentes del hígado pueden liberar estas citocinas y atraer a células inmunes de la periferia las cuales presentan receptores específicos para dichas quimiocinas. Por ejemplo, se ha visto que los hepatocitos tienen la capacidad de liberar más nivel de RANTES ante un daño celular el cual se puede unir a varios receptores ¹⁹⁴. Uno de ellos es el receptor CCR5 que se ha localizado en la membrana de los linfocitos CD4+ por lo que el mayor nivel de RANTES y podría estar reflejando una mayor atracción de los linfocitos CD4+ activados observados en los DILI ²²⁶. Los monocitos también pueden expresar el receptor CCR5. Se ha visto que la liberación de MIP-1beta, que también se une a CCR5, por las HSC puede conducir la quimiotaxis de monocitos durante el proceso de fibrosis hepática ²²⁷. Los resultados de este estudio doctoral parecen indicar que, debido al daño hepático, se liberan diferentes quimiocinas en la sangre, lo que lleva al reclutamiento de diferentes tipos celulares que son importantes en la evolución de la enfermedad. Por otro lado, la citocina IL-18 participa en ciertas condiciones, como puede ser asociado a IL-12, en la derivación de los linfocitos T colaboradores hacia Th1, lo cual va en consonancia con los mayores niveles de Th1 observados en los DILI en este estudio doctoral ²²⁸. Sin embargo, no se observó un aumento de Th1 en otros grupos como VH, en los cuales también se observó un incremento de IL-18, lo cual no tiene una explicación clara. La actividad de estas quimiocinas y citocinas en el reclutamiento de linfocitos hacia zonas inflamadas parece ir en consonancia con el incremento de la activación de los linfocitos T en el momento agudo del daño observados mediante el inmunofenotipado. Por lo que, probablemente se

produzca el reclutamiento de los linfocitos T hacia el tejido dañado para que en primera instancia se produzca una respuesta inmune adaptativa.

En este estudio doctoral se detectaron 6 citocinas/quimiocinas en más del 60% de las muestras analizadas. Sin embargo, muchas de las citocinas y quimiocinas incluidas en el panel no fueron detectadas de manera confiable, a pesar de que la metodología utilizada tiene una gran sensibilidad. Este resultado podría deberse a que las citocinas y quimiocinas son moléculas que la mayoría de las veces se encuentran en baja concentración en la sangre. Por ello, el hecho de no detectarlas en este estudio no descarta que en el DILI se produzca un aumento de ellas respecto a los controles sanos. Además, cabe destacar que las citocinas que se han evaluado no se liberan únicamente desde el hígado, sino que pueden ser producidas y liberadas por células del sistema inmune en distintos tejidos y órganos del cuerpo, al igual que por la presencia de enfermedades inflamatorias subyacentes. Por lo tanto, su detección en sangre podría no reflejar de manera precisa lo que está ocurriendo en el hígado, aunque es muy probable debido a las diferencias observadas en el DILI respecto a los controles sanos. Además, al comparar los resultados con los obtenidos por Bonkovsky *et al*, se observan diferencias que podrían explicarse por diferencias en las cohortes de estudio en cuando a las enfermedades subyacentes por ejemplo ¹⁹². Es decir, estos hallazgos destacan el uso limitado de las citocinas como biomarcadores en el DILI ya que es poco probable identificar un perfil único en el DILI de estas moléculas, debido a su participación en el control de la respuesta inmune en todo el organismo. Sin embargo, los hallazgos sí que confirman una implicación del sistema inmune en el DILI en el momento agudo.

Considerando en conjunto los diferentes hallazgos obtenidos en el DILI, parecen indicar que en primera instancia se produce la activación del sistema inmune adaptativo con un aumento de los niveles de linfocitos T CD4+ como CD8+ activados. En paralelo se detecta un aumento del nivel de CTLA-4 y probablemente de PD-1, ambos coinhibidores en el momento agudo del episodio de DILI, que podría estar indicando que se está intentando frenar la respuesta inmune. Conforme transcurre el episodio, junto a la normalización del perfil hepático, se produce descenso tanto de la activación de los de los linfocitos T CD4+ y CD8+, como de estos immune-checkpoints inhibidores. Además, el aumento de la expresión de PD-1L en monocitos periféricos activados en el momento agudo del daño, podría contribuir a promover la tolerancia inmune. Las citocinas y quimiocinas probablemente participarían en la atracción de leucocitos al tejido dañado para participar en la respuesta inmune. Por lo que, los resultados obtenidos en este estudio

doctoral apoyan la hipótesis de que el sistema inmune adaptativo juega un papel fundamental en el desarrollo de DILI.

El desarrollo de este estudio ha permitido esclarecer más el mecanismo patológico de DILI. No obstante, no se ha conseguido identificar un patrón ni celular ni de citocinas específicos que permitan el diagnóstico de DILI frente a otras patologías hepáticas. Esto parece indicar que el mecanismo, en cuanto al sistema inmune se refiere, podría presentar similitudes con otras patologías hepáticas. De hecho, a partir de los resultados obtenidos en este estudio, PB Watkins publicó un comentario donde plantea la hipótesis de que el mecanismo de DILI y hepatitis viral podrían ser similares en cuanto a los pasos antes de la aparición del daño ²²⁹. En este planteamiento, tanto el fármaco como los virus generan un daño en el hepatocito, que produce la liberación de DAMPs, y estos a su vez activan al sistema inmune innato, el cual se encarga de activar al sistema inmune adaptativo.

Existen otros factores ambientales que pueden aumentar la susceptibilidad a DILI mediante diferentes mecanismos, siendo uno de ellos la alteración de la tolerancia inmune a nivel hepático. La microbiota es uno de estos factores que ya se ha demostrado su importancia en el desarrollo de diversas patologías hepáticas actuando a través de eje intestino-hígado ²³⁰. En el DILI se ha planteó su posible papel debido a que tiene una gran implicación en el metabolismo de los fármacos y en mantener el sistema inmune activo. Además, algunos estudios apuntan a que la identificación de patrones de la microbiota podrían ser utilizados para ayudar en el diagnóstico de enfermedades ²³¹. Por ello, el estudio de la microbiota en el DILI además de mejorar el conocimiento del mecanismo también posibilita la identificación de un patrón de composición específico de la enfermedad.

Los DILI y ALI muestran un descenso en la diversidad microbiana en comparación con HLC, tanto en la riqueza como la diversidad, además de un descenso en el número total de OTUs observado en ambos grupos. Cambios que revertieron conforme se produjo la normalización del perfil hepático. El análisis de la abundancia relativa media muestra cambios en la abundancia de ciertas familias y géneros de bacterias. Se observó un descenso en familias como Ruminococcaceae y aumentos en Streptococcaceae, Veillonellaceae y Acidaminococcaceae. A nivel de género, se observó un descenso de *Coprococcus* y aumentos en *Streptococcus* y *Veillonella*. Estos resultados sugieren un descenso en la presencia de bacterias beneficiosas para el huésped y un aumento en la presencia de grupos de bacterias que incluyen patógenas oportunistas. En otras patologías como AIH y PSC también se ha visto un aumento de la abundancia de *Veillonella* ^{232,233}.

Además, en casos de hepatitis alcohólica aguda acompañado a la disbiosis se producía un descenso de la diversidad de la microbiota intestinal y un aumento de géneros como *Veillonella*²³⁴. Sin embargo, considerar como “beneficiosas” o “perjudiciales” el aumento o disminución de determinadas bacterias es difícil en términos generales, ya que todo depende de las bacterias en concreto y del contexto fisiológico en el que se encuentren.

En definitiva, los resultados parecen mostrar que, en el DILI, los fármacos podrían alterar la composición de la microbiota causando una disminución en su diversidad. Este cambio en la composición de la microbiota no necesariamente es causado solo por el fármaco responsable del DILI, sino también puede ser una consecuencia de fármacos concomitantes. De hecho, la mayoría de los pacientes DILI tomaron antibióticos (69%) como fármaco culpable y/o concomitante en los últimos 3 meses, lo cual pudo reflejar los cambios en la microbiota de estos pacientes. Los ALI también mostraron cambios similares a los DILI, y en este grupo también el 50% tomó antibióticos en los últimos 3 meses. Por lo que habría que valorar si los cambios observados podrían deberse al uso de este tipo de fármacos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no solo los antibióticos pueden causar cambios en la composición de la microbiota. Aunque la hipótesis planteada es que los fármacos son los causantes de los cambios en la composición y diversidad observados, no se puede confirmar si estos cambios son una consecuencia de DILI o si son un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

Independientemente de que los cambios en la composición sean causa o efecto del DILI, este proceso de disbiosis podría tener una serie de consecuencias, como puede ser afectar a las funciones que desempeña la microbiota comensal y permitir el crecimiento de patógenos oportunistas. Un descenso en la diversidad de la microbiota intestinal se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar patologías como enfermedades hepáticas, aumentando la susceptibilidad a ellas²³⁵. Además, la disbiosis normalmente también conlleva la aparición de una inflamación a nivel intestinal que va a conducir a un incremento de la permeabilidad, y por lo tanto en un incremento de la traslocación de productos de origen bacteriano, como el LPS. Al llegar al hígado el LPS podría afectar a la tolerancia inmune de este órgano. Este estudio amplía el conocimiento que se tiene del mecanismo de DILI y sugiere un papel importante de la microbiota en su desarrollo. Los resultados obtenidos son valiosos y podrían ser complementados mediante el análisis metabolómico de la microbiota intestinal para identificar los metabolitos relacionados con el proceso de disbiosis en el DILI. Además, sería importante evaluar la permeabilidad

intestinal en estos pacientes ya que se plantea que podría estar contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. Estas investigaciones adicionales podrían proporcionar una comprensión más completa del papel de la microbiota en el mecanismo del DILI.

En cuanto al potencial de la microbiota en el diagnóstico de DILI, no se obtuvo un patrón específico en DILI frente a otros tipos de daño hepático. Además en ambos tipos de daño se han detectados cambios similares en cuanto al descenso en la diversidad. El hecho de que no se encuentren patrones específicos de microbiota en DILI podría deberse a diferentes hechos. Uno de ellos podría deberse en cuanto al tipo de fármaco causante del daño, ya que como se ha mostrado, algunos como los antibióticos van a producir cambios más grandes en la composición. Además, otros factores como la edad o la presencia de enfermedades subyacentes del paciente, como pueden ser diferentes tipos de enfermedades intestinales inflamatorias que conllevan un estado de disbiosis pueden tener un impacto fuerte sobre la microbiota. Sin embargo, debido al número reducido de muestras del estudio no ha sido posible considerarlas como variables en los análisis. Del mismo modo, otros factores no considerados en este estudio, como el ejercicio o la dieta, también pueden afectar en gran medida la composición de la microbiota. Es posible que estos factores contribuyan a los cambios observados y deben ser considerados en futuras investigaciones.

En definitiva, se puede observar que los DILI presentan una microbiota intestinal alterada, probablemente por el consumo de fármacos, caracterizada por un descenso en la diversidad, con un menor nivel de bacterias que pertenecen a familias que desempeñan funciones en el huésped beneficiosas, y un incremento de grupos bacterianos que pueden tener el potencial de comportarse como patógenos oportunistas. Estos cambios en la diversidad podrían tener un efecto en las diferentes funciones llevadas a cabo por la microbiota intestinal que pueden afectar al huésped. Además, como consecuencia al proceso de disbiosis se podría estar dando un potencial incremento de la permeabilidad intestinal y de la traslocación de PAMPs como el LPS. La mayor llegada de estos PAMPs por el torrente sanguíneo al hígado podría participar en la rotura de la tolerancia hepática produciendo una amplificación del proceso inflamatorio.

Finalmente, a partir de todos los resultados obtenidos tanto de los biomarcadores candidatos, sistema inmune y microbiota, se plantea la siguiente serie de eventos en los casos DILI en el momento agudo del daño (Figura 18). En primer lugar, parece ser que el fármaco podría dañar a los hepatocitos, los cuales van a sufrir muerte celular y la liberación de diferentes moléculas como son los biomarcadores candidatos analizados

(miR-122, K18, ccK18, alfa-GST y OPN). Estas moléculas pueden actuar como DAMPs activando a las células residentes del sistema inmune innato del hígado, a través de los receptores PRR. Esta activación se denomina estéril, ya que no se produce por infección de patógenos si no por el daño del fármaco, y condicionan el desarrollo de la enfermedad. Tras esto, se produce la liberación de diferentes citocinas y quimiocinas que van a participar en el reclutamiento de células de la periferia. Las diferentes citocinas/quimiocinas detectadas en el momento agudo en DILI (RANTES, SDF-1 alfa, MIP-1b e IL-18) respaldan este hecho. Además, la OPN también podría actuar como quimiocina reclutando linfocitos hacia el tejido dañado. Por otro lado, las células del sistema inmune adaptativo también se pueden activar directamente por la acción del fármaco, el cual se ha propuesto que mediante diferentes mecanismos puede activar a los linfocitos. El mecanismo más aceptado se basa en la teoría del hapteno, en la cual el fármaco se une a una proteína endógena y produce neoantígenos, los cuales son presentados en mediante el complejo HLA por las células APC. Esto podría producir la activación de los linfocitos T. El incremento de los niveles de HLA-DR indican probablemente una activación inicial tanto de CD4+ y CD8+ que van a condicionar el desenlace de la enfermedad. Además, un aumento de los Th1 que median la inmunidad por células y se encargan de la liberación de diferentes citocinas proinflamatorias que va a promover el daño. Sin embargo los resultados respecto al sistema inmune adaptativo también parecen indicar que, tras una activación inicial, se propicia la tolerancia inmune para frenar dicho daño a nivel hepático. Esto está respaldado por un aumento de CTLA-4 y PD-1 en paralelo con los niveles de HLA-DR en el momento agudo del daño y un posterior descenso conforme se produjo la normalización del perfil hepático, lo cual concuerda con la regulación de la tolerancia periférica. Además, se observó que en sangre periférica los monocitos activados presentaban un aumento del ligando inhibidor PD-L1, lo cual podría indicar que estas poblaciones van a dirigirse al hígado y participar en el establecimiento de la tolerancia inmune. En la mayoría de los casos, el promover la tolerancia inmune supondrá la adaptación al daño y la recuperación del tejido sin llegar a desarrollar manifestaciones clínicas importantes. Sin embargo, otros factores como son la microbiota intestinal podría afectar a la susceptibilidad de DILI, actuando mediante diferentes mecanismos. En los casos DILI se observó una disbiosis, probablemente producida por el consumo de fármacos, caracterizada por un descenso en poblaciones beneficiosas y un aumento de bacterias que podrían actuar como patógenos oportunistas. Seguido al proceso de disbiosis, se podría producir un incremento de la permeabilidad

intestinal y un aumento de los niveles de LPS en sangre. La mayor cantidad de LPS en el hígado podría provocar una sobreactivación de TLR4, lo que podría aumentar el riesgo de romper la tolerancia inmune del hígado y promover el daño en el momento agudo del daño. Además, cambios en la composición de la microbiota intestinal pueden afectar a la farmacodinámica de los fármacos, lo que puede aumentar el efecto tóxico de éstos. Esto podría aumentar el estrés celular que se produce en los hepatocitos.

Aunque esta serie de eventos intenta resumir lo observado en los casos DILI analizados, no todos los pacientes presentaron las mismas características en cuanto a los resultados obtenidos. La naturaleza de DILI es multifactorial, donde la susceptibilidad va a estar condicionada por diferentes factores del huésped, del fármaco y ambientales que van a coincidir en el espacio y tiempo para desarrollar el daño. Es posible que distintos factores tengan diferentes grados de influencia o importancia en el resultado de los casos para diferentes pacientes. Por ejemplo, en pacientes con un genotipo que les predispone a desarrollar daño, el factor genético puede ser más importante en el desarrollo de DILI. Sin embargo, la presencia de otros factores también puede ser necesaria, ya que no todos los pacientes con esa predisposición genética desarrollan el daño. En el caso de fármacos como los antibióticos, que alteran la microbiota, la microbiota puede tener un papel importante en la progresión del daño debido a la acción de estos fármacos en las bacterias. En definitiva es difícil llegar a unas características únicas de la enfermedad de DILI, lo cual va en consonancia con la idiosincrasia de la misma. Es por ello que la identificación de un biomarcador, o patrón específico, que permita su diagnóstico es una tarea difícil. Además, las similitudes observadas en los resultados con otros tipos de daño hepático sugieren la posibilidad de similitudes en el mecanismo, lo cual dificulta aún más esta tarea. Sin embargo, estudios como este estudio doctoral, que buscan ampliar el conocimiento sobre el mecanismo de la enfermedad, abren nuevas puertas en la búsqueda de biomarcadores en el DILI. La identificación de biomarcadores diagnósticos y pronósticos en el DILI es crucial para una evaluación clínica eficiente y diferenciación de otras enfermedades hepáticas. Un diagnóstico temprano y una mejor previsión del pronóstico podrían mejorar significativamente el seguimiento y el desenlace de los casos de DILI.

Además, el encontrar posibles biomarcadores diagnósticos en el DILI es también de gran importancia para la industria farmacéutica, ya que se podrían detectar más fielmente casos de hepatotoxicidad durante el desarrollo de los fármacos, promoviendo su comercialización de forma más segura. El uso de biomarcadores diagnósticos por parte

de la industria farmacéutica permitirá identificar casos de hepatotoxicidad con más precisión, lo que podría permitir continuar el desarrollo de fármacos que podrían haber sido descartados durante el desarrollo, y que podrían beneficiar a pacientes con diferentes patologías.

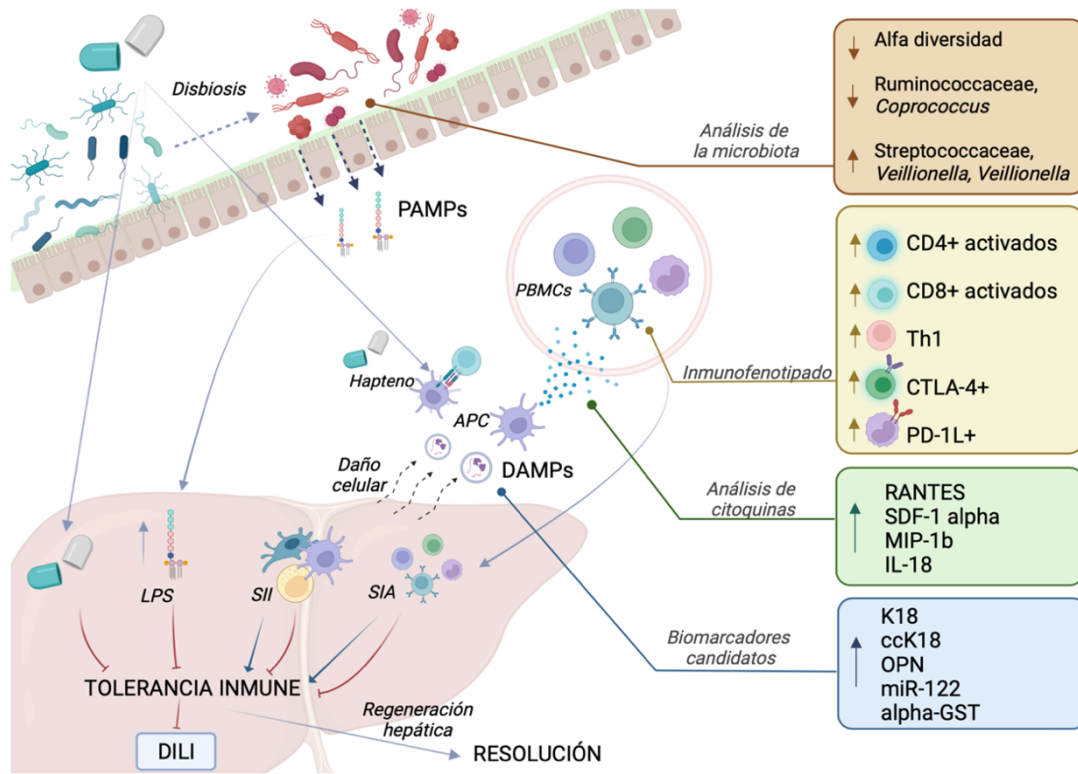


Figura 18. Figura esquemática del mecanismo de DILI en relación a los resultados obtenidos en este estudio doctoral. Los fármacos en el hígado producen un estrés celular y daño en el hepatocito. Los hepatocitos dañados liberan DAMPs que activan a las células del sistema inmune innato como las APC, lo cual provoca la liberación de diferentes citocinas y el reclutamiento de células inmunes periféricas. Las células APC pueden presentar los neoantígenos generados por los fármacos a los linfocitos T. A nivel periférico se observa una activación de linfocitos CD4+ y CD8+ que probablemente se dirijan al hígado a regular la respuesta inmune. La elevación de CTLA-4 y PD-1L parecen indicar que el sistema inmune adaptativo promueve la tolerancia inmune para frenar el daño. Los fármacos en el intestino alteran la microbiota intestinal, lo cual puede afectar a las funciones de la microbiota comensal y conducir a un incremento de la llegada de componentes bacterianos al hígado (PAMPs, como por ejemplo el LPS), y alterar la tolerancia inmune. Las células residentes del hígado pueden amplificar la inflamación o participar en la regeneración hepática. La tolerancia inmune es un mecanismo de adaptación que permite resolver el episodio. APC: células presentadoras de antígenos, DAMPs: patrones moleculares asociados a daño, LPS: lipopolisacárido, PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos, SIA: Sistema inmune adaptativo, SII: Sistema inmune innato.

CONCLUSIONES



Biomarcadores candidatos

1. Los biomarcadores candidatos evaluados en este estudio (miR-122, K18, ccK18, alfa-GST y OPN) permiten diferenciar a los pacientes con daño hepático de aquellos con el hígado sano. Sin embargo, la diferenciación entre DILI y otras causas de daño hepático agudo es menos efectiva. De todos los biomarcadores candidatos evaluados, la ccK18 muestra el mejor potencial para distinguir DILI de la hepatitis autoinmune. Las dos formas de citoqueratina 18 (K18 y ccK18) y el miR-122 se correlacionan fuertemente con los niveles de ALT y AST. La OPN muestra el mayor potencial pronóstico entre los biomarcadores candidatos, con niveles más altos detectados en los casos más graves, independientemente de la etiología.

Sistema inmune en DILI

2. Los resultados obtenidos en cuanto al inmunofenotipado sugieren que en el DILI el sistema inmune adaptativo juega un papel importante, destacando la activación de los linfocitos CD4+ y CD8+. Además, el aumento del nivel de los puntos de control inmunitarios (*immune-checkpoints*) con actividad inhibidora, como CTLA-4, es consistente con una regulación de la tolerancia inmune periférica. Los niveles incrementados de las quimiocinas RANTES, SDF-1 alfa y MIP-1 beta, y de la citocina IL-18, subrayan, asimismo el papel del sistema inmune en el desarrollo de DILI y destacan un posible reclutamiento de células inmunes periféricas hacia el hígado.

Microbiota intestinal en DILI

3. En cuanto a la microbiota intestinal, los pacientes con DILI muestran una disminución en la α -diversidad en comparación con los controles sin enfermedad hepática, con una importante reducción en la riqueza bacteriana. La disminución en la abundancia de microorganismos que pueden desempeñar funciones beneficiosas, como Ruminococcaceae, junto con el aumento de la abundancia de familias conocidas que pueden actuar como patógenos oportunistas, como Streptococcaceae, podrían contribuir al desarrollo de DILI. La α -diversidad se recupera durante la evolución del DILI, alcanzando niveles similares a los controles, a medida que se normaliza el perfil hepático. Los cambios observados

en términos de familia y género en la primera visita también tienden a recuperarse a medida que se normaliza el perfil hepático.

REFERENCIAS



1. Stephens, C. et al. Comprehensive analysis and insights gained from long-term experience of the Spanish DILI Registry. *J Hepatol* **75**, 86–97 (2021).
2. Watkins, P. Drug safety sciences and the bottleneck in drug development. *Clin Pharmacol Ther* **89**, 788–790 (2011).
3. Babai, S., Auclert, L. & Le-Louët, H. Safety data and withdrawal of hepatotoxic drugs. *Therapie* **76**, 715–723 (2021).
4. Ballotin, V. R. et al. Herb-induced liver injury: Systematic review and meta-analysis. *World J Clin Cases* **9**, 5490–5513 (2021).
5. Lin, N. H., Yang, H. W., Su, Y. J. & Chang, C. W. Herb induced liver injury after using herbal medicine. *Medicine (Baltimore)* **98**, e14992 (2019).
6. Medina-Caliz, I. et al. Herbal and dietary supplement-induced liver injuries in the Spanish DILI Registry. *Clin Gastroenterol Hepatol* **16**, 1495–1502 (2018).
7. Andrade, R. J. Landscape of liver injury from herbal and dietary supplements in Europe, Latin America, and Asia. *Clin Liver Dis (Hoboken)* **14**, 49–50 (2019).
8. Ekor, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol* **4**, 177 (2014).
9. Navarro, V. et al. The contents of herbal and dietary supplements implicated in liver injury in the United States are frequently mislabeled. *Hepatol Commun* **3**, 792–794 (2019).
10. Yoon, E., Babar, A., Choudhary, M., Kutner, M. & Pysopoulos, N. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: a comprehensive update. *J Clin Transl Hepatol* **4**, 131–142 (2016).
11. Bernal, W. et al. Outcome after wait-listing for emergency liver transplantation in acute liver failure: A single centre experience. *J Hepatol* **50**, 306–313 (2009).
12. Ostapowicz, G. et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* **137**, 947–954 (2002).
13. Chen, M., Suzuki, A., Borlak, J., Andrade, R. J. & Lucena, M. I. Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *J Hepatol* **63**, 503–514 (2015).
14. Roth, R. A. & Ganey, P. E. Intrinsic versus Idiosyncratic Drug-induced hepatotoxicity—two villains or one? *J Pharmacol Exp Ther* **332**, 692–697 (2010).
15. Carrascosa, M. F., Salcines-Caviedes, J. R., Lucena, M. I. & Andrade, R. J. Acute liver failure following atorvastatin dose escalation: Is there a threshold dose for idiosyncratic hepatotoxicity? *J Hepatol* **62**, 751–752 (2015).
16. Lammert, C. et al. Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: Search for signals. *Hepatology* **47**, 2003–2009 (2008).
17. Chalasani, N. et al. Features and outcomes of 899 patients with drug-induced liver injury: The DILIN prospective study. *Gastroenterology* **148**, 1340–1352 (2015).
18. Björnsson, E. S., Bergmann, O. M., Björnsson, H. K., Kvaran, R. B. & Olafsson, S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology* **144**, 1419–1425 (2013).
19. Shen, T. et al. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in Mainland China. *Gastroenterology* **156**, 2230–2241 (2019).
20. Devarbhavi, H. Drug-induced liver injury unique to India. *Clin Liver Dis (Hoboken)* **18**, 108–110 (2021).
21. Sgro, C. et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: A French population-based study. *Hepatology* **36**, 451–455 (2002).
22. Benichou, C. Criteria of drug-induced liver disorders: Report of an international consensus meeting. *J Hepatol* **11**, 272–276 (1990).

23. Pettersson, J. *et al.* Muscular exercise can cause highly pathological liver function tests in healthy men. *Br J Clin Pharmacol* **65**, 253–259 (2008).
24. Watkins, P. B. Idiosyncratic liver injury: Challenges and approaches. *Toxicol Pathol* **33**, 1–5 (2005).
25. Aithal, G. *et al.* Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther* **89**, 806–815 (2011).
26. Robles-Díaz, M. *et al.* The value of serum aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transpeptidase as biomarkers in hepatotoxicity. *Liver Int* **35**, 2474–2482 (2015).
27. Robles-Díaz, M., Medina-Caliz, I., Stephens, C., Andrade, R. J. & Lucena, M. I. Biomarkers in DILI: One More Step Forward. *Front Pharmacol* **7**, 267 (2016).
28. Andrade, R. J. & Robles-Díaz, M. Diagnostic and prognostic assessment of suspected drug-induced liver injury in clinical practice. *Liver Int* **40**, 6–17 (2020).
29. Andrade, R. J. *et al.* Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: A challenge for gastroenterologists. *World J Gastroenterol* **13**, 329–340 (2007).
30. García-Cortés, M., Stephens, C., Lucena, M. I., Fernández-Castañer, A. & Andrade, R. J. Causality assessment methods in drug induced liver injury: Strengths and weaknesses. *J Hepatol* **55**, 683–691 (2011).
31. Hayashi, P. H. *et al.* A revised electronic version of RUCAM for the diagnosis of DILI. *Hepatology* **76**, 18–31 (2022).
32. Medina-Caliz, I. *et al.* Definition and risk factors for chronicity following acute idiosyncratic drug-induced liver injury. *J Hepatol* **65**, 532–542 (2016).
33. Almazroo, O. A., Miah, M. K. & Venkataramanan, R. Drug metabolism in the liver. *Clin Liver Dis* **21**, 1–20 (2017).
34. Yang, G. *et al.* Glucuronidation: driving factors and their impact on glucuronide disposition. *Drug Metab Rev* **49**, 105–138 (2017).
35. Veith, A. & Moorthy, B. Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Curr Opin Toxicol* **7**, 44–51 (2018).
36. Watkins, P. B. & Mosedale, M. Mechanisms of drug-induced liver injury. In *Schiff's Diseases of the Liver* (eds. Schiff, E. R., Maddrey, W. C., Reddy, K. R.) 774–798 (John Wiley & Sons Ltd, USA, 2017).
37. Gómez-Lechón, M. J., Tolosa, L. & Donato, M. T. Metabolic activation and drug-induced liver injury: in vitro approaches for the safety risk assessment of new drugs. *J Applied Toxicol* **36**, 752–768 (2016).
38. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 8416763 (2017).
39. Sena, C. M., Leandro, A., Azul, L., Seica, R. & Perry, G. Vascular oxidative stress: Impact and therapeutic approaches. *Front Physiol* **9**, 1668 (2018).
40. Jaeschke, H., McGill, M. R. & Ramachandran, A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* **44**, 88–106 (2012).
41. Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. The Nrf2-Antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **284**, 13291–13295 (2009).
42. Smith, R. A. J., Hartley, R. C., Cochemé, H. M. & Murphy, M. P. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 341–352 (2012).
43. Boelsterli, U. A. & Lee, K. K. Mechanisms of isoniazid-induced idiosyncratic liver injury: Emerging role of mitochondrial stress. *J Gastroenterol Hepatol* **29**, 678–687 (2014).

44. Mihajlovic, M. & Vinken, M. Mitochondria as the target of hepatotoxicity and drug-induced liver injury: Molecular mechanisms and detection methods. *Int J Mol Sci* **23**, 3315 (2022).
45. Kinnally, K. W., Peixoto, P. M., Ryu, S.-Y. & Dejean, L. M. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim Biophys Acta* **1813**, 616–622 (2011).
46. Fromenty, B. Alteration of mitochondrial DNA homeostasis in drug-induced liver injury. *Food Chem Toxicol* **135**, 110916 (2020).
47. Silva, M. F. B. *et al.* Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis* **31**, 205–16 (2008).
48. Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**, 913–922 (2007).
49. Ramachandran, A., Umbaugh, D. S. & Jaeschke, H. Mitochondrial dynamics in drug-induced liver injury. *Livers* **1**, 102–115 (2021).
50. Popov, L. D. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med* **24**, 4892–4899 (2020).
51. Ma, X., McKeen, T., Zhang, J. & Ding, W. X. Role and mechanisms of mitophagy in liver diseases. *Cells* **9**, 837 (2020).
52. Morgan, R. E. *et al.* Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development. *Toxicol Sci* **118**, 485–500 (2010).
53. Schadt, H. S. *et al.* Bile acids in drug induced liver injury: Key players and surrogate markers. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **40**, 257–266 (2016).
54. Foufelle, F. & Fromenty, B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect* **4**, e00211 (2016).
55. Kraskiewicz, H. & Fitzgerald, U. InterFERing with endoplasmic reticulum stress. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 53–63 (2012).
56. Schwarz, D. S. & Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* **73**, 79–94 (2016).
57. Dara, L., Liu, Z. X. & Kaplowitz, N. Mechanisms of adaptation and progression in idiosyncratic drug induced liver injury, clinical implications. *Liver Int* **36**, 158–165 (2016).
58. Jee, A., Sernoskie, S. C. & Uetrecht, J. Idiosyncratic drug-induced liver injury: Mechanistic and Clinical Challenges. *Int J Mol Sci* **22**, 2954 (2021).
59. Kim, S. H. *et al.* Characterization of amoxicillin- and clavulanic acid-specific T cells in patients with amoxicillin-clavulanate-induced liver injury. *Hepatology* **62**, 887–899 (2015).
60. Usui, T. *et al.* Characterization of isoniazid-specific T-Cell clones in patients with anti-tuberculosis drug-related liver and skin Injury. *Toxicol Sci* **155**, 420–431 (2017).
61. Wuillemin, N. *et al.* T cells infiltrate the liver and kill hepatocytes in HLA-B*57:01-associated floxacillin-induced liver injury. *Am J Pathol* **184**, 1677–1682 (2014).
62. Lucena, M. I. *et al.* Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA Class I and II alleles. *Gastroenterology* **141**, 338–347 (2011).
63. Gao, B., Jeong, W. il & Tian, Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* **47**, 729–736 (2008).
64. Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y. L. & Tu, W. $\gamma\delta$ -T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cell Mol Immunol* **10**, 50–57 (2013).

65. Liu, W. *et al.* The Immunological mechanisms and immune-based biomarkers of drug-induced liver injury. *Front Pharmacol* **12**, 723940 (2021).
66. Waddington, J. C., Meng, X., Naisbitt, D. J. & Park, B. K. Immune drug-induced liver disease and drugs. *Curr Opin Toxicol* **10**, 46–53 (2018).
67. Grove, J. I. & Aithal, G. P. Human leukocyte antigen genetic risk factors of drug-induced liver toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **11**, 395–409 (2015).
68. Pichler, W. J. The p-i Concept: Pharmacological interaction of drugs with immune receptors. *World Allergy Organ J* **1**, 96-102 (2008).
69. Illing, P. T. *et al.* Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* **486**, 554–558 (2012).
70. Oge, M. O. *et al.* Exosomal transport of hepatocyte-derived drug-modified proteins to the immune system. *Hepatology* **70**, 1732-1749 (2019).
71. Gerussi, A. *et al.* Immune-mediated drug-induced liver injury: Immunogenetics and experimental models. *Int J Mol Sci* **22**, 4557 (2021).
72. Zhang, Y. & Zheng, J. Functions of immune checkpoint molecules beyond immune evasion. *Adv Exp Med Biol* **1248**, 201–226 (2020).
73. Zheng, M. & Tian, Z. Liver-mediated adaptive immune tolerance. *Front Immunol* **10**, 2525 (2019).
74. Huang, H., Lu, Y., Zhou, T., Gu, G. & Xia, Q. Innate immune cells in immune tolerance after liver transplantation. *Front Immunol* **9**, 2401 (2018).
75. Metushi, I. G., Hayes, M. A. & Uetrecht, J. Treatment of PD-1^{-/-} mice with amodiaquine and anti-CTLA4 leads to liver injury similar to idiosyncratic liver injury in patients. *Hepatology* **61**, 1332–1342 (2015).
76. Zen, Y. & Yeh, M. M. Checkpoint inhibitor-induced liver injury: A novel form of liver disease emerging in the era of cancer immunotherapy. *Semin Diagn Pathol* **36**, 434–440 (2019).
77. Shojaie, L., Ali, M., Iorga, A. & Dara, L. Mechanisms of immune checkpoint inhibitor-mediated liver injury. *Acta Pharm Sin B* **11**, 3727-3739 (2021).
78. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* **14**, e1002533 (2016).
79. Jandhyala, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **21**, 8787-8803 (2015).
80. Rinninella, E. *et al.* What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms* **7**, 14 (2019).
81. Rodríguez, J. M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* **26**, 26050 (2015).
82. Wu, G. D. *et al.* Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* **334**, 105-108 (2011).
83. Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M. & Owen, L. J. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis* **26**, 26191 (2015).
84. Morrison, D. J. & Preston, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**, 189-200 (2016).
85. Donohoe, D. R. *et al.* The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* **13**, 517–526 (2011).
86. Yoshii, K., Hosomi, K., Sawane, K. & Kunisawa, J. Metabolism of dietary and microbial vitamin b family in the regulation of host immunity. *Front Nutr* **6**, 48 (2019).

87. Ellis, J. L. *et al.* Dietary vitamin K is remodeled by gut microbiota and influences community composition. *Gut Microbes* **13**, 1–16 (2021).
88. Guzior, D. v. & Quinn, R. A. Review: microbial transformations of human bile acids. *Microbiome* **9**, 140 (2021).
89. Ramírez-Pérez, O., Cruz-Ramón, V., Chinchilla-López, P. & Méndez-Sánchez, N. The role of the gut microbiota in bile acid metabolism. *Ann Hepatol* **16**, S15–S20 (2017).
90. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H. & Yi, H. Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front Microbiol* **11**, 582779 (2020).
91. Garcia-Gutierrez, E., Mayer, M. J., Cotter, P. D. & Narbad, A. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes* **10**, 1–21 (2019).
92. Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N. & Núñez, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* **14**, 685–690 (2013).
93. Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R. & Goodman, A. L. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature* **570**, 462–467 (2019).
94. Wilson, I. D. & Nicholson, J. K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl Res* **179**, 204–222 (2017).
95. A. Boelsterli, U. & Ramirez-Alcantara, V. NSAID acyl glucuronides and enteropathy. *Curr Drug Metab* **12**, 245–252 (2011).
96. Candeliere, F. *et al.* β -Glucuronidase pattern predicted from gut metagenomes indicates potentially diversified pharmacomicrobiomics. *Front Microbiol* **13**, 826994 (2022).
97. Fu, Z. D., Selwyn, F. P., Cui, J. Y. & Klaassen, C. D. RNA-Seq profiling of intestinal expression of xenobiotic processing genes in germ-free mice. *Drug Metab Dispos* **45**, 1225–1238 (2017).
98. Adolph, T. E., Grander, C., Moschen, A. R. & Tilg, H. Liver–microbiome axis in health and disease. *Trends Immunol* **39**, 712–723 (2018).
99. Zimmermann, P. & Curtis, N. The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota - a systematic review. *J Infect* **79**, 471–489 (2019).
100. Patangia, D. v, Anthony Ryan, C., Dempsey, E., Paul Ross, R. & Stanton, C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiologyopen* **11**, e1260 (2022).
101. Maier, L. *et al.* Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* **555**, 623–628 (2018).
102. Imhann, F. *et al.* Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut* **65**, 740–748 (2016).
103. Mowat, A. M. I. To respond or not to respond — a personal perspective of intestinal tolerance. *Nat Rev Immunol* **18**, 405–415 (2018).
104. Chen, T., Li, R. & Chen, P. Gut microbiota and chemical-induced acute liver injury. *Front Physiol* **12**, 688780 (2021).
105. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* **30**, 16–34 (2011).
106. Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. & Gusovsky, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* **274**, 10689–10692 (1999).
107. Hamesch, k., Borkham-Kamphorst, E., Strnad, P. & Weiskirchen, R. Lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice. *Lab Anim* **49**, 37–46 (2015).

108. Franchi, L. *et al.* NLRC4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nat Immunol* **13**, 449–456 (2012).
109. Al Nabhani, Z. & Eberl, G. Imprinting of the immune system by the microbiota early in life. *Mucosal Immunol* **13**, 183–189 (2020).
110. Singh, R. *et al.* Status of bacterial colonization, Toll-like receptor expression and nuclear factor-kappa B activation in normal and diseased human livers. *Clin Immunol* **138**, 41–49 (2011).
111. Horst, A. K., Neumann, K., Diehl, L. & Tiegs, G. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cell Mol Immunol* **13**, 277–292 (2016).
112. Uhrig, A. *et al.* Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol* **77**, 626–633 (2005).
113. Fontana, R. J. Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives. *Gastroenterology* **146**, 914–928 (2014).
114. Deng, X. *et al.* Modest inflammation enhances diclofenac hepatotoxicity in rats: Role of neutrophils and bacterial translocation. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 1191–1199 (2006).
115. Luo, L. *et al.* Inhibition of inflammatory liver injury by the HMGB1-A box through HMGB1/TLR-4/NF- κ B signaling in an acute liver failure mouse model. *Front Pharmacol* **13**, 990087 (2022).
116. Sun, J. *et al.* Gut microbiota participates in antithyroid drug induced liver injury through the lipopolysaccharide related signaling pathway. *Front Pharmacol* **11**, 598170 (2020).
117. Clayton, T. A., Baker, D., Lindon, J. C., Everett, J. R. & Nicholson, J. K. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14728–14733 (2009).
118. Yip, L. Y. *et al.* The liver–gut microbiota axis modulates hepatotoxicity of tacrine in the rat. *Hepatology* **67**, 282–295 (2018).
119. Thulin, P. *et al.* Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver Int* **34**, 367–378 (2014).
120. Church, R. J. *et al.* Candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of drug-induced liver injury: an international collaborative effort. *Hepatology* **69**, 760–773 (2019).
121. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350–355 (2004).
122. Condrat, C. E. *et al.* miRNAs as biomarkers in disease: Latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells* **9**, 276 (2020).
123. Ardekani, A. M. & Naeini, M. M. The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna J Med Biotechnol* **2**, 161–179 (2010).
124. Schueller, F. *et al.* The role of miRNAs in the pathophysiology of liver diseases and toxicity. *Int J Mol Sci* **19**, 261 (2018).
125. Eguchi, A., Wree, A. & Feldstein, A. E. Biomarkers of liver cell death. *J Hepatol* **60**, 1063–1074 (2014).
126. Hayes, J. D., Flanagan, J. U. & Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 51–88 (2005).
127. Czuczejko, J., Mila-Kierzenkowska, C. & Szewczyk-Golec, K. Plasma α -Glutathione S-Transferase evaluation in patients with acute and chronic liver injury. *Can J Gastroenterol Hepatol* **2019**, 5850787 (2019).

128. Smith, G. S., Walter, G. L. & Walker, R. M. Clinical pathology in non-clinical toxicology testing. In *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (eds. Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., Wallig, M. A.) 565–594 (Elsevier, USA, 2013).
129. Si, J. *et al.* Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Med Sci Monit* **26**, e919159 (2020).
130. Del Prete, A., Scutera, S., Sozzani, S. & Musso, T. Role of osteopontin in dendritic cell shaping of immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **50**, 19–28 (2019).
131. Lund, S. A., Giachelli, C. M. & Scatena, M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal* **3**, 311–322 (2009).
132. Wen, Y., Jeong, S., Xia, Q. & Kong, X. Role of osteopontin in liver diseases. *Int J Biol Sci* **12**, 1121–1128 (2016).
133. Cabiati, M. *et al.* Osteopontin in hepatocellular carcinoma: A possible biomarker for diagnosis and follow-up. *Cytokine* **99**, 59–65 (2017).
134. Liu, L. *et al.* Serum osteopontin is a predictor of prognosis for HBV-associated acute-on-chronic liver failure. *Biomed Rep* **8**, 166–171 (2018).
135. Srungaram, P. *et al.* Plasma osteopontin in acute liver failure. *Cytokine* **73**, 270–276 (2015).
136. McKinnon, K. M. Flow cytometry: An overview. *Curr Protoc Immunol* **120**, 5.1.1–5.1.11 (2018).
137. Chen, W. & Luu, H. S. Immunophenotyping by multiparameter flow cytometry. *Methods Mol Biol* **1633**, 51–73 (2017).
138. Cordone, I. *et al.* Brain stereotactic biopsy flow cytometry for central nervous system lymphoma characterization: advantages and pitfalls. *J Exp Clin Cancer Res* **35**, 128 (2016).
139. Broeren, M., Nowacki, R., Halbertsma, F., Arents, N. & Zegers, S. Urine flow cytometry is an adequate screening tool for urinary tract infections in children. *Eur J Pediatr* **178**, 363–368 (2019).
140. Rico, L. G., Salvia, R., Ward, M. D., Bradford, J. A. & Petriz, J. Flow-cytometry-based protocols for human blood/marrow immunophenotyping with minimal sample perturbation. *STAR Protoc* **2**, 100883 (2021).
141. Foureau, D. M. *et al.* Comparative analysis of portal hepatic infiltrating leucocytes in acute drug-induced liver injury, idiopathic autoimmune and viral hepatitis. *Clin Exp Immunol* **180**, 40–51 (2015).
142. Shi, Q., Hong, H., Senior, J. & Tong, W. Biomarkers for drug-induced liver injury. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **4**, 225–234 (2010).
143. Estevez, J. *et al.* Differential serum cytokine profiles in patients with chronic hepatitis B, C, and hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* **7**, 11867 (2017).
144. Papic, N. *et al.* Distinct cytokine profiles in severe COVID-19 and non-alcoholic fatty liver disease. *Life (Basel)* **12**, 795 (2022).
145. Lai, R. *et al.* Protective effect of Th22 cells and intrahepatic IL-22 in drug induced hepatocellular injury. *J Hepatol* **63**, 148–155 (2015).
146. Damhorst, G. L., Adelman, M. W., Woodworth, M. H. & Kraft, C. S. Current capabilities of gut microbiome-based diagnostics and the promise of clinical application. *J Infect Dis* **223**, S270–S275 (2021).
147. Manor, O. *et al.* Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nat Commun* **11**, 5206 (2020).
148. DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A. & Mizoguchi, E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis* **22**, 1137–1150 (2016).

149. Ponziani, F. R. *et al.* Hepatocellular carcinoma is associated with gut microbiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **69**, 107–120 (2019).
150. Bastian, W. P., Hasan, I., Lesmana, C. R. A., Rinaldi, I. & Gani, R. A. Gut microbiota profiles in nonalcoholic fatty liver disease and its possible impact on disease progression evaluated with transient elastography: Lesson learnt from 60 cases. *Case Rep Gastroenterol* **13**, 125-133 (2019).
151. Mandelia, C. *et al.* Plasma cytokeratin-18 level as a novel biomarker for liver fibrosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **63**, 181-187 (2016).
152. He, L. *et al.* Diagnostic value of CK-18, FGF-21, and related biomarker panel in nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int* **2017**, 9729107 (2017).
153. Tada, T. *et al.* Predictive value of cytokeratin-18 fragment levels for diagnosing steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **33**, 1451–1458 (2021).
154. Gonzalez-Quintela, A. *et al.* Serum cytokeratins in alcoholic liver disease: contrasting levels of cytokeratin-18 and cytokeratin-19. *Alcohol* **38**, 45-49 (2006).
155. Antoine, D. J. *et al.* Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology* **58**, 777-787 (2013).
156. Macdonald, S. *et al.* Cell death markers in patients with cirrhosis and acute decompensation. *Hepatology* **67**, 989-1002 (2018).
157. Maina, I. *et al.* α -Glutathione S -Transferase: A new biomarker for liver injury? *J Appl Lab Med* **1**, 119-128 (2016).
158. Rissin, D. M. *et al.* Polymerase-free measurement of microRNA-122 with single base specificity using single molecule arrays: Detection of drug-induced liver injury. *PLoS One* **12**, e0179669 (2017).
159. Cummings, J. *et al.* Preclinical evaluation of M30 and M65 ELISAs as biomarkers of drug induced tumor cell death and antitumor activity. *Mol Cancer Ther* **7**, 455-463 (2008).
160. Donaghy, L. *et al.* Clinical and laboratory features and natural history of seronegative hepatitis in a nontransplant centre. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **25**, 1159–1164 (2013).
161. Lee, J. *et al.* Accuracy of cytokeratin 18 (M30 and M65) in detecting non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **15**, e0238717 (2020).
162. Korver, S. *et al.* The application of cytokeratin-18 as a biomarker for drug-induced liver injury. *Arch Toxicol* **95**, 3435-3448 (2021).
163. Dear, J. W. *et al.* Risk stratification after paracetamol overdose using mechanistic biomarkers: results from two prospective cohort studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **3**, 104-113 (2018).
164. U.S. Food & Drug Administration. DDT-BMQ-000113, Safety biomarker to identify drug-induced liver injury biomarker panel. <https://fda.force.com/ddt/s/ddt-project?ddtprojectid=138>. Consultado el día 11 de julio, 2022.
165. Wang, X., He, Y., Mackowiak, B. & Gao, B. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut* **70**, 784–795 (2021).
166. Lewis, P. J. S. *et al.* Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology* **54**, 1767–1776 (2011).

167. Zhang, Y. *et al.* Diagnostic accuracy and prognostic significance of osteopontin in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a Meta-analysis. *Biomarkers* **27**, 13–21 (2022).
168. Nagoshi, S. Osteopontin: Versatile modulator of liver diseases. *Hepatol Res* **44**, 22-30 (2014).
169. Arai, M. *et al.* Serum osteopontin levels in patients with acute liver dysfunction. *Scand J Gastroenterol* **41**, 102-110 (2006).
170. Björnsson, E. S. *et al.* A new framework for advancing in drug-induced liver injury research. The Prospective European DILI Registry. *Liver Int* **43**, 115-126 (2023).
171. Czaja, A. J. Under-evaluated or unassessed pathogenic pathways in autoimmune hepatitis and implications for future management. *Dig Dis Sci* **63**, 1706–1725 (2018).
172. Tanaka, A., Leung, P. S. C. & Gershwin, M. E. Pathogen infections and primary biliary cholangitis. *Clin Exp Immunol* **195**, 25-34 (2019).
173. Chung, B. K. & Hirschfield, G. M. Immunogenetics in primary sclerosing cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol* **33**, 93–98 (2017).
174. Wikenheiser, D. J. & Stumhofer, J. S. ICOS Co-Stimulation: Friend or foe? *Front Immunol* **7**, 304 (2016).
175. Fife, B. T. & Bluestone, J. A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* **224**, 166–182 (2008).
176. Nourshargh, S. & Alon, R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* **41**, 694–707 (2014).
177. Oo, Y. H., Shetty, S. & Adams, D. H. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig Dis* **28**, 31-44 (2010).
178. Matsubara, T., Anwar, R., Fujiwara, M., Ichiyama, T. & Furukawa, S. CTLA-4 (CD152) expression in peripheral blood T cells in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* **132**, 169–173 (2003).
179. Streiner, D. L. & Norman, G. R. Correction for multiple testing: Is there a resolution? *Chest* **140**, 16–18 (2011).
180. Cotner, T. *et al.* Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *J Exp Med* **157**, 461-472 (1983).
181. Revenfeld, A. L. S., Bæk, R., Jørgensen, M. M., Varming, K. & Stensballe, A. Induction of a regulatory phenotype in CD3⁺ CD4⁺ HLA-DR⁺ T cells after allogeneic mixed lymphocyte culture; Indications of both contact-dependent and -independent activation. *Int J Mol Sci* **18**, 1603 (2017).
182. Baecher-Allan, C., Wolf, E. & Hafler, D. A. MHC Class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol* **176**, 4622–4631 (2006).
183. Monshi, M. M. *et al.* Human leukocyte antigen (HLA)-B*57:01-restricted activation of drug-specific T cells provides the immunological basis for flucloxacillin-induced liver injury. *Hepatology* **57**, 727–739 (2013).
184. Cho, H., Kang, H., Lee, H. H. & Kim, C. W. Programmed cell death 1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) in viral hepatitis. *Int J Mol Sci* **18**, 1517 (2017).
185. Nishimura, H. & Honjo, T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* **22**, 265–268 (2001).
186. Qureshi, O. S. *et al.* Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T Cell activation. *J Biol Chem* **287**, 9429-9440 (2012).

187. Khailaie, S. *et al.* Characterization of CTLA4 trafficking and implications for its function. *Biophys J* **115**, 1330-1343 (2018).
188. Iida, T. *et al.* Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4⁺ T cells. *J Immunol* **165**, 5062–5068 (2000).
189. Li, J. *et al.* Cytokine and autoantibody patterns in acute liver failure. *J Immunotoxicol* **7**, 157–164 (2010).
190. Steuerwald, N. M. *et al.* Profiles of serum cytokines in acute drug-induced liver injury and their prognostic significance. *PLoS One* **8**, e81974 (2013).
191. Schall, T. J., Bacon, K., Camp, R. D. R., Kaspari, J. W. & Goeddel, D. v. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* **177**, 1821-1826 (1993).
192. Bonkovsky, H. L. *et al.* Cytokine profiles in acute liver injury—results from the US Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) and the acute liver failure study group. *PLoS One* **13**, e0206389 (2018).
193. Li, M. *et al.* CCL5 deficiency promotes liver repair by improving inflammation resolution and liver regeneration through M2 macrophage polarization. *Cell Mol Immunol* **17**, 753-764 (2020).
194. Ajuebor, M. N. *et al.* CCR5 Deficiency Drives Enhanced Natural Killer Cell Trafficking to and Activation within the Liver in Murine T Cell-Mediated Hepatitis. *Am J Pathol* **170**, 1975-1988 (2007).
195. Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J. & Goeddel, D. V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**, 669–671 (1990).
196. Ding, B. *et al.* Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature* **505**, 97-102 (2014).
197. Wald, O. *et al.* Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus. *Eur J Immunol* **34**, 1164–1174 (2004).
198. Liepelt, A. & Tacke, F. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a target in liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **311**, G203–G209 (2016).
199. Bachmann, M., Pfeilschifter, J. & Mühl, H. A prominent role of interleukin-18 in acetaminophen-induced liver injury advocates its blockage for therapy of hepatic necroinflammation. *Front Immunol* **9**, 161 (2018).
200. Cueto-Sanchez, A. *et al.* Lymphocyte profile and immune checkpoint expression in drug-induced liver injury: An immunophenotyping study. *Clin Pharmacol Ther* **110**, 1604–1612 (2021).
201. Andrade, R. J. *et al.* Drug-induced liver injury. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 58 (2019).
202. Belkaid, Y. & Hand, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **157**, 121141 (2014).
203. Nistal, E. *et al.* An altered fecal microbiota profile in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) associated with obesity. *Rev Esp Enferm Dig* **111**, 275–282 (2019).
204. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5261-5267 (2007).
205. Hall, M. & Beiko, R. G. 16S rRNA gene analysis with QIIME2. *Methods Mol Biol* **1849**, 113–129 (2018).

206. Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P. & Beiko, R. G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **30**, 3123-3124 (2014).
207. Schloss, P. D. *et al.* Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7537-7541 (2009).
208. Heidrich, B. *et al.* Intestinal microbiota in patients with chronic hepatitis C with and without cirrhosis compared with healthy controls. *Liver Int* **38**, 50–58 (2018).
209. Wei, Y. *et al.* Alterations of gut microbiome in autoimmune hepatitis. *Gut* **69**, 569–577 (2020).
210. Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A. & Elinav, E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol* **17**, 219–232 (2017).
211. Leclercq, S. *et al.* Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 4485-4493 (2014).
212. Silva, H. E. da *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease is associated with dysbiosis independent of body mass index and insulin resistance. *Sci Rep* **8**, 1466 (2018).
213. Bajaj, J. S. *et al.* Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol* **60**, 940–947 (2014).
214. Shi, Y.-C. *et al.* Effects of proton Pump inhibitors on the gastrointestinal microbiota in gastroesophageal reflux disease. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **17**, 52-63 (2019).
215. Lin, S.-H. *et al.* Proton pump inhibitors increase the risk of autoimmune diseases: A nationwide cohort study. *Front Immunol* **12**, 736036 (2021).
216. Weersma, R. K., Zhernakova, A. & Fu, J. Interaction between drugs and the gut microbiome. *Gut* **69**, 1510–1519 (2020).
217. Palleja, A. *et al.* Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat Microbiol* **3**, 1255–1265 (2018).
218. Laborde, E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ* **17**, 1373–1380 (2010).
219. Arriazu, E. *et al.* Signalling via the osteopontin and high mobility group box-1 axis drives the fibrogenic response to liver injury. *Gut* **66**, 1123–1137 (2017).
220. Khambu, B., Yan, S., Huda, N. & Yin, X.-M. Role of high-mobility group box-1 in liver pathogenesis. *Int J Mol Sci* **20**, 5314 (2019).
221. Hu, Y. *et al.* The miR-122 inhibition alleviates lipid accumulation and inflammation in NAFLD cell model. *Arch Physiol Biochem* **127**, 385–389 (2021).
222. Stephens, C., Lucena, M. I. & Andrade, R. J. Genetic risk factors in the development of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **17**, 153–169 (2021).
223. Plüß, M., Tampe, D., Schwörer, H., Bremer, S. C. B. & Tampe, B. Case report: Kinetics of human leukocyte antigen receptor HLA-DR during liver injury induced by potassium para-aminobenzoate as assessed for causality using the updated RUCAM. *Front Pharmacol* **13**, 966910 (2022).
224. Rosenblum, M. D., Way, S. S. & Abbas, A. K. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol* **16**, 90-101 (2016).
225. Arruvito, L. *et al.* Identification and clinical relevance of naturally occurring Human CD8+HLA-DR+ regulatory T cells. *J Immunol* **193**, 4469–4476 (2014).
226. Loetscher, P. *et al.* CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* **391**, 344–345 (1998).

227. Seki, E. *et al.* TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* **13**, 1324–1332 (2007).
228. Yoshimoto, T. *et al.* IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: Synergism with IL-18 for IFN- γ production. *J Immunol* **161**, 3400–3407 (1998).
229. Watkins, P. B. Liver injury due to drugs and viruses: Mechanistic similarities and Implications for AAV Gene Therapy. *Clin Pharmacol Ther* **112**, 751–753 (2022).
230. Fukui, H. Role of gut dysbiosis in liver diseases: What have we learned so far? *Diseases* **7**, 58 (2019).
231. Ren, Z. *et al.* Gut microbiome analysis as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for early hepatocellular carcinoma. *Gut* **68**, 1014–1023 (2019).
232. Abe, K. *et al.* Dysbiosis of oral microbiota and its association with salivary immunological biomarkers in autoimmune liver disease. *PLoS One* **13**, e0198757 (2018).
233. Rühlemann, M. C. *et al.* Faecal microbiota profiles as diagnostic biomarkers in primary sclerosing cholangitis. *Gut* **66**, 753–754 (2017).
234. Kim, S. S. *et al.* Microbiome as a potential diagnostic and predictive biomarker in severe alcoholic hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* **53**, 540–551 (2021).
235. Schwenger, K. J., Clermont-Dejean, N. & Allard, J. P. The role of the gut microbiome in chronic liver disease: the clinical evidence revised. *JHEP Rep* **1**, 214–226 (2019).