



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN
TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD**

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

**“Análisis del perfil inmunitario en el diagnóstico diferencial entre la
hepatotoxicidad idiosincrásica y la
enfermedad hepática esteatósica no alcohólica”**

D. Alberto Manuel García García

Noviembre, 2023

Directores:

Dra. Miren García Cortés

Dr. Eduardo García Fuentes

Tutor:


Dr. Raúl Jesús Andrade Bellido





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Alberto Manuel García García

 <https://orcid.org/0000-0003-0851-6442>

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. Alberto García García

Estudiante del programa de doctorado en Biomedicina, Investigación Traslacional y Nuevas Tecnologías en Salud de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, autor de la tesis presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: "Análisis del perfil inmunitario en el diagnóstico diferencial entre hepatotoxicidad idiosincrásica y la enfermedad hepática esteatótica no alcohólica"

Realizada bajo la dirección de Miren García Cortés y Eduardo García Fuentes, y la tutorización de Raúl Jesús Andrade Bellido

DECLARO 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 27 de noviembre de 2023

Doctorando Alberto Manuel García García Fdo.:	Tutor de tesis Raúl Jesús Andrade Bellido Fdo.:
Directores de tesis Miren García Cortés Fdo.:	Eduardo García Fuentes Fdo.:



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. Raúl Jesús Andrade Bellido

Catedrático de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, Facultativo Especialista de Área y director de la UGC de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga

D^a Miren García Cortés

Profesora asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga y Facultativo Especialista de Área de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga

D. Eduardo García Fuentes

Investigador Nicolás Monardes de la UGC de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga

CERTIFICA/N que D. **Alberto Manuel García García**

ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi tutorización/dirección los datos clínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: “**Análisis del perfil inmunitario en el diagnóstico diferencial entre hepatotoxicidad idiosincrásica y la enfermedad hepática esteatósica no alcohólica**”, 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 que la publicación en coautoría que avala la presentación de esta tesis y cuya referencia es:

Differential iNKT and T Cells Activation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Drug-Induced Liver Injury. Caballano-Infantes E, **García-García A**, López-Gómez C, Cueto A, Robles-Díaz M, Ortega-Alonso A, Martín-Reyes F, Álvarez-Álvarez I, Arranz-Salas I, Ruiz-Cabello F, et al. *Biomedicines*. 2022; 10(1):55

no ha sido utilizada en tesis anteriores ni en la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

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

Málaga, a 27 de noviembre de 2023.

Directora: Miren García Cortés

Director: Eduardo García Fuentes

Tutor: Raúl Jesús Andrade Bellido



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl Andrade y a todo su grupo de investigación, sin los cuales este trabajo no habría sido posible.

A la Dra. Miren García Cortés, la primera persona que me habló de esto y sin cuyo apoyo no habría seguido adelante.

Al Dr. Eduardo García Fuentes, cuya inestimable ayuda en el mundo de la investigación básica me dio luz en momentos de tremenda oscuridad.

A todos mis compañeros del servicio de Aparato Digestivo del Hospital Virgen de la Victoria de Málaga, lugar donde me formé y ejerzo. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y me enseñáis a diario, desde el primer adjunto hasta el último residente.

A mi familia, a mis hermanas mayores y en especial a mis padres. A mi madre Trinidad y mi padre Manuel, por ser mis ejemplos en la vida y el espejo donde me miro cada mañana.

A mi compañera de vida Irene, por su paciencia y perseverancia. Por su apoyo y confianza incondicional. Medio trabajo es suyo.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
A. Daño hepático inducido por fármacos	1
i. Generalidades	1
ii. Epidemiología.....	1
iii. Etiopatogenia	2
iv. Factores de riesgo	6
v. Presentación clínica	10
1. DILI.....	10
2. DISH.....	12
vi. Diagnóstico.....	13
vii. Nuevos biomarcadores.....	16
B. Enfermedad del hígado graso no alcohólico	19
i. Generalidades	19
ii. Epidemiología.....	20
iii. Etiopatogenia	22
iv. Factores de riesgo	24
v. Presentación clínica	25
vi. Diagnóstico.....	26
1. Biopsia hepática.....	26
2. Evaluación no invasiva.....	27
C. Sistema inmune en DILI y EHGNA.....	31
i. Sistema inmune innato.....	33
ii. Sistema inmune adquirido.....	40
II. JUSTIFICACIÓN.....	45
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
A. Pacientes.....	49
B. Variable de estudio.....	51
C. Análisis estadístico.....	57
V. RESULTADOS.....	59

VI. DISCUSIÓN.....	73
VII. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO.....	79
VIII. CONCLUSIONES.....	81
IX. ANEXOS.....	83
A. Documentos.....	83
B. Lista de figuras.....	86
C. Lista de tablas.....	87
D. Diccionario de abreviaturas.....	88
E. Trabajo científico relacionado con la tesis.....	90
1. Publicación científica que avala la tesis	90
2. Comunicaciones a congresos.....	90
X. BIBLIOGRAFÍA.....	91

I. INTRODUCCIÓN

A. Daño hepático inducido por fármacos

i. Generalidades.

El hígado es el responsable de la biotransformación, metabolismo y eliminación de fármacos y agentes potencialmente tóxicos, por este motivo es el principal órgano diana de posibles reacciones adversas derivadas de los mismos.

El daño hepático inducido por fármacos (*Drug Induced Liver Injury, DILI*) es, probablemente, una de las afecciones hepáticas más desconcertante y compleja ya que tiene una expresión fenotípica muy variada, pudiendo mimetizar prácticamente cualquier enfermedad hepática, incluida la enfermedad hepática por depósito de grasa. Puede presentarse de forma aguda o crónica, incluso de forma fulminante [1]. Esto, junto con su baja incidencia, la ausencia de biomarcadores específicos y su potencial gravedad, supone un reto diagnóstico para los hepatólogos y gastroenterólogos en general, quienes deben considerar siempre la posibilidad de DILI ante todo paciente con daño hepático agudo o crónico no explicable por otro motivo. Además, diferentes productos herbales y suplementos dietéticos pueden causarlo y deben ser igualmente considerados [2].

ii. Epidemiología.

Es complicado determinar la incidencia real de DILI. Pese al aumento de la alarma sobre la hepatotoxicidad y la existencia de alternativas menos tóxicas, la frecuencia absoluta de reacciones adversas a los medicamentos no parece disminuir, dado el aumento del número de prescripciones y de agentes farmacológicos disponibles [3-5].

En estudios retrospectivos que vincularon bases de datos de prescripción con eventos clínicos se calculó una incidencia anual de 2,4 casos por 100.000 habitantes [6]. Sin embargo, de acuerdo con estudios prospectivos en países como Francia e Islandia se estima una incidencia anual de 14 y 19/100.000 habitantes respectivamente [4,7].

En ausencia de marcadores específicos de daño tóxico, el diagnóstico se basa principalmente en la sospecha clínica, por lo que es infrecuente en comparación con otras formas de enfermedad hepática. Por esta razón, los estudios epidemiológicos tienden a sobreestimar la incidencia de hepatotoxicidad severa y subestimar el número total, ya que la mayoría de los casos de DILI son asintomáticos [1,2].

Hasta un 10% de los casos de ictericia ingresados en un hospital (hasta un 20% si únicamente se incluyen los pacientes geriátricos) son por causa tóxica [8,9]. En pacientes hospitalizados por distintas causas, la incidencia de hepatitis tóxica (definida como una elevación de las transaminasas por encima de 400 UI/L) se ha calculado en un 1,4%, constituyendo en España el 14% de los casos de lesión hepática que ingresan en un hospital [10].

iii. Etiopatogenia.

Los mecanismos por los que un fármaco o un agente no farmacológico producen lesión hepática pueden ser directos (intrínsecos), indirectos o de tipo idiosincrásico [11].

El **directo o intrínseco** es principalmente dependiente del potencial tóxico del fármaco o su metabolito. Es por tanto predecible, ya que ocurre en una gran proporción de individuos expuestos, reproducible, dosis-dependiente y de inicio temprano tras la toma del medicamento (de horas a días). El ejemplo más representativo lo constituye el paracetamol.

El mecanismo **indirecto** depende de la acción del fármaco, por ejemplo, sobre la inmunidad del huésped, pudiendo reactivar y/o empeorar una enfermedad hepática subyacente como una infección latente por el Virus de la Hepatitis B (VHB), producir una hepatitis inmunomediada o una enfermedad hepática grasa metabólica (*Metabolic Associated Fatty Liver Disease, MAFLD*). Ejemplos de este tipo de hepatotoxicidad son los debidos al rituximab, los inhibidores del punto de control inmunitario o la amiodarona.

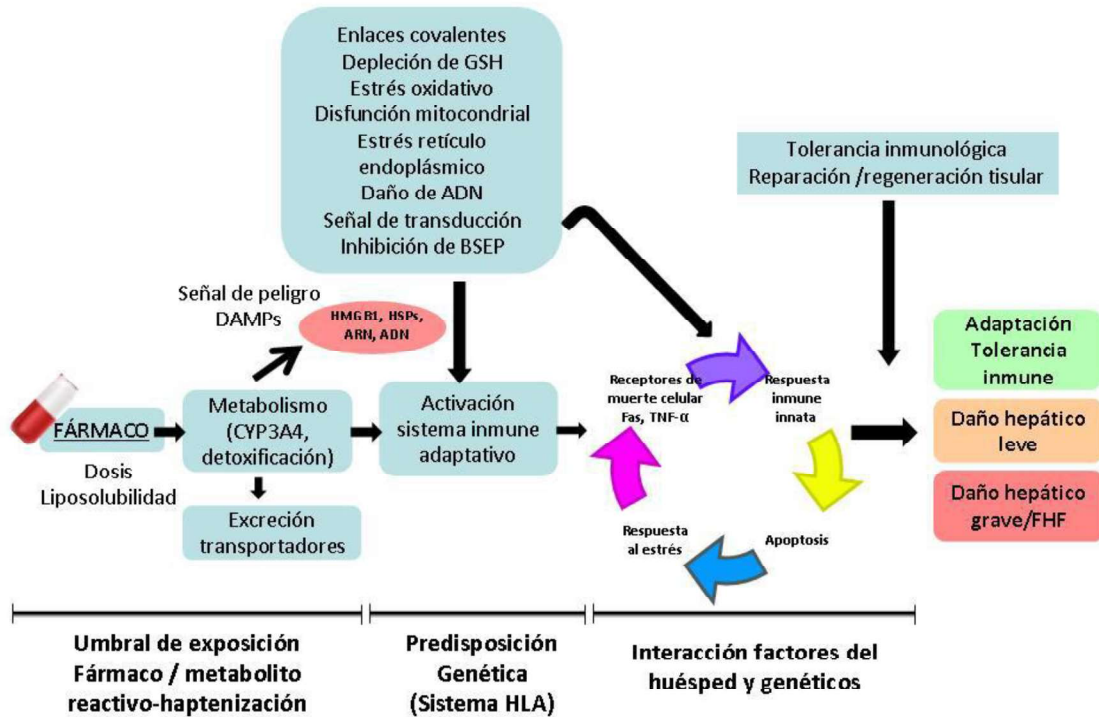
En tercer lugar, el DILI **idiosincrásico (iDILI)** generalmente es poco frecuente, se presenta en una pequeña proporción de pacientes expuestos (no predecible), no es reproducible a nivel experimental, no está totalmente relacionado con la dosis y tiene un periodo de latencia variable de inicio desde días a semanas. Medicamentos responsables de este tipo de hepatotoxicidad son la amoxicilina-clavulánico, el diclofenaco o los macrólidos. Se acepta que el mecanismo subyacente en este tipo de hepatotoxicidad es el resultado de la interacción de las propiedades del fármaco y de factores ambientales en un huésped genéticamente predispuesto.

Los distintos tipos de hepatotoxicidad comparten características comunes, así como importantes diferencias. En todos son cruciales las características bioquímicas del medicamento, en concreto la lipofilia y la biotransformación. El hígado se ve expuesto a metabolitos reactivos que pueden unirse covalentemente a proteínas, inducir estrés oxidativo y activar vías de transducción de señales (por ej. Quinasas MAP (*mitogen activated protein*)) provocando todo ello un estrés en las organelas (por ejemplo, en las mitocondrias o en el retículo endoplasmático). También pueden interferir con el transporte de ácidos biliares (necrosis o apoptosis) o inducir una respuesta adaptativa que amortigüe el daño (defensa antioxidante, biogénesis mitocondrial) [12,13].

Exceptuando la hepatotoxicidad por paracetamol, es poco probable que el estrés celular inducido por un fármaco o sus metabolitos intermedios sea suficiente para producir una lesión hepática clínicamente significativa. Así, probablemente se requieran factores adicionales que sensibilicen a los

hepatocitos a la lesión y amplifiquen el insulto celular para que se produzca hepatotoxicidad idiosincrásica. La respuesta inmunitaria adaptativa podría potencialmente desempeñar este papel. Un estudio amplio del genoma internacional en pacientes con iDILI por amoxicilina-clavulánico demostró que determinados alelos HLA (*human leukocyte antigen*) clase I y II constituían un factor de riesgo de desarrollo del daño hepático y se asociaban a su expresión fenotípica [14,15]. Estos estudios apuntan al carácter inmune de las reacciones hepatotóxicas y han cambiado la concepción mecanística del iDILI poniendo de relieve que el sistema inmunitario adaptativo juega un papel crucial facilitando el reconocimiento de complejos peptídicos fármaco-proteína que, cuando son presentados por las proteínas HLA, pueden inducir una respuesta inmunitaria adaptativa mediada por células T citotóxicas CD8+, que además de liberar factores como perforina, granzima y TNF α (Factor de necrosis tumoral alfa), inducen la muerte de los hepatocitos que presentan el hapteno específico. Además de las proteínas HLA clase I, los haptenos también pueden ser presentados por las proteínas HLA clase II de las células presentadoras de antígeno (CPAs), que conduce a la activación de las células T CD4+ y la estimulación de la respuesta inmunitaria, como la secreción de citocinas y consecuente activación de las células T citotóxicas CD8+.

Por tanto, se cree que la predisposición al DILI con una amplia gama de fármacos estaría vinculada a ser portador del alelo HLA de clase de riesgo que determinaría la presentación del metabolito reactivo haptenido (o la molécula nativa) por las CPAs al sistema inmune adaptativo (hipótesis del hapteno) (Figura 1) [16,17].



Abreviaturas: GSH, glutatión; ADN, ácido desoxirribonucleico; BSEP, bomba transportadora de ácidos biliares; HMGB1, high-mobility group box 1 protein; HSPs, heat shock proteins; ARN, ácido ribonucleico; DAMPs, damage-associated molecular pattern molecules; TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; FHF, fallo hepático fulminante; HLA, human leukocyte antigen.

Figura 1. Mecanismo de DILI y vías implicadas. Adaptado de Chen M et al. J Hepatol. 2015;63(2):503-14.

En numerosas ocasiones es necesario un coestímulo iniciado por la liberación de DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) producido por los metabolitos reactivos que dañan el hepatocito y que a través de los “*toll-like receptors*” de las CPAs inician una inflamación estéril que estimula el sistema inmune innato, el cual libera citoquinas proinflamatorias que a su vez estimulan al sistema inmune adaptativo produciendo una respuesta citotóxica directa o mediada por anticuerpos contra los hepatocitos (hipótesis de la señal de peligro). El sistema inmune innato puede tener un efecto dual coestimulando la respuesta del sistema inmune adaptativo y modulando el grado de inflamación y regeneración. Para numerosos fármacos en los que el riesgo de DILI se asocia a determinados alelos HLA, solo se produciría toxicidad en los sujetos portadores de dichos alelos, pero estarían exentos de riesgo los que carecen de ese perfil genético. Así pues, la carencia de alelos de riesgo en un sujeto que desarrolla una hepatitis cuando se expone al fármaco sospechoso tiene un

alto valor predictivo negativo y podría usarse en una prueba farmacogenética con fines diagnósticos.

Incluso entre aquellos pacientes con asociaciones específicas de HLA, solo una minoría desarrolla DILI. Una posible explicación para esto es que el desarrollo de la tolerancia inmune puede suprimir o modular la gravedad de DILI, de modo que solo aquellos con una respuesta adaptativa insuficiente progresan a daño hepático [18,19].

iv. Factores de riesgo

Si bien los factores genéticos son probablemente los determinantes principales, otros factores, tanto del huésped como del fármaco, son necesarios para el desarrollo de toxicidad hepática (Figura 2). A continuación, se detallan los factores de riesgo dependientes del huésped y del fármaco más importantes:

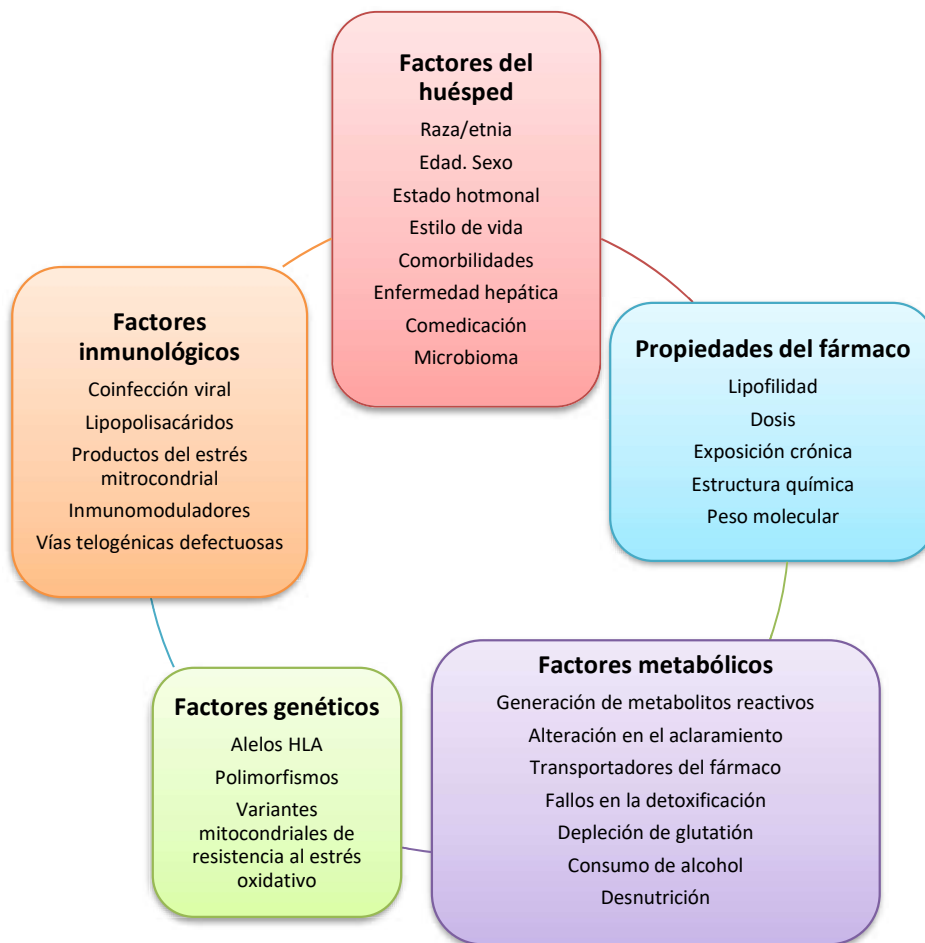


Figura 2. Factores de riesgo más importantes dependientes del huésped y del fármaco.

Edad: Se ha informado que la incidencia de reacciones adversas graves a medicamentos aumenta con la edad [20]. La edad avanzada también se ha propuesto como un factor de riesgo general para DILI. De hecho, la escala de evaluación de CIOMS/RUCAM (*Council for International Organizations of Medical Sciences/Rouse/ Uclaf Casualty Assessment Method*) da un punto extra a los casos que involucran a pacientes mayores de 55 años [21]. En el registro español de Hepatotoxicidad, el 46% de los pacientes tenían ≥ 60 años en el momento del episodio y el United States DILI Network informó que el 18,5% de sus pacientes con DILI tenía 65 años o más [5,22]. Los datos de un estudio poblacional en Islandia demuestran un claro aumento en la incidencia de DILI con el aumento de la edad, por lo que personas entre 15-29 años tuvieron una tasa de incidencia de 9 por 100.000 habitantes que aumentó a 41 por 100.000

para pacientes >70 años. El efecto de la edad sobre la incidencia de DILI también fue paralelo al aumento en el uso de medicamentos, lo que sugiere que la edad *per se* no aumenta el riesgo de DILI si no el hecho de que las personas mayores generalmente toman más medicamentos.

En cambio, las personas con menor edad parecen tener mayor riesgo de DILI por ciertos medicamentos como el ácido valproico, siendo los niños menores de 10 años los que más riesgo tienen de DILI y los menores de 2 años los que presentan el mayor riesgo de desenlace fatal [23,24].

La edad también influye en el fenotipo, presentando las personas de mayor edad una mayor predisposición al patrón de daño colestásico [22,25].

Por tanto, la edad puede considerarse un factor contribuyente que determina la susceptibilidad a DILI secundaria a medicamentos particulares y que contribuye a su fenotipo.

Sexo: La distribución por sexos parece ser similar según los datos epidemiológicos de grandes cohortes de DILI en España, Estados Unidos e Islandia, con un 49%, 59% y 56% de mujeres respectivamente [4,5,22]. En cambio, se ha observado una mayor susceptibilidad femenina para agentes causantes específicos como la minociclina y la nitrofurantoína [26]. Esto puede estar relacionado con el hecho de que estos medicamentos a menudo producen DILI con características autoinmunes y las mujeres son más susceptibles a la hepatitis autoinmune idiopática. Además, la evidencia de varios estudios apoya que las pacientes con DILI pueden tener un mayor riesgo de progresar a fallo hepático agudo (FHA) [27,28].

Raza: Un estudio de cohortes informó de medicamentos causales de DILI significativamente diferentes entre diferentes grupos étnicos. Trimetoprima / sulfametoxazol, metildopa y fenitoína fueron con mayor frecuencia la causa de DILI entre afroamericanos, mientras que amoxicilina-clavulánico fue el agente causante en una proporción significativamente mayor entre caucásicos [25].

Alcohol: Al igual que la edad, el consumo de alcohol se incluye como un factor de riesgo en la escala de evaluación de causalidad CIOMS/RUCAM aportando un punto adicional, aunque no se ha definido un nivel específico de consumo ni demostrado de forma generalizada [21]. El alcohol sí parece ser un factor de riesgo para iDILI por determinados medicamentos como isoniacida, metotrexate y halotano [29].

Comorbilidades: El efecto de las comorbilidades se ha evaluado en relación con la enfermedad del hígado graso asociada a fármacos. La evidencia de estudios bien diseñados indica que los medicamentos en este contexto funcionan sinérgicamente con otros factores de riesgo, contribuyendo a la patogénesis y progresión de la enfermedad hepática. En un ensayo multicéntrico en el que participaron más de 5.000 mujeres, la terapia con tamoxifeno se asoció con un riesgo doble de desarrollar hígado graso durante un período de 5 años con una incidencia de 0,4% por año en el grupo tratado en comparación con 0,2% en el grupo placebo [30]. Esta asociación se restringió a las mujeres con sobrepeso y obesidad, y el mayor riesgo se manifestó dentro de los primeros 2 años de tratamiento. La enfermedad del hígado graso asociada a metotrexato y su gravedad también se han asociado con el exceso de alcohol, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la obesidad [31,32].

Enfermedad hepática crónica: Una revisión que agrupó estudios que incluían terapia antirretroviral e inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos demostró que la enfermedad hepática preexistente, incluida la infección crónica por el VHB o el virus de la hepatitis C (VHC), así como la enfermedad hepática alcohólica y las enzimas hepáticas elevadas antes del inicio de la terapia, eran factores de riesgo para el desarrollo de DILI (definido como elevación de 2-3 veces por encima de la línea de base de la alanino o aspartato aminotransferasa (ALT o AST)) [33].

v. Presentación clínica

1. DILI

La hepatotoxicidad por fármacos es considerada como la gran simuladora ya que puede presentarse tanto como una hepatitis aguda con astenia, ictericia y malestar general, una elevación asintomática de las transaminasas o de las enzimas de colestasis, una insuficiencia hepática grave (10% de las hepatitis agudas y 50% de los FHA) [34,35] o debutar como una cirrosis hepática, enfermedad venooclusiva e incluso una neoplasia [36].

Para considerar un DILI como agudo debe cumplirse uno de los siguientes criterios bioquímicos:

- ALT \geq de 5 veces el Límite Superior de la Normalidad (LSN)
- Fosfatasa Alcalina (FA) \geq de 2 veces el LSN
- ALT \geq de 3 veces el LSN + Bilirrubina total $>$ de 2 veces el LSN

Existen 3 fenotipos de daño hepático idiosincrásico agudo según criterios bioquímicos [11]. El patrón de daño se define usando el valor de R, siendo $R = (\text{ALT paciente}/\text{LSN})/(\text{FA paciente}/\text{LSN})$. Según el resultado del cociente podemos distinguir entre los siguientes fenotipos:

- Hepatocelular: $R \geq 5$
- Mixto: $R < 2$ y > 5
- Colestásico: $R \leq 2$

La llamada “nueva R” detecta con mayor sensibilidad a los pacientes que van a desarrollar FHA. Para su cálculo se utiliza como numerador el valor de ALT o de AST, según cuál sea más elevado [28]. Estos cálculos deben realizarse en la muestra inicial de sangre.

La distribución del tipo de lesión hepática suele ser homogénea en los diferentes registros con un 54-58% de casos hepatocelulares, un 20-23% colestásicos y un 22-23% mixtos [3,5].

La lesión **hepatocelular** aguda se define, por tanto, como una ALT ≥ 5 veces el LSN o una R ≥ 5 . Es más frecuente en mujeres jóvenes y pueden coexistir manifestaciones de hipersensibilidad como exantema cutáneo, fiebre o eosinofilia. Histológicamente, pueden encontrarse grados variables de inflamación y necrosis, pero el predominio centrolobulillar de las lesiones y la presencia de un infiltrado inflamatorio rico en eosinófilos sugieren una etiología tóxica [36].

La lesión **colestásica** aguda se define como una FA ≥ 2 veces el LSN o una R ≤ 2 . Este tipo de daño es más frecuente en varones y edades avanzadas. Se clasifica en dos subtipos: colestasis pura, “blanda” o canalicular y hepatitis aguda colestásica o hepatocanalicular. La variedad canalicular a menudo debuta con un cuadro de ictericia y prurito y se caracteriza por un incremento en la bilirrubina conjugada, FA y gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT) con alteración mínima o nula de las transaminasas. Desde el punto de vista histológico presenta una colestasis hepatocitaria y canálculos biliares dilatados con trombos de bilis, sin evidencia de necrosis o inflamación, y el curso es benigno con recuperación completa y sin secuelas. Este tipo de lesión es característica de los anticonceptivos y esteroides anabolizantes. En el daño hepatocanalicular puede existir dolor abdominal y fiebre que simula la obstrucción biliar aguda y con frecuencia manifestaciones asociadas de hipersensibilidad. Histológicamente puede evidenciarse una inflamación portal y ductal y necrosis hepatocitaria junto a marcada colestasis de predominio centrolobulillar. Entre los fármacos implicados en este subtipo se encuentra la amoxicilina-clavulánico, los macrólidos y las fenotiazinas. En algunos casos puede instaurarse un síndrome de desaparición de los conductos biliares, con colestasis persistente e incluso cirrosis biliar, siendo el fármaco prototipo la clorpromazina [36,37].

Se emplea el término de **daño hepático mixto** cuando las alteraciones clínicas y de laboratorio se sitúan en un rango intermedio entre las de tipo hepatocelular y colestásico (R entre 2 y 5). En este tipo de lesión, son más frecuentes las manifestaciones de alergia farmacológica. Casi todos los fármacos que inducen hepatitis colestásica pueden causar asimismo una lesión mixta [36].

Para establecer un cuadro como crónico previamente se había establecido que debía durar más de 3 meses en el caso del patrón hepatocelular y 6 meses en el colestásico y mixto [38]. Sin embargo, un estudio prospectivo de historia natural mostró que hasta un 8% de los casos persisten con alteración analítica durante el primer año de seguimiento [39] y este punto de corte temporal se considera actualmente en los consensos como el más adecuado para distinguir los pacientes crónicos de aquellos que tienen una resolución prolongada (más de 3 meses en casos hepatocelulares y más de seis en casos colestásicos y mixtos), independientemente de su fenotipo de lesión [37]. Por otro lado, una elevación de bilirrubina total (>2,8 veces el LSN) y de FA (>1,1 veces el LSN) que se mantiene más de 2 meses desde el inicio del cuadro es altamente predictivo de cronicidad en hepatotoxicidad [39].

2. Esteatohepatitis inducida por fármacos (DISH)

Se estima que sólo el 2% de las enfermedades hepáticas por depósito de grasa son secundarias a medicamentos [40]. Sin embargo, se cree que al igual que otras formas de hepatotoxicidad, esta prevalencia está subestimada y que un número actualmente desconocido de pacientes diagnosticados de esteatosis hepática puede ser secundario a fármacos. Además, la interrelación entre hepatotoxicidad, alcohol, enfermedad hepática grasa y síndrome metabólico es compleja y difícil de discernir ya que probablemente compartan mecanismos patogénicos. En este sentido, se ha sugerido que la presencia de enfermedad hepática grasa o de sus factores etiológicos pueda aumentar el riesgo de hepatotoxicidad y/o influir en su evolución.

Hay diversos fármacos relacionados con el desarrollo de enfermedad hepática por depósito de grasa, bien de forma directa debido fundamentalmente a la toxicidad mitocondrial como amiodarona, tamoxifeno, maleato de perhexilina y dietilaminoetoxihexestrol o de forma indirecta [41]. Por otro lado, el patrón histológico de la enfermedad es también variable ya que los fármacos pueden producir distintos tipos de depósito graso en el hígado: la esteatosis macrovesicular, generalmente reversible y similar a la relacionada con el alcohol y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA); la esteatosis microvesicular que está en relación con la inhibición de la β -oxidación de los ácidos grasos (AGs) en las mitocondrias; y la fosfolipidosis, caracterizada por el acúmulo intracelular de fosfolípidos y aparición de cuerpos lamelares [42]. El problema es que es difícil diferenciar entre la EHNA, la esteatohepatitis alcohólica y la inducida por fármacos ya que no existen pruebas diagnósticas, biomarcadores ni datos patonogmónicos de hepatotoxicidad que ayuden a diferenciar estas entidades; por lo que la valoración de causalidad de casos con sospecha de hepatotoxicidad en pacientes con EHNA o con síndrome metabólico y en pacientes que ingieren alcohol es sumamente difícil, especialmente cuando cursan con elevación de enzimas de citolisis. Además, un porcentaje no desdeñable de pacientes con diagnóstico de hepatotoxicidad presenta datos de esteatosis en combinación con otros tipos de lesiones en la biopsia hepática [43]. Si este hallazgo es debido a la presencia previa de grasa o si es secundario a la acción del fármaco es imposible de conocer con los datos disponibles en la actualidad [44].

vi. Diagnóstico

La ausencia de biomarcadores, marcadores clínicos o anatomopatológicos específicos de toxicidad hepática conlleva demoras en el diagnóstico y hace que aun hoy el diagnóstico sea por exclusión de otras etiologías.

Por tanto, el diagnóstico de hepatotoxicidad se sustenta en una serie de puntos clave como la realización de una anamnesis exhaustiva en busca de

tóxicos, la exclusión de causas alternativas de daño hepático (Tabla 1), las características bioquímicas e histológicas comentadas previamente, la relación temporal entre el inicio del tratamiento y la aparición de la enfermedad, la mejoría tras la retirada del fármaco con potencial tóxico o la reaparición de las alteraciones con la reintroducción del mismo, fenómeno comúnmente conocido como *rechallenge* [45].

Enfermedades	Test/características clínicas
Hepatitis virales	Serología viral: <ul style="list-style-type: none"> • IgM anti-VHA • IgM anti-HBc • Anti-VHC, RNA-VHC (RT-PCR) • IgM-CMV • IgM-VEB • VHE (IgM, PCR)
Hepatitis bacterianas	Serología bacteriana: si fiebre persistente, diarrea (<i>Salmonella, Campylobacter, listeria, Coxiella</i>)
Sífilis secundaria	Serología sífilis, FA muy elevada
Hepatopatía alcohólica	AST/ALT>2, VCM y GGT incrementados
Hepatitis autoinmune Colangitis biliar primaria	Autoanticuerpos (ANA, ANCA, AMA, ASMA, anti-LKM1)
Enfermedad de Wilson	Ceruloplasmina, cobre en orina de 24 horas
Déficit de alfa-1antitripsina	Alfa-1 Antitripsina
Hemocromatosis	Saturación de transferrina (en daño hepatocelular anictérico)
Hepatitis isquémica Hepatopatía congestiva	Hipotensión, shock, insuficiencia cardíaca Enfermedad vascular, ancianos
Obstrucción biliar	Técnicas de imagen: radiológicas/endoscópicas Ecografía abdominal, TC, colangiorresonancia, CPRE
<p><i>Abreviaturas: Anti-VHA, anticuerpo virus hepatitis A; Anti-HBc, anticuerpo hepatitis B core; Anti-VHC, anticuerpo hepatitis C; VHE, virus hepatitis E; anti-LKM-1, hígado-riñón anticuerpo microsomal tipo1; AMA, anticuerpo antimitocondrial; ANA, anticuerpo antinuclear; ANCA, anticuerpo antineutrófilo citoplasmático; ASMA, anticuerpo antimúsculo liso; CMV, citomegalovirus; VEB, virus Epstein-Barr; CPRE, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica; TC, tomografía computarizada; VCM, volumen corpuscular medio; GGT, gamma glutamil transpeptidasa</i></p>	

Tabla 1. Principales causas de enfermedad hepática a excluir antes de considerar un diagnóstico de hepatotoxicidad.

Finalmente, entre las escalas de evaluación de causalidad de hepatotoxicidad, la que mayor precisión ha demostrado es la escala de CIOMS/RUCAM (Tabla 2) cuyo resultado se expone en forma de categorías de probabilidad [46,47]. Sin embargo, esta escala tiene ciertas limitaciones que la hacen subóptima para su aplicación en la enfermedad hepática grasa inducida por fármacos y en pacientes con EHNA y sospecha de hepatotoxicidad [45,48].

Patrón enzimático	CRITERIO					
	Hepatoceular			Colestásico		
Exposición	Inicial	Subsecuente	PUNTOS	Inicial	Subsecuente	PUNTOS
Tiempo (días) desde el inicio del fármaco	5-90	1-15	+2	5-90	1-90	+2
	<5 o >90	>15	+1	<5 o >90	>90	+1
Tiempo (días) desde que suspendió el fármaco	≤15	≤15	+1	≤30	≤30	+1
Curso	Diferencia entre valor máximo de ALT y límite superior normal			Diferencia entre valor máximo de FA y límite superior normal		
Posterior a suspender el fármaco	Disminución ≥50% en 8 días			Disminución ≥50% en <180 días		
	Disminución ≥50% en 30 días			Disminución <50% en <180 días		
	Disminución ≥50% en >30 días			Persistencia, incremento o no se tienen datos		
	Disminución <50% en >30 días			0		
Factor de riesgo	Consumo positivo de etanol			Consumo de etanol o embarazo		
	Consumo negativo de etanol			Consumo de etanol o embarazo negativos		
Edad	≥ 55 años			≥ 55 años		
	< 55 años			< 55 años		
Otros fármacos	Ninguno o se desconoce			Ninguno o se desconoce		
	Fármaco con contribución sugestiva			Fármaco con contribución sugestiva		
	Hepatotoxina conocida con contribución sugestiva			Hepatotoxina conocida con contribución sugestiva		
	Fármaco con evidencia de contribución			Fármaco con evidencia de contribución		
Otras causas	Se descartan todas del grupo I y II*			Se descartan todas del grupo I y II*		
	Se descartan todas del grupo I			Se descartan todas del grupo I		
	Se descartan 4-5 del grupo I			Se descartan 4-5 del grupo I		
	Se descartan <4 del grupo I			Se descartan <4 del grupo I		
	Causa no farmacológica altamente probable			Causa no farmacológica altamente probable		
Información previa	Reacción en la etiqueta del producto			Reacción en la etiqueta del producto		
	Reacción publicada, no en la etiqueta			Reacción publicada, no en la etiqueta		
	Reacción desconocida			Reacción desconocida		
Reinicio del fármaco	Positivo			Positivo		
	Compatible			Compatible		
	Negativo			Negativo		
	No interpretable o no realizado			No interpretable o no realizado		
*Causas grupo I (VHA, VHB, VHC, obstrucción biliar, hepatitis aguda alcohólica, hipotensión reciente) y grupo II (otra patología subyacente, CMV, VEB, VHS)						
Interpretación de la puntuación: Altamente probable >6; Probable 6 a 8; Posible 3 a 5; Improbable 1 a 3; se excluye <0.						

Tabla 2. Evaluación de causalidad de un fármaco en caso de daño hepático agudo (Escala de CIOMS). Adaptado de Danan G, Benichou C. J Clin Epidemiol. England: 1993;1323-30.

Recientemente se ha desarrollado la escala RECAM utilizando datos de la Red de Lesiones Hepáticas Inducidas por Fármacos (DILIN) y del Registro Español de DILI, bibliografía publicada y modelos informáticos interactivos. La mayor objetividad y claridad de RECAM mejorará la precisión, fiabilidad y estandarización del diagnóstico de DILI, pero se necesita un mayor refinamiento y validación en otras cohortes [49].

vii. Nuevos biomarcadores

Por lo tanto, es preciso elaborar métodos que incluyan no sólo datos clínicos, bioquímicos y/o histológicos, sino también biomarcadores inmunológicos, genéticos y epigenéticos.

Como se comentó anteriormente, los tests **genéticos** basados en estudios amplios del genoma (*genome-wide association studies, GWAS*) han encontrado asociaciones significativas en casos de DILI. Los alelos HLA de riesgo (tabla 3) por su alto valor predictivo negativo (su ausencia disminuye la probabilidad de hepatotoxicidad), podrían ser usados con la finalidad de excluir el diagnóstico de DILI si se carece de los mismos o señalar a un fármaco determinado en casos de comedicación [50]. No obstante, este abordaje es inaccesible por el momento en la mayoría de los escenarios clínicos.

HLA	% de positivos en casos de DILI	% de positivos en población normal
DRB1*15:01	57%-67% (Amoxicilina-clavulanico)	15%-20%
B*57:01	84%-87% (Flucloxacilina)	6%
A*31:01	17% (Carbamazepina)	2%
DRB1*16:01-DQB1*05:02	25% (Flupirtina)	1%
A*33:01	80% (Ticlopidina) 50% (Metildopa) 50% (Enalapril) 43% (Fenofibrato) 43% (Terbinafina) 40% (Sertralina) 20% (Eritromicina)	1%
B*35:02	16% (Minociclina)	0.6%

Tabla 3. Principales alelos de riesgo para DILI.

En la figura 3 se muestran los principales marcadores epigenéticos y mecánicos disponibles en la actualidad

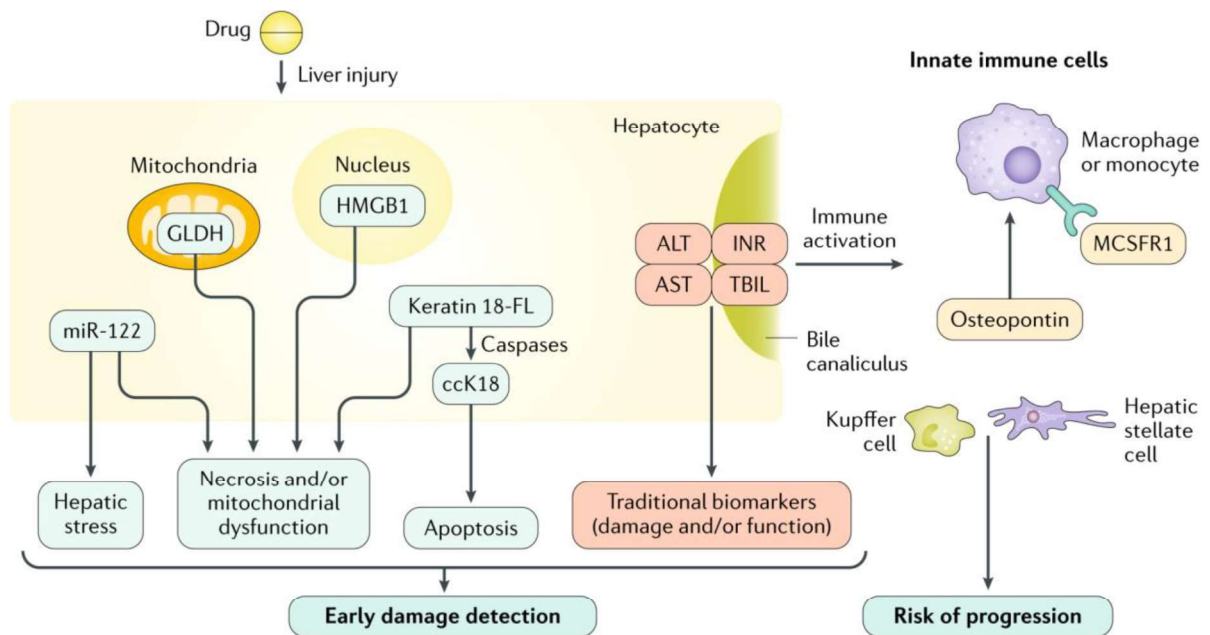


Figura 3. Principales marcadores epigenéticos y mecánicos en DILI. Modificado de Andrade et al. Nature Rev Dis Primers 2019

Entre los marcadores **epigenéticos** están en auge los microRNAs (miR), RNA de cadena sencilla de 21-23 nucleótidos que regulan la expresión génica a nivel epigenético, transcripcional y post-transcripcional. A su vez influyen en la proliferación celular, diferenciación, metabolismo, progresión de enfermedades infecciosas y no infecciosas, apoptosis y metástasis [51]. Entre estos miRs, el miR-122 es propio de las especies de vertebrados y es altamente expresado en el hígado ya que corresponde al 70% de todos los miRs, siendo importante para el funcionamiento del hepatocito. Además, se expresa de forma mínima en otros órganos [52]. El miR-122 regula varios genes implicados en el control del ciclo celular, diferenciación, proliferación y apoptosis en el hígado. Se ha implicado en el metabolismo de AGs en estudios con ratones, y su aumento en plasma se ha relacionado con el grado de fibrosis en la enfermedad hepática grasa, hepatitis virales por virus de la hepatitis B y C y como marcador de daño hepático en ratones y en humanos con hepatotoxicidad [53,54].

La utilidad de miR-122 en este contexto fue reportada por primera vez por Wang y sus colaboradores en 2009 [55], quienes demostraron que el miR-122 circulante estaba elevado en el plasma de ratones en los que se inducía un daño hepático agudo por acetaminofeno (APAP). Curiosamente, estas elevaciones precedieron a aumentos significativos en los niveles circulantes de transaminasas. En los últimos 10 años, las alteraciones de los niveles de miR-122 circulantes han sido observadas en pacientes con DILI, EHNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), carcinoma hepatocelular (CHC), hepatitis autoinmune y hepatitis viral.

En la actualidad se han descrito multitud de biomarcadores **mecanísticos** para el DILI, si bien debido a su baja prevalencia y a su capacidad de mimetizar casi cualquier afección hepatobiliar, resulta difícil el desarrollo de biomarcadores específicos. En la actualidad, el único biomarcador específico propuesto es el acetaminofeno **cisteína** derivada de proteínas (APAP-CYS), útil para detectar la sobredosis de APAP [56].

La glutamato deshidrogenasa (**GLDH**) es una enzima de matriz mitocondrial que muestra su mayor expresión en el tejido hepático [57] y se ha utilizado como biomarcador mecanístico de daño mitocondrial y para la predicción del resultado del DILI. Debido a la especificidad hepática de la GLDH, la medición de sus niveles puede diferenciar la lesión hepática de la muscular, siendo un marcador útil cuando la ALT está elevada [58]. Aunque útil, su sensibilidad como biomarcador diagnóstico es pobre, ya que existe controversia sobre su exactitud para predecir la necrosis hepatocitaria [59,60].

La queratina-18 (**K18**) es una proteína estructural del citoesqueleto que se puede presentar en dos formas; una contiene toda la proteína y otra es un fragmento escindido de la misma por la caspasa (*caspase cleaved keratin 18*, **ccK18**). Ambas formas están elevadas en la circulación después de DILI, mostrando potencial para su uso pronóstico [59]. Durante la necrosis hepatocelular, la K18 se libera pasivamente de las células necróticas a la sangre. Por otro lado, cuando se produce la apoptosis, las caspasas escinden la K18 y la liberan a la sangre. Por lo tanto, el daño temprano de los

hepatocitos podría detectarse midiendo los niveles de K18 (indicador de necrosis) y ccK18 (indicador de apoptosis) [61]. A pesar de que los niveles séricos proporcionales de K18 y ccK18 pueden ser indicadores útiles de DILI, también se encuentran niveles elevados de esta proteína en pacientes con hepatitis hipóxica, esteatohepatitis alcohólica, EHNA y otros trastornos relacionados [59] en los que puede haber inflamación hepática.

Otros biomarcadores que se han propuesto para el diagnóstico y pronóstico de DILI son la proteína **HMGB1** (*high mobility group box 1*), el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos y la **OPN** (osteopontina).

B. Enfermedad del hígado graso no alcohólico

i. Generalidades

La EHGNA, renombrada en los últimos años por algunos autores como MAFLD, y más recientemente como MASLD (*metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*) o en castellano EHmet (esteatosis hepática metabólica) cuando se asocia con, a al menos, un criterio cardiometabólico (tabla 4), incluye un amplio espectro de lesiones histológicas desde esteatosis simple (ES) a EHNA con riesgo de progresión a cirrosis y desarrollo de CHC. Esta enfermedad se caracteriza por el depósito hepatocitario de triglicéridos y se define como la presencia de esteatosis macrovesicular mayor o igual al 5% en ausencia de consumo significativo de alcohol (>30 g/día en los varones y >20 g/día en las mujeres) y el uso de medicamentos que inducen esteatosis [62]. La EHGNA es parte de una enfermedad multisistémica que afecta a órganos extrahepáticos y vías reguladoras y que se puede considerar la manifestación hepática del síndrome metabólico, asociado en un porcentaje importante de casos a obesidad, DM2, dislipidemia y resistencia a la insulina (RI).

Criterios en adultos (al menos 1 de 5)
<ul style="list-style-type: none"> · IMC \geq 25 kg/m² (23 para Asia) o CC > 94cm en varones / 80cm en mujeres · Glucosa sérica en ayunas \geq 100mg/dL o \geq 140mg/dL 2h post carga o una HbA1c \geq 5,7% o DM2 o tratamiento para la DM2 <ul style="list-style-type: none"> · Tensión arterial > 130/50mmHg o tratamiento antihipertensivo · Triglicéridos plasmáticos > 150mg/dL o tratamiento hipolipemiante · HDL plasmático < 40mg/dL en hombres / < 50mg/dL en mujeres o tratamiento hipolipemiante

Tabla 4. Criterios cardiometabólicos para el diagnóstico de EHmet. Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia de cintura; DM2, Diabetes Mellitus tipo 2; HDL, *high density lipoprotein*.

ii. Epidemiología

Determinar la prevalencia y la incidencia de la EHGNA en la población general supone un gran reto. La variedad de métodos comúnmente utilizados para diagnosticar y clasificar la gravedad de la enfermedad dificulta la comparación entre estudios. Esta entidad se ha convertido en la principal causa de enfermedad hepática crónica en el mundo occidental, afectando al 17-46% de los adultos, lo que varía según el método de diagnóstico utilizado, la edad, el sexo y la etnia [63]. Se prevé que ocupe el primer puesto en la indicación de trasplante hepático en los próximos 10 años. Recientemente, Younossi y sus colaboradores proporcionaron estimaciones de la prevalencia de la EHGNA y EHNA a nivel global y regional. Se estima que la prevalencia global de la EHGNA es de 25% (95% IC: 22-29), con la prevalencia más alta en el Medio Oriente (32%, 95% IC: 13-58) y Sur América (30%, 95% IC: 23-39) y la más baja en África (13%, 95% IC: 6-29). Se estima que la prevalencia de la EHNA entre los pacientes con EHGNA diagnosticados con biopsia es de 63% (95% IC: 48-77) en Asia, 69% (95% IC: 56-80) en Europa y 61% (95% IC: 50-71) en Norte América [64].

En España, se estima que la prevalencia de EHGNA diagnosticada mediante criterios ecográficos es del 25,8% en individuos de edades comprendidas entre 15 y 85 años, siendo los pacientes mayores de 45 años los que tienen mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad [65]. En un editorial publicado por Caballería y colaboradores se estimó una prevalencia de EHNA de entre el 1,5% y el 3% [66].

No obstante, se espera un aumento significativo en la prevalencia de EHGNA, EHNA y fibrosis avanzada para 2030. En España se estima que, en 2030, la prevalencia de EHGNA podría llegar a ser del 27,6%, afectando a 12,7 millones de personas. Asimismo, se ha pronosticado que la proporción de personas con EHNA entre la población con EHGNA aumentará en las próximas décadas debido al envejecimiento de la población y la creciente prevalencia de DM2, ascendiendo hasta el 5,9% en España [67].

Su frecuencia y gravedad son paralelas a la prevalencia del síndrome metabólico y sus componentes. La EHGNA se da también en un 7% de las personas de peso normal (delgadas) [68], con una mayor frecuencia en las mujeres jóvenes y con enzimas hepáticas normales. No obstante, su hepatopatía puede ser progresiva [69].

Las determinaciones de la incidencia de la EHGNA son escasas. Se ha descrito una cifra de 20-86/1.000 persona-año basada en la elevación de enzimas hepáticas y/o en la ecografía, y de 34/1.000 por año según la 1H-MRS (*In vivo proton magnetic resonance spectroscopy*) [70].

Esta enfermedad supone es un problema de salud de primera magnitud por el riesgo de evolucionar a EHNA y desarrollar fibrosis progresiva, cirrosis y CHC.

iii. Etiopatogenia

Los mecanismos que conducen al desarrollo y progresión de la EHGNA no son completamente conocidos, no obstante, está ampliamente aceptado que los eventos iniciales son dependientes del desarrollo de obesidad y RI a nivel hepático y del tejido adiposo [71]. La DM2 es una condición asociada con la RI periférica y se observa con frecuencia en pacientes con EHGNA. También se ha observado RI en pacientes con EHNA que no son obesos y que tienen una tolerancia normal a la glucosa [72]. A pesar de la fuerte asociación, no todos los pacientes con EHNA presentan RI. Esto sugiere que puede ser un síndrome heterogéneo con más de una causa, lo que se conoce como la “teoría de los impactos múltiples paralelos”.

Las vías moleculares que conducen a la RI son complejas y aún no se han dilucidado por completo. Varias moléculas parecen estar implicadas en la interferencia de las acciones de la insulina a nivel celular.

La base genética de la RI asociada con EHNA sigue sin estar clara. Se han encontrado asociaciones con polimorfismos en el gen que codifica la apolipoproteína C3 [73] y la interleucina-6 (IL-6) [74].

El sello distintivo de la EHGNA es la acumulación de AGs, especialmente en forma de triglicéridos, en el citoplasma de los hepatocitos, lo que surge de un desequilibrio entre la adquisición de lípidos y su eliminación [75].

La acumulación de lípidos depende de la disponibilidad de AGs libres en el hepatocito, que procede de tres fuentes principales:

- a) **Lipólisis** del tejido adiposo: Es la fuente de aproximadamente el 60% de los AGs. Cuando la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo se sobrepasa, situación frecuente en la obesidad, se produce un aumento en la movilización de AGs libres. Esta situación se puede ver agravada

en los casos de RI, pues la insulina se encarga de inhibir la lipólisis en el adipocito (75).

- b) **Lipogénesis de novo** intrahepatocitaria: De aquí proceden alrededor del 25% de los AGs acumulados. Este fenómeno se ha demostrado recientemente que aumenta en los pacientes con EHGNA, lo que probablemente responde a un estado derivado del hiperinsulinismo [76]. Además, la lipogénesis aumenta ante un mayor aporte de carbohidratos, en concreto los carbohidratos simples, fácilmente convertidos a AGs, o la fructosa, un potente inductor de la lipogénesis *de novo* [77].
- c) **Dieta**: Un 15% de los AGs proceden directamente de la dieta y, por lo tanto, se ven incrementados en dietas en las que más del 30% del aporte calórico sea en forma de grasas [78].

Una vez en el hepatocito, los AGs libres pueden seguir dos rutas diferentes:

- a) **Oxidación mitocondrial**: En condiciones normales los AGs se oxidan, principalmente en la mitocondria, a dióxido de carbono y agua para producir ATP y reducir el contenido de lípidos en el hígado. Una disminución en la actividad de este proceso puede conllevar al acúmulo de lípidos. Varios estudios han demostrado que el consumo excesivo de fructosa, ampliamente utilizada como edulcorante artificial en multitud de refrescos, inhibe la β -oxidación de los AGs [79], considerándose éste otro mecanismo por el que dicho carbohidrato conduce a esteatosis hepática. Por otro lado, durante este proceso también se forman especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya concentración es mínima en condiciones normales y pueden ser contrarrestados por los sistemas antioxidantes; pero ante la sobrecarga de AGs, la formación de ROS aumenta, lo que puede conllevar a la progresión a EHNA [80].
- b) **Acoplamiento y eliminación como lipoproteínas de baja densidad (VLDL)**: El ensamblaje y la secreción de triglicéridos se produce a través de la síntesis de VLDL en el retículo endoplasmático rugoso hepático. La

insulina disminuye la síntesis y estabilidad de la apolipoproteína B, lo que explica que, en situaciones de hiperinsulinismo, la eliminación de AGs en forma de VLDL esté disminuida [81].

Otros elementos implicados en el desarrollo de EHNA son el hierro, los antioxidantes, la leptina, la adiponectina, la resistina, las incretinas, los ácidos biliares o la microbiota.

Además, la respuesta inmune también juega un papel en la patogenia del EHGNA. Así, la disbiosis de la microbiota intestinal y una permeabilidad intestinal alterada [82] dan como resultado la el paso de productos bacterianos derivados del intestino a la circulación portal, contribuyendo a la respuesta inmune hepática [83]. No obstante, este punto se discutirá posteriormente en un apartado específico.

iv. Factores de riesgo

Los factores de riesgo más comúnmente asociados a EHGNA son la coexistencia de RI, hipertensión arterial (HTA), obesidad central o edad avanzada. Esta asociación se demostró en un estudio de 304 pacientes con EHGNA, pero sin DM2 manifiesta [84]. Se realizó biopsia hepática a 163 pacientes y 120 de ellos (74%) reveló datos de EHNA. El síndrome metabólico se observó en el 53% de los pacientes que no se sometieron a una biopsia, en el 67% de los que tenían ES en la biopsia y en el 88% de los que tenían EHNA. Después de corregir por edad, sexo e índice de masa corporal (IMC), el síndrome metabólico se asoció con un mayor riesgo de fibrosis grave (*odds ratio* [OR] 3,5, IC del 95 %: 1,1-11,2).

Otras condiciones que se han asociado con el desarrollo y progresión de la EHGNA se resumen en la tabla 5 [85].

CLÍNICOS	GENÉTICOS	AMBIENTALES
RI/DM 2 Obesidad HTA Dislipemia Edad avanzada Climaterio SAHOS SOP Hipotiroidismo Hipopituitarismo	PNAPLA3 (rs738409) TM6SF2 (rs58542926) Fenómenos epigenéticos	Dieta rica en fructosa Dieta rica en grasas Consumo de alcohol Déficit de vitamina D

Tabla 5. Factores de riesgo asociados al desarrollo y progresión de la EHGNA.

Abreviaturas: HTA, hipertensión arterial; DM, diabetes mellitus; SAHOS, síndrome de apnea-hipopnea obstructiva del sueño; SOP, síndrome de ovario poliquístico.

Es de destacar que las repercusiones globales de los factores de riesgo metabólicos en la aparición de la esteatosis parecen ser mayores que las que tiene el alcohol en estos pacientes [86]. Sin embargo, el mejor predictor evolutivo de la enfermedad es la presencia en la biopsia hepática de necroinflamación o fibrosis.

v. Presentación clínica

La mayoría de los pacientes con EHGNA se encuentran asintomáticos, aunque algunos pacientes con EHNA pueden presentar astenia, malestar general y molestias en el hipocondrio derecho [87]. La mayor parte de las veces el estudio se inicia tras detectar unos niveles elevados de aminotransferasas hepáticas o esteatosis hepática en alguna técnica de imagen. En los casos en los que la EHNA haya progresado a cirrosis, los pacientes pueden debutar o sufrir cualquiera de sus complicaciones incluido el CHC.

En general se estima que la EHGNA está entre un 15-30% de todos los casos de CHC. A pesar de tener una evolución lenta de la enfermedad a nivel hepático, la mortalidad en los sujetos con diagnóstico de EHGNA es mayor a

largo plazo que en la población general. Su principal causa de muerte en cambio no es la enfermedad hepática sino la enfermedad cardiovascular [88].

vi. Diagnóstico

En primer lugar hay que descartar por un lado el consumo crónico diario de alcohol (>30 g en los varones y >20 g en las mujeres) y por otro lado las causas secundarias [62]. El diagnóstico definitivo de la EHNA requiere una biopsia hepática [89].

1. Biopsia Hepática

Los hallazgos histológicos en la esteatosis hepática metabólica incluyen la ES, la esteatosis con inflamación lobulillar o portal sin degeneración balonizante, o bien la esteatosis con degeneración balonizante pero sin inflamación. El diagnóstico de la EHNA requiere la presencia conjunta de esteatosis, degeneración balonizante e inflamación lobulillar [90]. Otras características histológicas que pueden observarse en la EHNA, pero que no son necesarias para el diagnóstico son: inflamación portal, infiltrados de polimorfonucleares, cuerpos hialinos de Mallory-Denk, cuerpos apoptóticos, núcleos vacuolados claros, esteatosis microvacuolar y megamitocondrias. Con frecuencia hay también una fibrosis perisinusoidal, pero esta no forma parte de los criterios diagnósticos.

Sin embargo, dada la importante carga de esta enfermedad, la biopsia hepática no es un método diagnóstico logísticamente viable. Por otro lado, es propensa a errores de muestreo y es un procedimiento invasivo que se asocia a complicaciones potenciales significativas. Es por ello que en los últimos años ha aumentado el interés por la posibilidad de identificar el daño hepático a través de marcadores sustitutos no invasivos que pueden medirse en sangre periférica.

2. Evaluación no invasiva.

Esteatosis

Siempre que se sospeche una EHGNA, ya sea como enfermedad primaria o como trastorno coexistente, debe documentarse la presencia de esteatosis mediante alguna prueba de imagen. La técnica de elección es la ecografía simple de abdomen, ya que es más accesible y barata que la resonancia magnética (RM), que constituye el patrón de referencia. La ecografía tiene una sensibilidad limitada y no detecta de manera fiable la esteatosis cuando esta es inferior al 20% [91] o en aquellos individuos con un IMC > 40 kg/m² [92].

Pese a tratarse de una técnica operador-dependiente, la ecografía debe aplicarse como exploración diagnóstica de primera línea ya que detecta con seguridad la esteatosis moderada o grave y puede identificar alteraciones a nivel hepatobiliar. La disponibilidad y el coste de las exploraciones de imagen afectan de manera importante a la viabilidad de su empleo. Por lo tanto, en los estudios de detección sistemática a mayor escala se prefiere el empleo de biomarcadores séricos. Existen una serie de puntuaciones que han sido validadas externamente en la población general o en individuos con obesidad de grado 3 y predicen de manera variable los resultados metabólicos, como el índice de hígado graso (FLI), el SteatoTest^R y la puntuación de hígado graso de la EHGNA. Estas puntuaciones se asocian a la RI y predicen de manera fiable la presencia, pero no la gravedad, de la esteatosis [93].

Otra técnica de imagen, el parámetro de atenuación controlada (CAP), puede diagnosticar la esteatosis, pero tiene una capacidad limitada para distinguir entre los grados histológicos y no se ha estudiado en comparación con la esteatosis medida con 1H-MRS. Además, los datos que comparan CAP con ecografía no son concluyentes.

La imagen de atenuación por ultrasonidos es un nuevo método cuantitativo para evaluar la esteatosis hepática y, en comparación con el CAP,

esta tecnología permite mostrar imágenes de ultrasonidos en modo B en la misma pantalla en el dispositivo de ultrasonidos, lo que permite visualizar la estructura del hígado para así determinar la ubicación de la zona de medición óptima y mejorar la precisión de esta [94].

EHNA

- Marcadores de apoptosis

El aumento de la muerte celular en el hígado ha surgido como un mecanismo importante en la progresión de la enfermedad hacia la EHNA [95]. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso altamente organizado que puede producirse a través de dos vías fundamentales: la vía apoptótica extrínseca mediada por receptores de muerte (como Fas) o la vía apoptótica intrínseca por parte de los orgánulos (como las mitocondrias). Ambas vías pueden conducir a la activación de caspasas efectoras (principalmente la caspasa 3), que escinden diferentes sustratos intracelulares, incluida la K18, que es la principal proteína de filamento intermedio en los hepatocitos. Los niveles cck18 pueden medirse en el plasma mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) con el anticuerpo monoclonal M30, y se ha comprobado que estos niveles son significativamente mayores en los pacientes con EHNA que en los pacientes con ES [96]. La cck18 se ha validado ampliamente como marcador de EHNA en múltiples estudios, con un AUROC agrupado de 0,82 (IC del 95%: 0,76-0,88), y han sido reconocidos por las recientes directrices sobre EHNA como la prueba no invasiva más prometedora para el diagnóstico y el tratamiento de la EHNA [85,97]. Sin embargo, este ensayo aún no está disponible en el mercado y no existe un valor de corte establecido de cck18 para identificar la EHNA porque cada estudio ha utilizado su propio valor de corte.

El ELISA M65 puede detectar además de la cck18, la K18 total, y este ensayo se utiliza como marcador de la muerte general de los hepatocitos, incluyendo tanto la apoptosis como la necrosis. Además, este ensayo ha

demostrado ser prometedor para detectar la esteatosis, la esteatohepatitis y la fibrosis hepática en una cohorte de pacientes con enfermedad hepática crónica [98].

- Marcadores de estrés oxidativo

El estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la lesión de los hepatocitos y en la progresión de la enfermedad de ES a EHNA, pero aún no se han identificado las especies moleculares responsables [99]. Varias vías de oxidación pueden desempeñar un papel en la sobreproducción de productos de peroxidación lipídica en los pacientes con EHNA, incluyendo procesos enzimáticos y no enzimáticos mediados por radicales libres. Cada una de estas vías puede generar diferentes productos de oxidación que podrían cuantificarse. Chalasani y sus colaboradores midieron la peroxidación lipídica sistémica en pacientes con EHNA confirmada por biopsia y en pacientes control emparejados por edad, sexo e IMC. Los investigadores descubrieron que los niveles de lipoproteínas de baja densidad oxidadas y de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico eran significativamente mayores en los pacientes con EHNA [100]. Por otra parte, Başkol y colaboradores investigaron los niveles de la enzima antioxidante paraoxonasa 1 y hallaron niveles significativamente más bajos en la cohorte de EHNA [101]. Mediante espectrometría de masas se demostró que los productos de la oxidación del ácido linoleico mediada por los radicales libres (ácido 9- y 13-hidroxi-octadecadienoico y ácido 9- y 13-oxo-octadecadienoico) medidos en el plasma estaban significativamente elevados en los pacientes con EHNA en comparación con los pacientes con ES o con los pacientes con biopsias normales [102].

- Marcadores de inflamación

El reconocido estado inflamatorio crónico que existe en la obesidad y en la EHNA puede contribuir a la progresión de la enfermedad hacia la EHNA. Se ha demostrado que los niveles de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-6, están más elevadas en los pacientes con EHNA que en los pacientes

con ES, pero las diferencias no han sido lo suficientemente significativas como para permitir el uso de estas citocinas como marcadores no invasivos para predecir la presencia de EHNA [103]. Se han estudiado muchas otras citocinas (IL-1B y proteínas inflamatorias de los macrófagos) y adipocinas (resistina, visfatina y proteína de unión al retinol-4) como posibles biomarcadores, con resultados contradictorios. La *ratio* neutrófilos/linfocitos (N/L) en sangre es un indicador sencillo del estado inflamatorio general del organismo que se ha utilizado para predecir los resultados en pacientes con cáncer y enfermedad arterial coronaria. En un estudio de 2012, se identificó el cociente N/L como un nuevo marcador no invasivo de la gravedad de la EHGNA, y se demostró que este cociente era mayor en los pacientes con EHNA que en los que padecían ES [104]. Además, se descubrió que el cociente N/L se correlacionaba con las principales características histológicas de la EHNA, incluidas la inflamación y la fibrosis.

- miRs

Por otro lado, se ha descrito la desregulación de varios miRs en la progresión de EHGNA a EHNA. Entre ellos tenemos el miR-122, miR-21, miR-155, miR-23a y miR-143. Además, se han encontrado variaciones en las distintas condiciones: esteatosis/EHNA (miR-155, miR-370, miR-34a, miR-200a/b y miR-99a/b), fibrosis (miR-200a/b, miR-221/222, miR-34a, miR-16 y miR-99b) y cirrosis (miR-34a, miR-21, miR-31 y miR-181b) [53].

Fibrosis

La biopsia hepática ha sido durante años el método de referencia para cuantificar la fibrosis hepática. Actualmente se dispone de alternativas no invasivas como la elastografía de transición (ET) o Fibroscan® y los test serológicos. La ET proporciona una herramienta precisa, reproducible y útil para estimar la fibrosis hepática, siendo de extraordinaria utilidad en la identificación de fibrosis importante o cirrosis. Los marcadores serológicos son parámetros bioquímicos, que en unos casos aportan información sobre las alteraciones en la función hepática, denominados marcadores indirectos, y

en otros detectan modificaciones en el recambio de la matriz extracelular, llamados marcadores directos. Los marcadores indirectos son los clásicos marcadores serológicos bioquímicos obtenidos en el laboratorio clínico a partir de los análisis de rutina y entre ellos destacan el *NAFLD Fibrosis Score* (NAFLD FS), el índice de fibrosis-4 (FIB4) y el índice de relación AST-plaquetas (*AST to Platelet Ratio Index*, APRI).

C. Sistema inmune en DILI y EHNA

La relación entre EHNA y DILI es bidireccional ya que por un lado la EHNA puede predisponer a que ciertos fármacos induzcan hepatotoxicidad y a su vez hay agentes que pueden inducir enfermedad hepática grasa o agravar una esteatosis preexistente [105,106]. Además, el diagnóstico diferencial entre el hígado grasa metabólico y el inducido por fármacos es complejo debido a la ausencia de biomarcadores diagnósticos específicos [107].

La relación recíproca entre estas entidades sugiere que ambas comparten mecanismos patogénicos complejos. Uno de los mecanismos más comunes de daño hepático es la inducción de estrés oxidativo, que en última instancia conduce a **respuesta inmune innata y adaptativa** [18,108]. El hígado tiende a la inmunotolerancia para protegerse de la inflamación crónica producida por la lipotoxicidad y los productos bacterianos derivados del intestino. Un fallo a dicho nivel podría favorecer el desarrollo de trastornos hepáticos. La regulación de la respuesta inmune hepática es extremadamente compleja e involucra diferentes tipos de células tanto del sistema inmunitario innato como del adaptativo [109]. En este contexto, las células T asesinas naturales (*natural killer T cells*, NKT) son las principales células T innatas en el hígado de ratones y humanos [110]. Las células NKT invariantes (iNKT) son una subpoblación celular conocida por causar inflamación en el hígado [111,112]. No obstante, el perfil de activación y el mecanismo por el cual las células iNKT están involucradas en la progresión de EHNA y DILI en humanos siguen sin estar claros.

A continuación, se detallan las principales células que componen los sistemas inmunes innato y adaptativo, y su relación en el DILI (Figura 4) y en la EHNA (Figura 5).

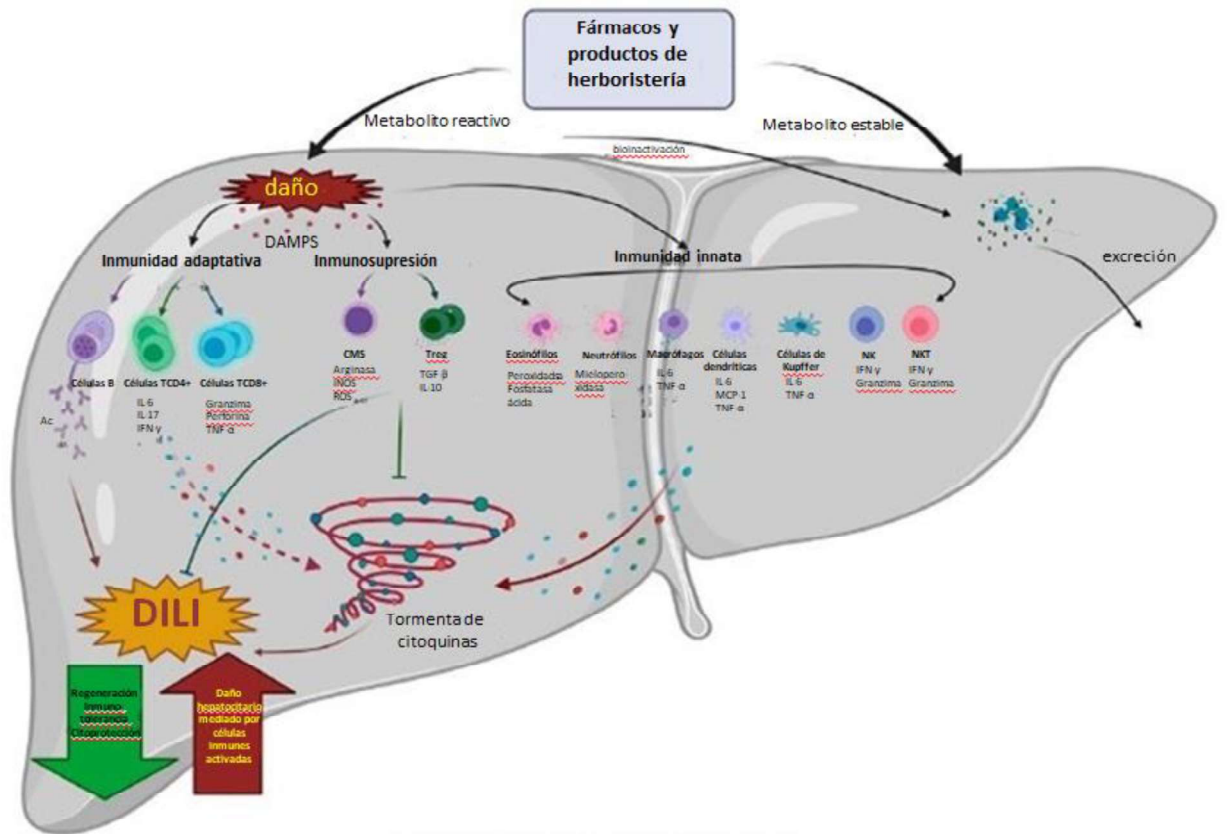


Figura 4. Respuesta inmune adaptativa e innata en DILI (Modificado de Liu W, Zeng X, Liu Y, et al. The Immunological Mechanisms and Immune-Based Biomarkers of Drug-Induced Liver Injury. *Front Pharmacol.* 2021;12:723940).

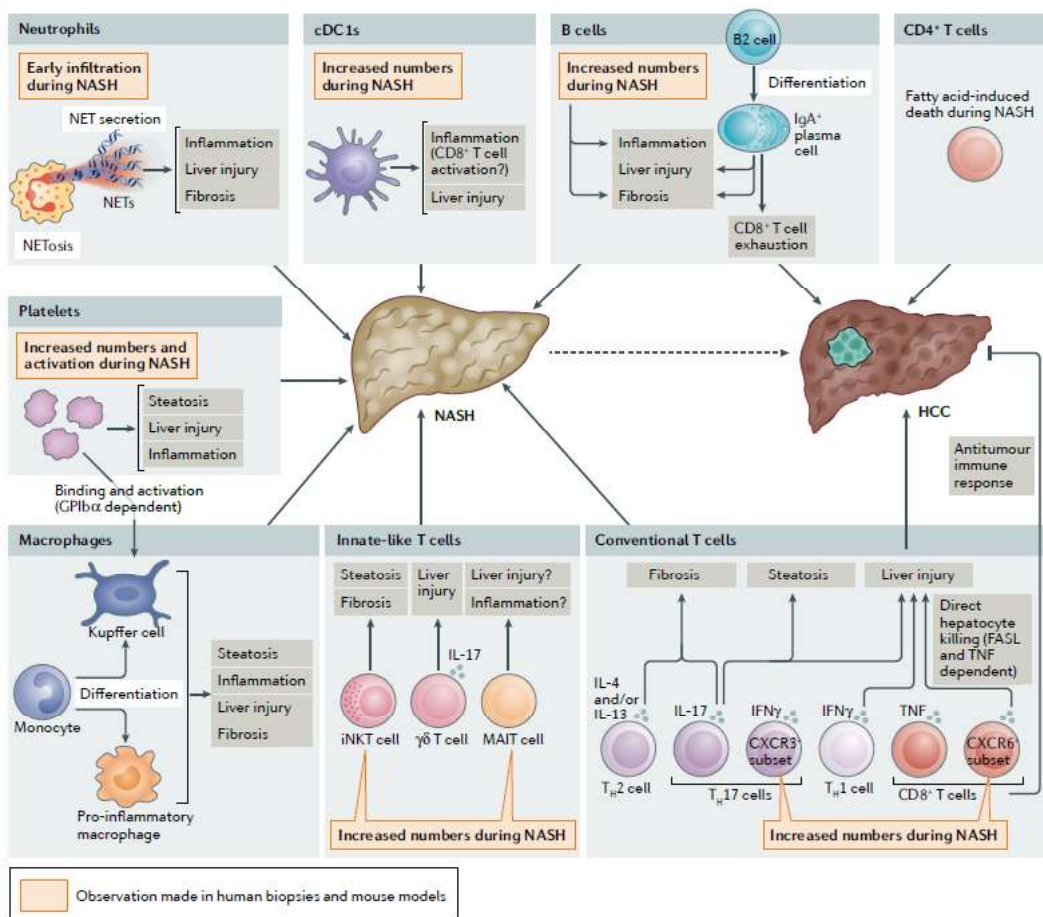


Figura 5. Respuesta inmune adaptativa e innata en EHNA (Tomado de Huby T, Gautier EL. Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(7):429-443).

i. Sistema inmune innato

El sistema inmune innato conforma la primera línea de defensa del huésped y su activación es mucho más rápida que la del sistema inmunitario adaptativo [113]. Se compone principalmente de barreras tanto físicas como químicas y de componentes celulares y moleculares. Cuando el hígado sufre una agresión, ya sea de manera aguda o crónica, los hepatocitos dañados liberan patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) y DAMPs que activan las células inmunitarias innatas produciendo una secreción de citocinas y quimiocinas que reclutan neutrófilos y monocitos a las zonas dañadas para los eliminar los restos

necróticos celulares. Los DAMP incluyen la proteína 1 (HMGB1), proteínas S100, proteínas de choque térmico o ATPs [114].

A su vez, bajo ciertas condiciones, las células reclutadas pueden agravar aún más la lesión hepática al liberar un gran número de factores proinflamatorios formando una tormenta de citocinas. Otras células del sistema inmune innato que intervienen en la patogénesis de la EHNA y el DILI son las células de Kupffer, los eosinófilos, las células dendríticas (CD), las células *Natural Killer* (NK) y las NKT. Estas células promueven la respuesta inflamatoria mediante la producción de citocinas, quimiocinas y ROS [115], que a su vez reclutan más células inmunitarias en el lugar de la lesión para controlar el daño e iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa.

Células de Kupffer

Las células de Kupffer son un tipo específico de macrófagos que residen en el hígado y desempeñan un papel clave en la lesión hepática inmunomediada [116]. Generalmente, las células de Kupffer se dividen en dos tipos, los M1 o "macrófagos activados clásicamente", que desempeñan un papel importante en la inmunidad humoral y la respuesta a patógenos, y los M2 o "macrófagos activados alternativamente", que tienen propiedades antiinflamatorias secretando potentes factores inmunosupresores como la IL-10. Las M1 segregan citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , la IL-6 o el TNF- α , que determinan la vía de señalización inflamatoria [117] conduciendo a la activación de las células T y a la inducción de la apoptosis [118].

Curiosamente, en ratones empobrecidos en células de Kupffer, el aumento de la hepatotoxicidad tras la exposición a acetaminofeno sugirió que estas células parecen tener un efecto hepatoprotector [119], tal vez debido a la menor expresión de varias citoquinas hepatoregulatoras como la IL-10.

En pacientes obesos o en respuesta a una dieta rica en grasas se produce un aumento de los macrófagos M1 con respecto a los M2 en el tejido

adiposo y en el hígado [120]. Este desequilibrio entre macrófagos M1 y M2 parece tener un papel importante en la patogénesis de la EHNA.

Las células de Kupffer también están implicadas en el inicio de la EHNA a través de la señalización *toll-like receptors* (TLR). Los TLR son los agentes desencadenantes de la inflamación en un hígado con esteatosis. El TLR9 activa la liberación de IL-1 β por las células de Kupffer, que está implicada en la acumulación de lípidos en los hepatocitos, la fibrogénesis y la muerte celular [121].

La IL-1 β y la IL-6 pueden a su vez potenciar la patogénesis de la enfermedad al aumentar la RI en los hepatocitos [122].

En las fases reparadoras de la inflamación aguda, los macrófagos hepáticos pueden sufrir una activación a macrófagos de tipo M2, que tienen un fenotipo pro-fibrogénico produciendo altos niveles de factor de crecimiento transformante- β 1 e IL-13, causando fibrosis progresiva [123]. No obstante, este tipo de macrófagos son principalmente inmunosupresores al inducir la apoptosis de las M1 disminuyendo de este modo la progresión de la EHNA [124]. A su vez, los M2 estimulan el catabolismo lipídico [125].

Neutrófilos

Los neutrófilos son el tipo más abundante de células inmunitarias innatas. Se originan en la médula ósea y desempeñan un papel polifacético en la defensa del huésped mediante la fagocitosis, la degranulación y la formación de ROS y de trampas extracelulares de los neutrófilos [126]. Sin embargo, la acumulación anormal de neutrófilos puede provocar lesiones inesperadas en órganos del huésped. Cuando se activan liberan citocinas proinflamatorias y mieloperoxidasa, lo que provoca un daño oxidativo en los hepatocitos [127].

Recientemente se ha definido que la activación de los neutrófilos causa comúnmente DILI y que el ADN mitocondrial originado en los hepatocitos lesionados podría activar aún más los neutrófilos y perpetuar de este modo el

daño hepático [128]. Se ha demostrado que el triptolide puede causar respuesta de estrés, peroxidación lipídica y necrosis hepatocitaria, pudiendo desencadenar todo ello una infiltración por neutrófilos que puede agravar aún más el daño hepático [129]. Lawson y sus colaboradores comprobaron que una depleción de neutrófilos podía disminuir los niveles séricos de ALT y la necrosis centrilobular, además de mejorar la progresión y la gravedad de la lesión hepática inducida por acetaminofeno. Sin embargo, los neutrófilos provocan una respuesta inflamatoria del huésped que podría facilitar la recuperación del hígado mediante la eliminación de restos celulares. Así pues, el papel de los neutrófilos sigue siendo controvertido en la lesión hepática inducida por APAP [130].

Por otro lado, se ha descrito que un aumento de la proporción entre neutrófilos y linfocitos puede aumentar la probabilidad de progresión de la EHNA ya que se ha relacionado con el grado de balonización de los hepatocitos, inflamación lobular y fibrosis [104]. En un estudio más reciente también se informó de que este ratio se asociaba con el score de actividad de la EHNA, la degeneración de los hepatocitos, la esteatosis, la inflamación y la fibrosis, lo que indica la posibilidad de que pueda funcionar como marcador del grado histológico y el estadio de fibrosis de la EHNA.

Otro estudio reveló un aumento de una importante enzima derivada de los neutrófilos, la mieloperoxidasa, en pacientes con EHNA, que podría contribuir a la inflamación hepática y al desarrollo de esta [131]. Además, los neutrófilos y la mieloperoxidasa podrían activar las células estrelladas hepáticas e inducir fibrosis hepática [132].

Celulas dendríticas

En el hígado, las células dendríticas (CD) son las principales CPA pudiendo iniciar respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. Se dividen en dos subconjuntos, las clásicas que tienen un mayor poder de presentación de antígenos gracias a la mayor expresión de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)-II y las plasmocitoides [133,134]. Las CD también

producen grandes cantidades de citocinas, como el interferón gamma (IFN- γ), que promueven la activación de las células T citotóxicas.

Se ha demostrado que el fenotipo inmunitario de las CD en el hígado se altera significativamente tras la exposición al acetaminofeno, con una mayor expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras aumentando la liberación de la proteína quimiotáctica de monocitos-1, IL-6 y TNF- α [135]. Sin embargo, hay estudios que muestran que las CD pueden desempeñar un papel supresor en la respuesta inflamatoria y reducir la lesión hepática mediante la liberación de IL-10 [136].

Las CD también parecen desempeñar un papel regulador en la EHNA al limitar la inflamación estéril eliminando las células apoptóticas y restos necróticos. Por tanto, diferentes estudios han demostrado que el agotamiento de estas provoca un empeoramiento de la gravedad del cuadro [137].

Eosinófilos

Los eosinófilos derivan de las células mieloides y secretan citocinas y enzimas para eliminar patógenos o células huésped. La eosinofilia se ha asociado a menudo con DILI, incluyendo acetaminofeno, diclofenaco, carbamazepina, enalapril y halotano [138].

La reacción a fármacos en la lesión hepática con eosinofilia y síntomas sistémicos podría ser un tipo de DILI, con un espectro diferente de fármacos culpables. En un estudio en ratones, los eosinófilos se infiltraron en el hígado durante la fase temprana de la lesión hepática inducida por halotano mediante la secreción de citocinas proinflamatorias, aumentando proporcionalmente al daño hepatocelular [139].

En cambio, los eosinófilos no parecen tener un papel tan importante en el desarrollo ni la evolución de la EHGNA.

Células Natural Killer

Las células NK son un componente importante del sistema inmunitario, actuando como vínculo entre las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. Constituyen el 30-50% de los linfocitos hepáticos y desempeñan un papel en la inspección de células transformadas o infectadas a través de la liberación de granzima y perforina [140,141].

Existe evidencia de la participación de las células NK en el DILI, a menudo implicadas en el daño del ADN, lo que hace que los histiocitos sean susceptibles a la lisis por células NK [142,143] y que el IFN γ , producido principalmente por las NK hepáticas, parece mediar en la infiltración de células inmunes, quimiocinas y la liberación de citoquinas que conduce a la apoptosis de hepatocitos [144]. En un estudio reciente de hepatocitos humanos primarios expuestos a 148 fármacos mediante el análisis de GWAs, se descubrió que varios fármacos, como el ácido valproico, la prometazina, el ketoconazol o la isoniazida, activaban ligandos para receptores de células NK como el ligando NKp30 y los ligandos NKG2D e incurrían en la muerte de los hepatocitos por células NK [145].

Se cree que las células NK podrían desempeñar un papel en el desarrollo de EHGNA/EHNA. Los ligandos que actúan sobre las células NK aumentan en pacientes con EHNA y en ratones que siguen una dieta deficiente en metionina y colina [146]. Kahraman y sus colaboradores revelaron que la expresión de varios ligandos citotóxicos asociados a las células NK (como el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF [TRAIL], NKG2D y los ARNm MIC A/B) aumentaba significativamente en los pacientes obesos con EHNA. También informaron de que la expresión de ARNm MIC A/B se correlacionaba positivamente con la actividad y la apoptosis de hepatocitos en pacientes con EHNA [147]. De forma similar, otro estudio indicó que muchos ligandos de células NK estaban sobreexpresados en el hígado de ratones con EHNA, lo que produjo una infiltración de células NK citotóxicas activadas [148]. Las células NK también desempeñaron un papel crucial en la regulación de la

fibrosis progresiva en la EHNA [149]. Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar las funciones de las células NK sobre la EHNA.

Células T Natural Killer

Las células NKT presentan características tanto de las células inmunitarias innatas como adaptativas y actúan como puente entre ambos sistemas. Son un subconjunto único de células T que expresan tanto receptores de células NK, como CD161 y CD94, como receptores de células T [150]. Las células NKT están enriquecidas en el hígado y regulan la respuesta inmunitaria y el equilibrio entre las respuestas pro y antiinflamatorias secretando citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-17 tras su estimulación [151]. Además de las citocinas clásicas, las NTK pueden secretar OPN, que está implicada en la progresión de las lesiones hepáticas [152].

Un análisis de los linfocitos hepáticos y de sangre periférica de dos pacientes con insuficiencia hepática fulminante inducida por fármacos indicó que las células NKT podrían estar implicadas en la lesión hepática [153]. Diferentes estudios han descubierto que las células NKT liberan IFN- γ de forma dominante y reclutan neutrófilos y macrófagos, lo que provoca lesiones hepáticas inducidas por triptolide [154].

En general, las células NKT se reducen en la esteatosis hepática, pero aumentan en la fibrosis hepática relacionada con la EHNA [155]. En la fase inicial de la EHGNA, las células NKT están reducidas y se inclinan hacia un perfil de citoquinas Th1 proinflamatorias. Sin embargo, en la fase avanzada de la EHGNA, como la EHNA, las células NKT aumentan en el hígado y contribuyen al desarrollo de la fibrosis hepática [156]. Al igual que ocurre con las células NK, las NKT aumenta la expresión de mediadores citotóxicos NKG2D (como MIC-A y MIC-B) en la EHNA [157].

ii. Sistema inmune adquirido

La respuesta inmunitaria adquirida consta de inmunidad humoral mediada por células B productoras de anticuerpos y de inmunidad celular mediada por células T. Se trata de un sistema con especificidad antigénica y memoria inmunológica [158].

Células B

Los linfocitos B proceden de la médula ósea. Cuando maduran emigran de la sangre periférica al bazo y los ganglios linfáticos. Tras su activación, los linfocitos B se convierten en células plasmáticas y producen anticuerpos que participan en la respuesta inmunitaria.

Se han observado anticuerpos frente al fármaco en pacientes en tratamiento con amodiaquina, lo que apoya aún más la teoría de que las reacciones idiosincrásicas al fármaco están mediadas por el sistema inmunitario [159]. La mayoría de los casos de lesión hepática grave inducida por hidrazida de ácido isonicotínico se han asociado con anticuerpos contra proteínas modificadas con este fármaco y proteínas nativas, especialmente el citocromo P450 [160]. Se han analizado muestras de suero de pacientes tratados con nomifensina mediante inmunoanálisis y todos los pacientes presentaban anticuerpos IgG específicos [161]. Además, se ha observado que los pacientes con IDILI por halotano contienen algunos anticuerpos contra proteínas trifluoroacetiladas, así como autoanticuerpos contra proteínas nativas [162].

Hasta ahora se han realizado pocos estudios sobre el papel de los linfocitos B en la patogénesis de la EHGNA. El grupo de Zhang demostró que las células linfocitarias B intrahepáticas podrían contribuir no sólo a través de la secreción de citoquinas e inmunoglobulinas, sino también a través de la regulación de las células linfocitarias T CD4+ intrahepáticas en los ratones alimentados con HFD [163].

Células T

Las células T se diferencian y maduran en el timo y posteriormente migran al tejido linfóide circundante. Según sus características y marcas de superficie, las células T pueden dividirse principalmente en dos subconjuntos, las células T CD4 y las T CD8. Según su función pueden dividirse en células T citotóxicas (*Cytolytic T Lymphocyte*, CTL), células T auxiliares (*T helper*, Th), células T reguladoras/supresoras (Treg) y células T hipersensibles retardadas.

En el análisis histológico de pacientes con iDILI suele haber infiltrado hepático de células inmunes, entre las que a menudo se incluyen células T CD8. Además, los neoantígenos del fármaco o sus metabolitos reactivos son presentados por las APC y activan numerosas células T CD8 [164]. Las CTL pueden eliminar a las células diana mediante la activación de los receptores de muerte, la exocitosis de gránulos o la liberación de citoquinas. La insuficiencia hepática fulminante en reacción adversas a fármacos es probablemente causada por la infiltración de CTLs [165]. También se ha encontrado una infiltración de células de granzima B+CD3+T alrededor de los hepatocitos apoptóticos en pacientes con insuficiencia hepática fulminante tras un tratamiento con vancomicina [166].

Las moléculas MHC-I expresadas en todas las células nucleadas presentan péptidos endógenos para las células T CD8, mientras que las moléculas MHC-II presentan péptidos exógenos para las células T CD4 [167]. Además, muchos alelos HLA predicen el riesgo de iDILI asociado con MHC-I [159], lo que también sugiere que la respuesta inmune adaptativa mediada por células T CD8 causa la mayoría de iDILI.

El papel de las células T convencionales en la patogénesis de la EHNA y la EHGNA está bien establecido. En un modelo de EHGNA, la dieta deficiente en metionina y colina provocó una reducción del número de linfocitos T CD4 intrahepáticos, así como un aumento de la producción de IFN γ , IL-17 y ROS en los linfocitos T intrahepáticos [168]. Durante la progresión de la enfermedad, las células T CD8 adquieren una actividad no específica de destrucción de

hepatocitos, alimentada por el microambiente del hígado graso. Curiosamente, las células T CD8 también pueden ser necesarias para la resolución de la EHNA, lo que sugiere la existencia de una heterogenicidad funcional.

Las **células T reguladoras (Tregs)** se producen de forma natural o inducida. Una función importante del subconjunto de células T reguladoras CD25+ es la supresión de las células T CD4 y CD8 y la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, disminuyendo la inflamación y manteniendo la tolerancia inmunitaria y la homeostasis del sistema inmunitario. Modelos en ratones han demostrado que la eliminación de las células Treg CD25+ resulta en la precipitación de la enfermedad autoinmune. En el hígado, se ha observado un aumento de las Tregs en el tejido tumoral de pacientes con CHC y en pacientes con infección crónica por VHB o VHC [169-171], lo que sugiere que las Tregs desempeñan un papel en la supresión o el mantenimiento de las células tumorales o la infección viral.

Distintos estudios han encontrado que el número de Tregs a nivel hepático se reduce significativamente después del tratamiento con triptolide y que la transferencia adoptiva de Tregs podría mejorar la lesión hepática inducida por este, mientras que el agotamiento de Tregs disminuye los niveles de IL-10 y agrava la lesión hepática con niveles más altos de ALT y AST [172]. De hecho, también se ha informado de que las Tregs alivian la lesión hepática inducida por APAP a través de la IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β) [173].

En los hígados con EHNA hay un mayor número de Tregs [174,175]. Los ratones alimentados con una dieta rica en grasas mostraron una disminución gradual de las Tregs con el tiempo, lo que puede ser un acontecimiento clave en la progresión de la esteatosis a la esteatohepatitis [176].

Las células **T helper tipo 17 (células Th17)** son otro subconjunto de células T que producen interleucina-17 (IL-17) y median en diversas respuestas inmunitarias. Las células Th17 intervienen en la eliminación de patógenos y en las respuestas inflamatorias de los tejidos. Los estudios han demostrado la

importancia de las células Th17 en las enfermedades hepáticas autoinmunes, la hepatitis vírica crónica, la enfermedad hepática alcohólica y el CHC [177-179]. Tang y sus colaboradores [180] mostraron que hay un mayor número de células Th17 en el hígado tras unas 8 semanas de alimentación con dieta rica en grasas y que estas células están asociadas con la progresión de la esteatosis hepática y la inflamación a través de la producción de IL-17.

Los metabolitos sintetizados durante el metabolismo de toxinas, la lipotoxicidad, el estrés oxidativo o los metabolitos derivados de antígenos extraños y bacterias pueden presentarse en moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) como neoantígenos, lo que desencadena la activación de las células T y la respuesta inmune posterior. La activación de las células T se acompaña de una regulación al alza de diferentes marcadores de superficie celular, cada uno en una etapa diferente del proceso de activación. El receptor CD69 es una proteína de membrana tipo II, de la familia de receptores lectina tipo C, que se expresa tempranamente en los leucocitos tras su activación. Los estudios previos han demostrado que CD69 induce varias rutas de señalización en diferentes tipos de células inmunes regulando así la respuesta inflamatoria. CD69 ha sido descrito como el marcador de activación más temprano de los linfocitos T [181] y se trata de una molécula coestimuladora que promueve la citotoxicidad [182]. Por el contrario, CD25 y HLA-DR generalmente se consideran marcadores de superficie celular de activación tardía y muy tardía respectivamente en leucocitos [183]. CD25 es uno de los marcadores de activación más estudiados. Se trata de la cadena α del receptor de IL-2. Es una proteína transmembrana de Tipo I y tiene un papel crítico en el mantenimiento de la inmunotolerancia mediada por las Tregs hacia autoantígenos [184]. HLA-DR es un receptor de superficie celular de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. Aparece en las últimas etapas de activación en las células T y NK y es un marcador genético implicado en la respuesta inmunitaria del huésped [185]. Por otro lado, el miembro D del grupo 2 natural killer (NKG2D), un receptor activador fuerte, está asociado con daño tisular inducido por el estrés [186] y sería crucial en la reparación de la fibrosis hepática [187].



II. JUSTIFICACIÓN

La ausencia de métodos diagnósticos y biomarcadores, junto a los límites que presentan las escalas de causalidad en el diagnóstico de hepatotoxicidad idiosincrásica, hacen que el diagnóstico se base en la exclusión de causas alternativas de enfermedad hepática. El diagnóstico diferencial entre esta entidad y la esteatohepatitis no alcohólica, con la que comparte mecanismos patogénicos, características clínicas e histológicas, es en ocasiones sumamente difícil. Además, no se conoce con exactitud en qué medida la presencia de síndrome metabólico, con o sin esteatohepatitis, puede aumentar el riesgo o influir en el fenotipo y evolución de un episodio de hepatotoxicidad. Todo ello hace necesaria la realización estudios que incluyan biomarcadores inmunológicos, genéticos y epigenéticos que ayuden a diferenciar ambas enfermedades.



III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

El sistema inmunitario adaptativo participa en el desarrollo de hepatotoxicidad idiosincrásica y de enfermedad del hígado graso no alcohólico y existe un patrón característico de pérdida de la tolerancia inmune que contribuye a su gravedad y evolución.

OBJETIVO GENERAL

Identificar biomarcadores inmunológicos que, desde una visión multisistémica, nos proporcionen información diagnóstica y pronóstica y permitan diferenciar los cuadros de hepatotoxicidad idiosincrásica y la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Realizar un análisis comparativo de los perfiles funcionales (CD69, CD25, HLA-DR and NKG2D) de las células iNKT, células CD4 y células CD8 en muestras de sangre periférica en pacientes con hepatotoxicidad idiosincrásica, pacientes con EHGNA y sujetos control.
2. Determinar un perfil inmunitario de progresión de EHGNA en muestras de sangre periférica en pacientes con EHGNA con fibrosis leve ($F \leq 1$) y fibrosis significativa ($F \geq 2$).



IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes

Para la realización de este estudio se reclutaron de forma prospectiva pacientes con EHGNA, pacientes con DILI y controles sanos. El presente estudio se llevó a cabo de acuerdo con el Código Ético de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki) y fue aprobado por el Comité Provincial de Ética de la Investigación de Málaga, España (PI-0285-2016). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

a. Cohorte de pacientes con DILI

Los pacientes con DILI procedían del *Spanish DILI Registry*, en el que se encuentran incluidos los pacientes para la detección y estudio sistemático, según protocolo estructurado, de casos de hepatotoxicidad. Los casos sospechosos de DILI fueron evaluados por (i) la compatibilidad del lapso entre la ingesta del fármaco y el inicio de los síntomas, (ii) los datos bioquímicos, histológicos y de imagen para excluir enfermedades hepáticas alternativas, y (iii) el resultado de la lesión hepática. Ninguno de estos pacientes, presentaba títulos detectables de autoanticuerpos en suero. Posteriormente se aplicó la escala CIOMS/RUCAM y los casos fueron adjudicados por tres expertos en DILI antes de incluirlos en el mencionado registro. Los criterios bioquímicos de DILI y la gravedad de la lesión hepática se definieron de acuerdo con los criterios establecidos por un grupo internacional de expertos en DILI [11].

b. Cohorte de pacientes con EHGNA

Los pacientes que cumplían criterios invasivos y no invasivos para el diagnóstico de EHGNA fueron reclutados prospectivamente en la Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Málaga, España).

Los criterios de inclusión fueron (85):

- la presencia de un diagnóstico histológico de EHNA en una biopsia hepática (presencia de esteatosis hepática $\geq 5\%$, daño hepatocelular, degeneración balonizante de los hepatocitos, inflamación lobular o presencia de fibrosis) (n=12) o
- el diagnóstico no invasivo de EHGNA en aquellos pacientes sin biopsia hepática (el diagnóstico se asumió por exclusión de otras causas de daño hepático, pruebas no invasivas y presencia de esteatosis en la ecografía abdominal) (n=9).

Los criterios de exclusión fueron [85]:

- ingesta de alcohol >20 g/día (hombre) y >10 g/día (mujer),
- causas secundarias de EHGNA u otras causas de enfermedad hepática crónica,
- consumo de fármacos potenciales para el desarrollo de EHGNA,
- pacientes con diabetes tipo 1 y
- trastornos psiquiátricos graves.

De manera retrospectiva se comprobó que todos los pacientes de esta cohorte cumplían al menos un criterio cardiometabólico (tabla 4) para la nueva nomenclatura de EHmet.

Los pacientes diagnosticados con EHGNA se dividieron en dos grupos según el grado de fibrosis hepática medida por FibroScan[®]: fibrosis hepática no significativa ($F \leq 1$) y fibrosis significativa ($F \geq 2$). Esta clasificación se ha elegido de acuerdo con un estudio previo que sugería que el riesgo de mortalidad global a largo plazo, trasplante hepático y eventos relacionados con el hígado sólo estaba presente tras la progresión de la fibrosis hepática a F2 (187).

c. Cohorte de controles sanos

Los pacientes control se reclutaron entre los trabajadores del Hospital Universitario Virgen de la Victoria y la Universidad de Málaga (Málaga, España). Los criterios de inclusión fueron la ausencia de antecedentes de enfermedad hepática. Los criterios de exclusión fueron historia previa de hepatotoxicidad o cualquier otra enfermedad hepática crónica, perfil hepático alterado en el momento de la inclusión, IMC>25 kg/m², diabetes mellitus, dislipemia, síndrome metabólico o EHGNA. Para ello se les realizó el mismo día de la visita una analítica con perfil hepático completo y estudio de otras causas de hepatopatía (incluida serología), una ecografía de abdomen y un fibroscan.

2. Variables de estudio

Las distintas variables antropométricas y bioquímicas se obtuvieron en una visita en la que se realizó una extracción de sangre junto con un examen físico general.

a. Variables clínicas y antropométricas

Las determinaciones de peso y talla y los perímetros de cintura y cadera se midieron con métodos estandarizados y escalas calibradas (“Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee.” 1995). La presión arterial se registró con un dispositivo para la medida de la presión arterial (Hem-703C, Omron, Barcelona, España) con el sujeto sentado y después de 5 minutos de reposo. Se obtuvieron dos lecturas y su media se utilizó en los análisis.

b. Variables analíticas

En la misma visita se les extrajo a los pacientes una muestra de sangre venosa tras 10 horas de ayuno. La sangre se recolectó en tubos de heparina sódica para aislar la fracción celular, en tubos sin conservante para el aislamiento del suero y en tubos con EDTA_{K3} para la realización de un hemograma. En los pacientes con DILI, las muestras de sangre se recogieron entre los días 1 y 11 del diagnóstico del DILI.

Los tubos de suero se centrifugaron y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis en el Biobanco del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, Málaga, España). Los niveles séricos de glucosa, triglicéridos, colesterol, AST, ALT, GGT y FA se midieron en un analizador Architect C8000 (Abbott Laboratories S.A., Madrid, España). La insulina sérica se midió mediante inmunoquimioluminiscencia en un analizador Architect I8000 (Abbott Laboratories S.A.). Como medida de RI, se determinó el HOMA-IR, el cual se calculó mediante la siguiente ecuación $HOMA-IR = \text{insulina en ayunas } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{glucosa en ayunas } (\text{mmol/L})/22,5$.

c. Aislamiento de fracciones celulares y estudio de citometría de flujo

Las células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) se aislaron a partir de la sangre total recogida en tubos de heparina sódica mediante gradiente de densidad (Lymphoprep™, STEMCELL Technologies Inc, Vancouver, Canadá). Para ello, 10mL de sangre total se diluyen con 10mL de suero fisiológico estéril. Esta sangre diluida se deposita cuidadosamente en un tubo de 50mL que contiene 10mL de Lymphoprep™. Luego, el tubo se centrifuga a 800 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esta centrifugación, se recoge la capa que contiene las PBMC, la cual se somete a otras dos centrifugaciones a 1.500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente previa dilución con suero fisiológico estéril. El pellet resultante contiene las PBMCs que son utilizadas para los análisis de las iNKT y los linfocitos T CD4+ y CD8+.

Una vez aisladas, las células (2×10^6) se resuspendieron en tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) 1X y se incubaron con anticuerpos monoclonales anti- CD45-V450, CD3-APC-CyTM7, CD4-PerCP-CyTM5.5, CD25-PE-CyTM7, CD69-APC, NKG2D-PE-CyTM7, HLA-DR-APC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), TCRV β 11-FITC, y TCRV α 24-PE (Beckman-Coulter, Marseille, Francia). Se incluyeron los siguientes controles de isotipo: IgG1-V450, IgG1-APC-CyTM7, IgG1-PerCP-CyTM5.5, IgG1-PE-CyTM7, IgG1-APC, IgG2-APC (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.), IgG1-PE e IgG2a-FITC (Beckman-Coulter, Marsella, Francia).

Las estrategias de separación celular (*gating*) para la calibración de anticuerpos primarios por citometría de flujo se muestran en la Figura 6. Para comprobar la dilución correcta del anticuerpo y realizar la correcta selección de las células marcadas, primero incubamos la muestra con cada anticuerpo. Todos los anticuerpos se incubaron a 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente. TCRV α 24 y TCRV β 11 se incubaron a 1:75. Se adquirieron al menos un millón de eventos/muestra. Las células se separaron en función de la expresión de marcadores específicos. En las figuras se muestra la intensidad de fluorescencia detectada en cada anticuerpo. Esta evaluación nos permitió separar la señal negativa de la positiva con el fin de elegir subconjuntos específicos de células. La estrategia de selección de linfocitos se definió a través de la dispersión frontal (*forward scatter complexity*, FSC) frente a la dispersión lateral (*side scatter complexity*, SSC) (primer panel de la Figura 6) en función del tamaño y la granularidad (complejidad). El segundo panel muestra las células CD45⁺ (marcador de leucocitos) entre los linfocitos presentes en las PBMC. El resto de los paneles muestra las células CD3⁺ (marcador de células T), TCRV α 24⁺ y TCRV β 11⁺ (marcadores de células iNKT), CD4⁺, CD69⁺ (marcador de activación temprana), CD25⁺ y HLA-DR⁺ (marcadores de activación tardía), y NKG2D⁺ (marcador de estrés celular) entre los linfocitos T.

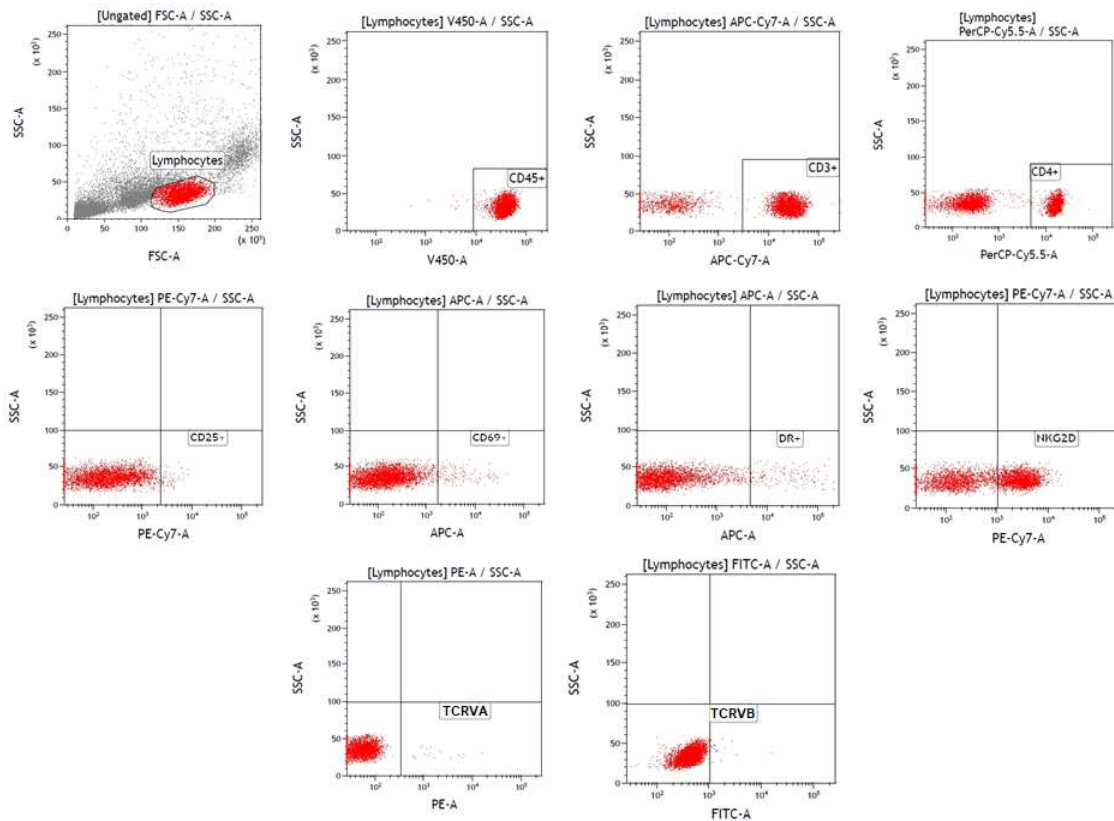


Figura 6. Estrategias de separación celular (*gating*) utilizadas para la calibración de los anticuerpos primarios por citometría de flujo.

La estrategia de selección de la iNKT (Figura 7) se definió en función de la complejidad de la dispersión frontal (*forward scatter complexity*, FSC) frente a la dispersión lateral (*side scatter complexity*, SSC) (primer panel de la Figura 7). En segundo lugar, se seleccionaron las células CD45+ entre los linfocitos. En tercer lugar, se identificaron las células CD3+CD45+ (linfocitos T) entre los linfocitos. En esta subpoblación, seleccionamos las células TCRV α 24+TCRV β 11+ para definir el subconjunto de células iNKT [188]. A continuación, analizamos la expresión de CD69, CD25, HLA-DR y NKG2D para estudiar el perfil de activación del subconjunto de células iNKT.

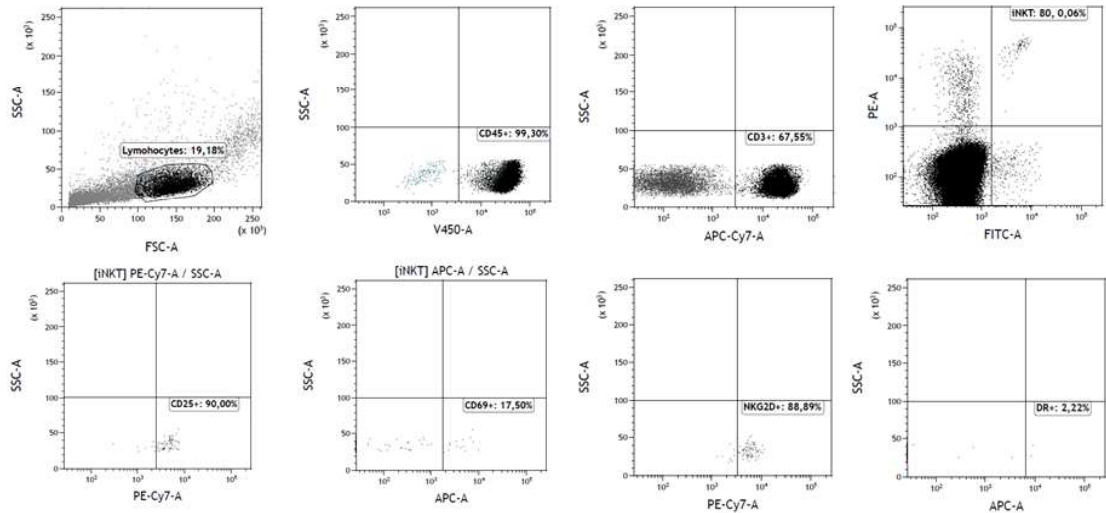


Figura 7. Estrategias de separación celular (*gating*) utilizadas para la identificación de las células iNKT por citometría de flujo.

Para la estrategia de selección de los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Figura 8), identificamos los linfocitos y células CD45+ (A) tal y como hemos descrito en la Figura 6. Entonces seleccionamos el subconjunto de células T CD3+CD4+ entre las células CD45+ positivas, como se muestra en el panel A e identificamos las células T CD8+ como linfocitos T CD3+CD4-. En las células CD4+ y CD8+ identificamos los marcadores de activación CD25+ y CD69+ (B), NKG2D+ y HLA-DR+ (C). La estrategia de selección de linfocitos se definió a través de la dispersión frontal (*forward scatter complexity*, FSC) frente a la dispersión lateral (*side scatter complexity*, SSC) en función del tamaño y la granularidad (complejidad).

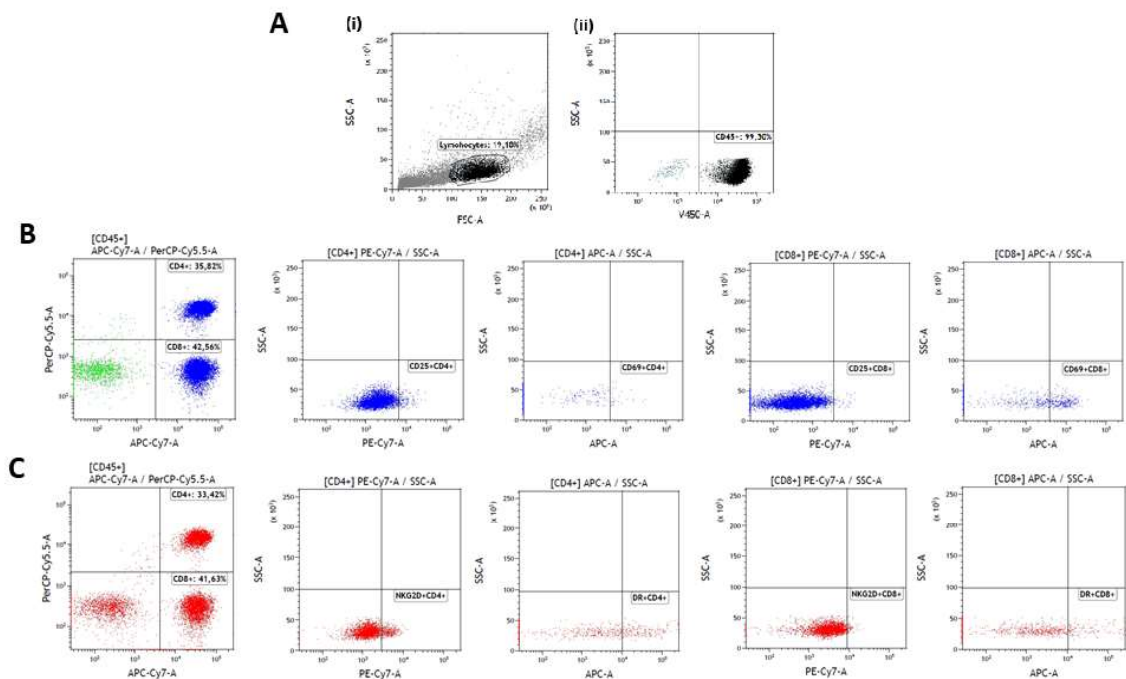


Figura 8. Estrategias de separación celular (*gating*) utilizadas para la identificación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ por citometría de flujo.

Los datos se analizaron con el software KALUZA 2.1 (Beckman-Coulter, Indianapolis, IN, EE.UU.). Los resultados se mostraron como el porcentaje de células positivas para cada marcador entre cada subconjunto recogido.

d. Elastografía hepática

Los pacientes fueron examinados en ayunas. Se utilizó un dispositivo ECHOSENS FibroScan 402 (Echosens, París, Francia) con una sonda M o XL sobre el lóbulo hepático derecho. La medida de la rigidez hepática (*liver stiffness measurement, LSM*) se describió mediante la mediana de 10 mediciones correctas. La LSM se considera fiable sólo si el IQR/med < 30% y la tasa de éxito > 60%. Se realizaron 10 medidas correctas en todos los pacientes. Los pacientes con EHGNA se incluyeron en dos grupos en función del nivel de fibrosis: fibrosis hepática no significativa ($F \leq 1$) y fibrosis hepática significativa ($F \geq 2$) según la elastografía definida como $LSM \geq 7$ kPa, $\geq 8,7$ kPa y $\geq 10,3$ kPa ($\geq F2$, $\geq F3$ y $F4$, respectivamente) para sonda M, y $LSM \geq 6,2$

kPa, $\geq 7,2$ kPa y $\geq 7,9$ kPa (\geq F2, \geq F3 y F4, respectivamente) para sonda XL [189].

e. Pruebas no invasivas serológicas de esteatosis, EHGNA y fibrosis

Para evaluar el riesgo de presentar esteatosis hepática se calculó el índice de hígado graso (*Fatty Liver Index*, FLI) [190]. Para evaluar la fibrosis hepática se utilizó el NAFLD FS [191], el índice de fibrosis-4 (FIB4) [192] y el APRI [193].

3. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.) y R versión 4.1.1 (R Core Team, Viena, Austria, 2021). Las diferencias en las variables antropométricas, bioquímicas e índices de esteatosis y fibrosis hepática entre los cuatro grupos de estudio se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguidas de un análisis post hoc mediante la prueba de Dunn. Se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman para estimar la relación entre el porcentaje de células iNKT, los linfocitos CD4+ y CD8+, así como su perfil de activación, con las variables antropométricas/bioquímicas y los índices de esteatosis y fibrosis hepática. Para todos los casos, un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.



V. RESULTADOS

1. Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Se reclutaron 21 pacientes con EHGNA, 8 pacientes con DILI y 28 controles sanos. En la Tabla 6 se describen las características antropométricas y bioquímicas de los pacientes incluidos en el estudio. Se observó que los pacientes con EHGNA tenían mayor edad y valores más elevados de peso, IMC, glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina, HOMA-IR, AST, ALT, GGT y FA que los controles, independientemente del grado de fibrosis hepática. Más aún, aquellos pacientes con EHGNA y fibrosis hepática significativa ($F \geq 2$) tenían valores más elevados de HOMA-IR y AST que aquellos con una menor fibrosis ($F \leq 1$).

En lo que respecta a los índices de esteatosis (FLI) y de fibrosis hepática (NAFLD FS, FIB4 y APRI), se observó que los pacientes con EHGNA tenían índices superiores a los de los sujetos control. Más aún, el FLI y el NAFLD FS fueron superiores en aquellos pacientes con EHGNA y fibrosis hepática significativa ($F \geq 2$) frente a aquellos con una menor fibrosis ($F \leq 1$).

Entre los pacientes con EHGNA, el grado de fibrosis medido con el Fibroscan fue:

- Pacientes sin fibrosis hepática significativa ($F \leq 1$): 66,6% $F=0$ ($n=4$) y 33,3% $F=1$ ($n=2$).
- Pacientes con fibrosis hepática significativa ($F \geq 2$): 33,3% $F=2$ ($n=5$), 26,6% $F=3$ ($n=4$) y 40% $F=4$ ($n=6$).

	Control	EHGNA F≤1	EHGNA F≥2	DILI	P
N (H/M)	28(11/17)	6(3/3)	15(7/8)	8(1/7)	<0,001
Edad (años)	40±11	48±11 ^a	56±11 ^a	47±15 ^{a,c}	<0,001
Peso (kg)	67±12	79±14 ^a	84±10 ^a	68±12 ^{b,c}	<0,001
IMC (kg/m ²)	23±2	28±4 ^a	31±3 ^a	24±3 ^{b,c}	<0,001
Cintura (cm)	83±9	100±11 ^a	106± ^a	-----	<0,001
Glucosa (mg/dl)	82(76-88)	98(89-107) ^a	106(91-121) ^a	94(89-99) ^{a,c}	<0,001
HbA1c	5.3±0.1	5.3±0.2	5.7±0.7	-----	0.446
Colesterol (mg/dl)	166±36	197±28 ^a	191±40 ^a	184±67	<0,047
Triglicéridos (mg/dl)	85±31	118±59 ^a	156±87 ^a	186±100 ^a	<0,001
HDL (mg/dl)	62±15	48±17 ^a	48±12 ^a	23±16 ^{a,b,c}	<0,001
Insulina (μU/ml)	5,7(4,1-7,3)	11,3(6,3-16,3) ^a	17,8(8,8-26,8) ^a	11,4(2,4-20,4)	<0,001
HOMA-IR	1,1(0,7-0,5)	2,9(2,7-4,1) ^a	6,7(4,2-9,3) ^{a,b}	4,4(0,9-7,9)	<0,001
AST (UI/L)	20(16-24)	33(24-42) ^a	48(29-67) ^{a,b}	96(41-151) ^{a,b,c}	<0,001
ALT (UI/L)	22(14-30)	58(20-96) ^a	74(44-104) ^a	202(52-352) ^{a,b,c}	<0,001
GGT (UI/L)	13(9-17)	44(5-83) ^a	96(56-136) ^a	105(15-195) ^a	<0,001
FA (UI/L)	48(36-60)	74(63-85) ^a	75(55-95) ^a	178(103-253) ^{a,b,c}	<0,001
Índices de esteatosis y fibrosis hepática					
FLI	18±20	64±28 ^a	83±19 ^{a,b}	Nc	<0,001
NAFLD FS	-3,1±0,7	-2,0±0,8 ^a	-1,1±1,4 ^{a,b}	Nc	0,001
FIB4	0,67(0,45-0,89)	0,94(0,65-1,23)	1,42(1,02-1,82) ^a	Nc	<0,001
APRI	0,24(0,17-0,31)	0,43(0,28-0,58) ^a	0,64 (0,5-0,78) ^a	Nc	<0,001

Tabla 6. Variables antropométricas y bioquímicas de los distintos grupos del estudio.

Los resultados se expresan como media±DS o mediana y rango intercuartílico. ^ap<0,05: diferencias significativas con respecto al grupo de control sano. ^bp<0,05: diferencias significativas con respecto al grupo EHGNA F≤1. ^cp<0,05: diferencias significativas con respecto al grupo EHGNA F≥2. IMC: índice de masa corporal, DILI: lesión hepática inducida por fármacos, HOMA-IR: *homeostasis model assessment of insulin resistance* (índice de resistencia a la insulina). AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa, GGT: gamma-glutamilttransferasa, FA: fosfatasa alcalina; FLI: índice de hígado graso (*fatty liver index*), NAFLD FS: puntuación de fibrosis NAFLD (*NAFLD fibrosis score*), FIB4: fibrosis-4, APRI: índice de la relación AST-plaquetas (*AST-to-platelet ratio index*). Nc: No calculado.

Puesto que la EHGNA se asocia a la presencia de RI y el síndrome metabólico, comprobamos la presencia de las alteraciones típicas del síndrome metabólico en los pacientes control y en los pacientes con EHGNA, como son la existencia de una DM tipo 2, hipertensión y dislipemia (Figura 9):

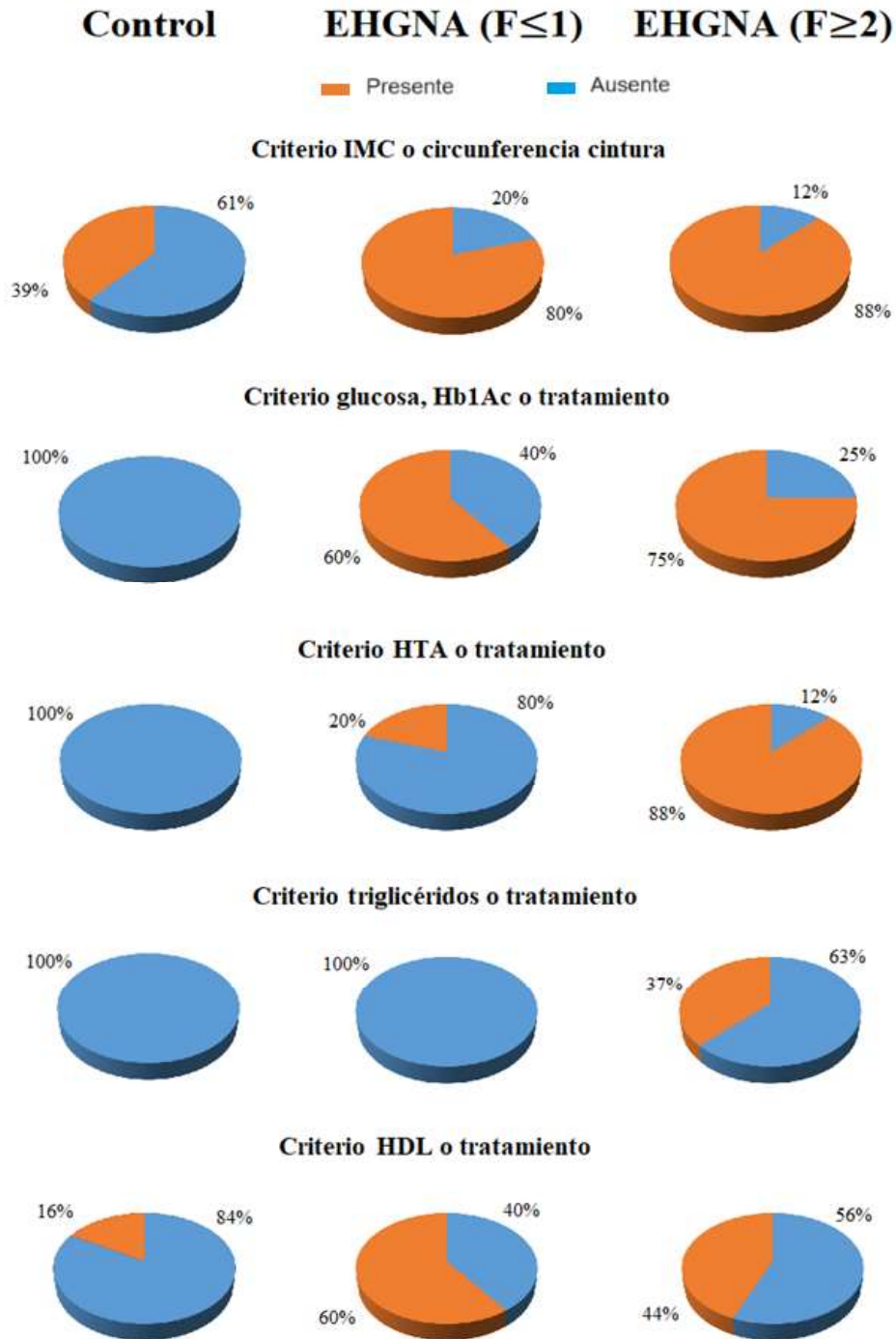


Figura 9. Presencia de las alteraciones asociadas al síndrome metabólico en los pacientes control y en los pacientes con EHGNA

Las características de los pacientes DILI se muestran a continuación.

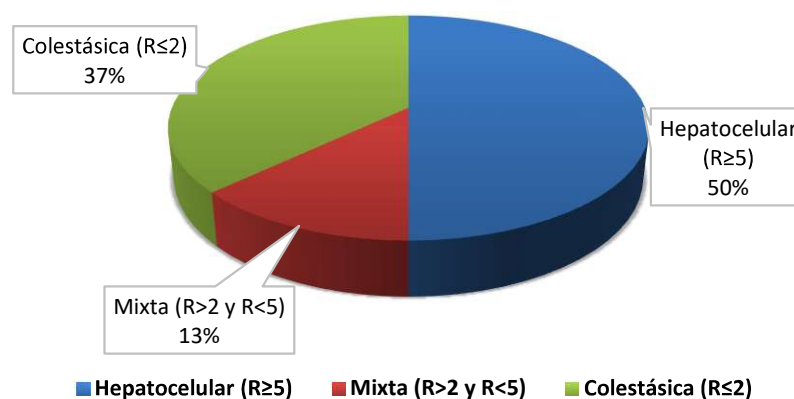


Figura 10. Tipo de hepatotoxicidad en los pacientes con DILI.

La gravedad del DILI se clasificó como leve en el 25% (n=2) de los pacientes, lesión moderada en el 62,5% (n=5), y un 12,5% de los pacientes fue sometido a un trasplante de hígado (n=1). Los agentes responsables del DILI fueron:

- combinación ombitasvir (ombitasvir, dasabuvir, paritaprevir y ritonavir) (n=1)
- clenbuterol/amoxicilina-clavulánico (n=1)
- suplemento dietético (n=1)
- terbinafina (n=1)
- isoniazida (n=1)
- levofloxacino (n=1)
- amoxicilina-clavulánico (n=2)

2. Las células iNKT aumentaron en pacientes con EHGNA y fibrosis significativa

En el análisis del porcentaje de células iNKT en PBMC pudimos observar que la frecuencia de células iNKT era significativamente mayor en pacientes con EHGNA y fibrosis hepática significativa ($F \geq 2$) ($0,27 \pm 0,08$) que en pacientes DILI ($0,09 \pm 0,03$, $p = 0,035$) y controles sanos ($0,11 \pm 0,02$, $p = 0,031$) (Figura 11).

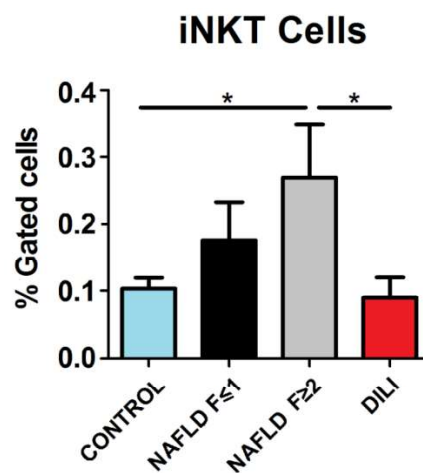


Figura 11. Porcentaje de células iNKT en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media \pm DE. * $p \leq 0,05$.

3. Las células iNKT de pacientes con DILI y con EHGNA con fibrosis significativa presentaron un perfil de activación temprana aumentado

Curiosamente, los pacientes EHGNA con fibrosis hepática significativa presentaban un aumento del porcentaje de células CD69+iNKT ($26,9 \pm 6,6$) con respecto a los que no presentaban fibrosis hepática significativa ($F \leq 1$) ($6,1 \pm 2,5$, $p = 0,040$) y a los controles sanos ($10,1 \pm 1,9$, $p = 0,031$) (Figura 12).

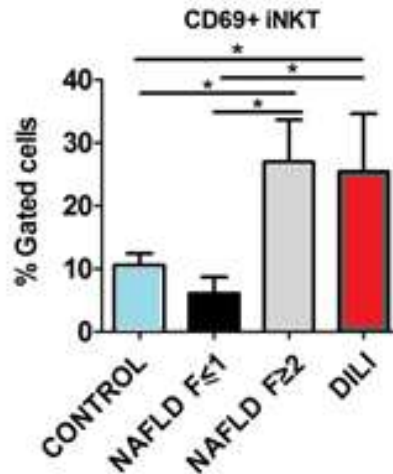


Figura 12. Porcentaje de células CD69+iNKT en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media \pm DE. * $p \leq 0,05$.

También se observó un aumento significativo del porcentaje de células CD69+iNKT en los pacientes con DILI (25,3 \pm 9,4) con respecto a los pacientes con EHGNA sin fibrosis hepática significativa (6,1 \pm 2,5, $p = 0,045$) y los controles sanos (10,1 \pm 1,9, $p = 0,042$).

4. Las células iNKT de pacientes con EHGNA presentaron un perfil de activación tardía aumentado

La frecuencia de células CD25+iNKT aumentó en los pacientes con EHGNA, independientemente del grado de fibrosis, en comparación con los controles sanos (para el grupo F ≤ 1 : 94,3 \pm 2,9 frente a 83,2 \pm 3,5, $p = 0,043$; y para grupo F ≥ 2 : 91,5 \pm 4,3 frente a 83,2 \pm 3,5, $p = 0,001$) (Figura 13). Asimismo, los pacientes EHGNA con fibrosis hepática significativa presentaron un marcado aumento del porcentaje de CD25+iNKT en comparación con los pacientes DILI (91,5 \pm 4,3 frente a 66,8 \pm 13,1, $p = 0,046$).

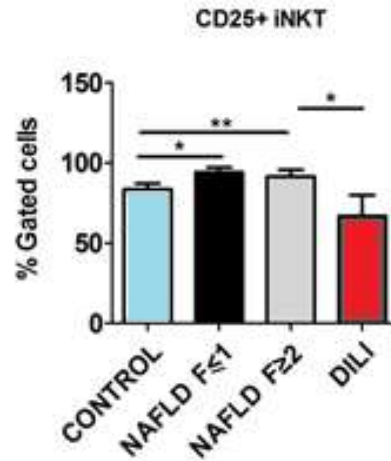


Figura 13. Porcentaje de células CD25+iNKT en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media±DE. *p ≤ 0,05, **p < 0,01.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células HLA-DR+iNKT entre los pacientes con EHGNA y DILI o los controles sanos (Figura 14).

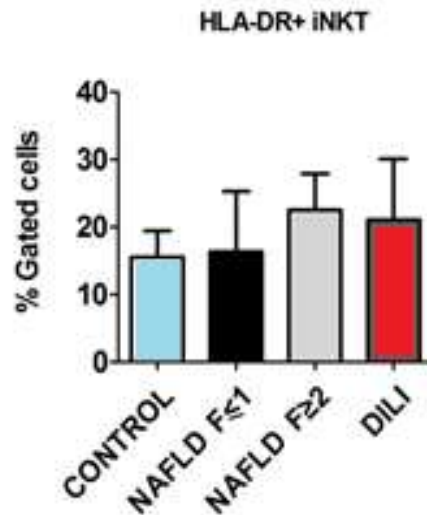


Figura 14. Porcentaje de células HLA-DR+iNKT en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media±DE.

5. Las células iNKT de pacientes con EHGNA presentaron un mayor estrés celular

Como se muestra en la Figura 15, el porcentaje de células NKG2D+iNKT aumentó en los pacientes con EHGNA con fibrosis hepática significativa ($70,6 \pm 7,7$) en comparación con los pacientes con DILI ($50,9 \pm 12,1$; $p = 0,016$) y con los controles sanos ($44,6 \pm 4,2$; $p = 0,001$).

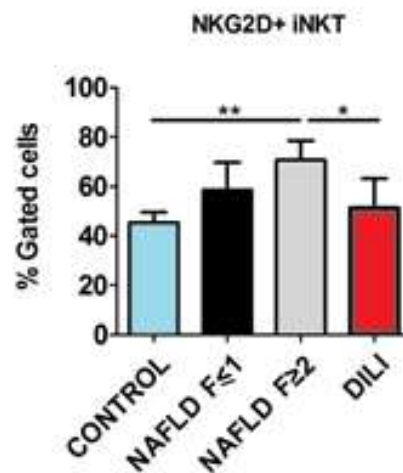


Figura 15. Porcentaje de células NKG2D+iNKT en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media \pm DE. * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$.

6. Los porcentajes de linfocitos T CD4+ y CD8+ fueron similares en los diferentes grupos de estudio.

Una vez visto el porcentaje de iNKT y su estado de activación, procedimos a analizar el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ entre los linfocitos procedentes de PBMC, no hallando diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de comparación (Figura 16).

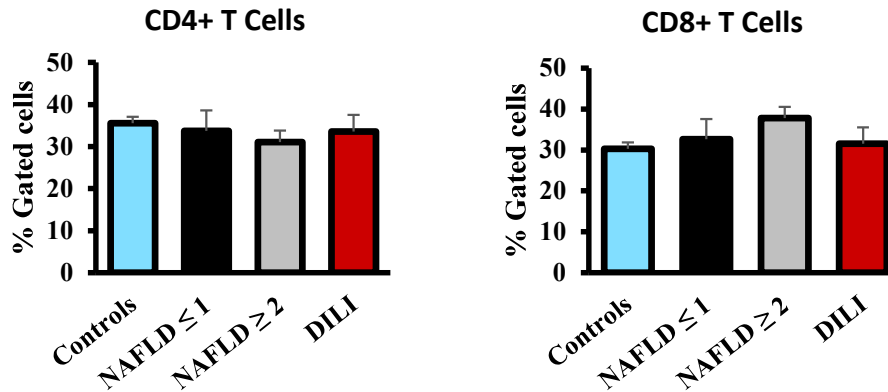


Figura 16. Porcentaje de células CD4+ y CD8+ en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media±DE.

7. El subconjunto de linfocitos T CD4+ CD69+ y HLA-DR+ fue mayor en pacientes con DILI

A continuación, tratamos de evaluar el perfil de activación de los linfocitos T CD4+ en pacientes con EHGNA y DILI. Se observó un aumento significativo del porcentaje de linfocitos T CD69+CD4+ en los pacientes con DILI en comparación con los pacientes con EHGNA (para el grupo F≤1: $0,97 \pm 0,27$ frente a $0,36 \pm 0,08$, $p = 0,011$; y para el grupo F≥2: $0,97 \pm 0,27$ frente a $0,50 \pm 0,10$ $p = 0,007$) y controles sanos ($0,97 \pm 0,27$ frente a $0,67 \pm 0,11$, $p = 0,045$) (Figura 17).

Cabe destacar que también se observó un aumento significativo del porcentaje de linfocitos T HLA-DR+CD4+ en pacientes con DILI en comparación con los controles sanos ($6,7 \pm 1,8$ frente a $2,5 \pm 0,2$; $p = 0,002$) (Figura 17).

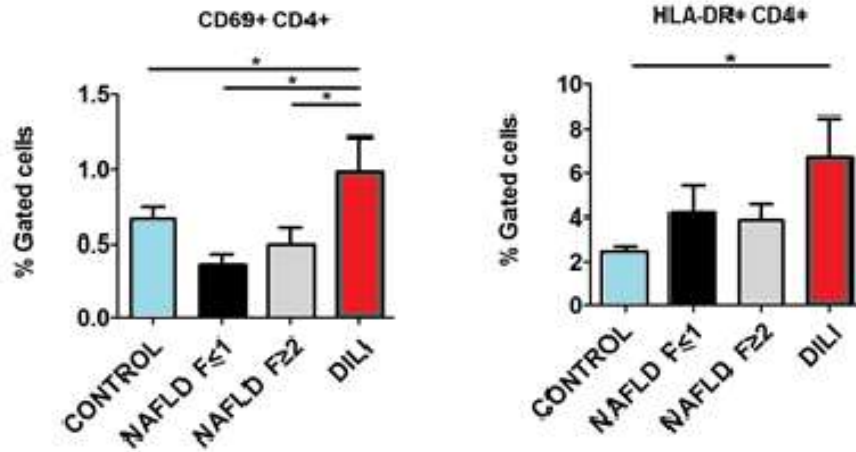


Figura 17. Porcentaje de células CD69+ y HLA-DR+ en linfocitos T CD4+ de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media \pm DE. * $p \leq 0,05$.

No se observaron cambios significativos en la expresión del marcador de activación tardía CD25 ni del marcador de estrés celular NKG2D en los linfocitos T CD4+ en los distintos grupos estudiados (Figura 18).

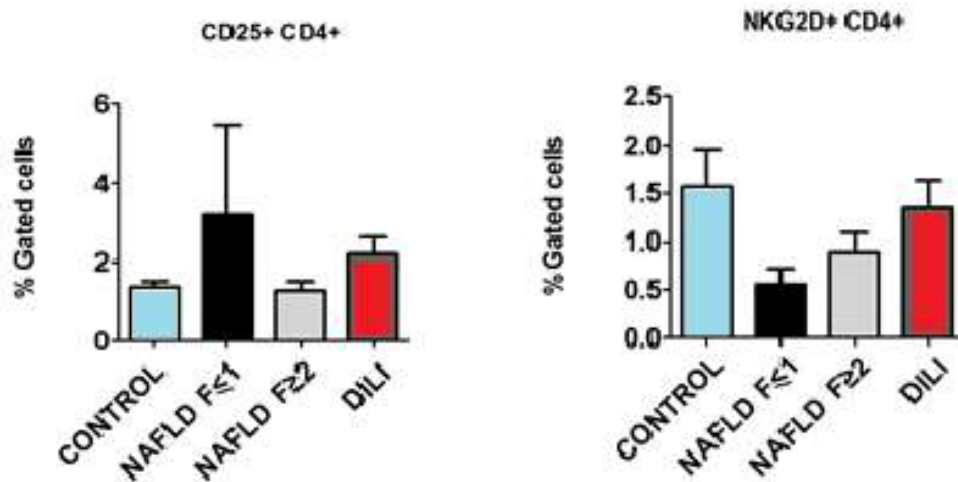


Figura 18. Porcentaje de células CD25+ y NKG2D+ en linfocitos T CD4+ de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media \pm DE.

8. El subconjunto de linfocitos T CD8+ CD69+ y HLA-DR+ fue mayor en pacientes con EHGNA y DILI

Los linfocitos T CD8+ mostraron un perfil de activación similar al observado en linfocitos T CD4+. Los linfocitos T CD69+CD8+ aumentaron notablemente en los pacientes con DILI en comparación con los pacientes con EHGNA (para el grupo F \leq 1: 4,5 \pm 1,3 frente a 1,3 \pm 0,3, p = 0,006; y para el grupo F \geq 2: 4,5 \pm 1,3 frente a 2,1 \pm 0,3, p = 0,032) y controles sanos (4,5 \pm 1,3 frente a 1,9 \pm 0,3, p = 0,001) (Figura 19).

Además, los linfocitos T HLA-DR+CD8+ aumentaron significativamente en los pacientes con DILI (12,6 \pm 2,6) en comparación con los pacientes con EHGNA sin fibrosis hepática significativa (F \leq 1) (6,9 \pm 1,1, p = 0,045) y los controles sanos (5,0 \pm 0,5, p < 0,001). Además, se observó un aumento significativo en los pacientes con EHGNA con fibrosis hepática significativa (F \geq 2) con respecto a los controles sanos (9,0 \pm 1,3 frente a 5,0 \pm 0,5, p = 0,006) (Figura 19).

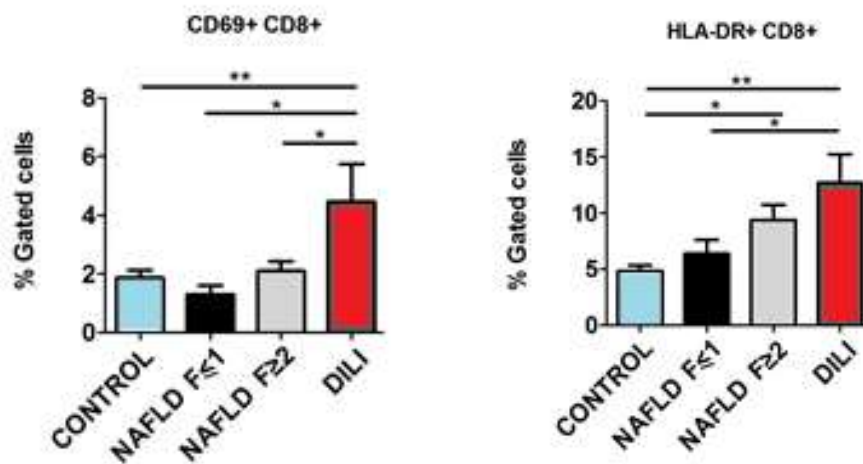


Figura 19. Porcentaje de células CD69+ y HLA-DR+ en linfocitos T CD8+ de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media \pm DE. *p \leq 0,05, **p < 0,01.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD25+CD8+ y NKG2D+CD8+ entre los grupos (Figura 20).

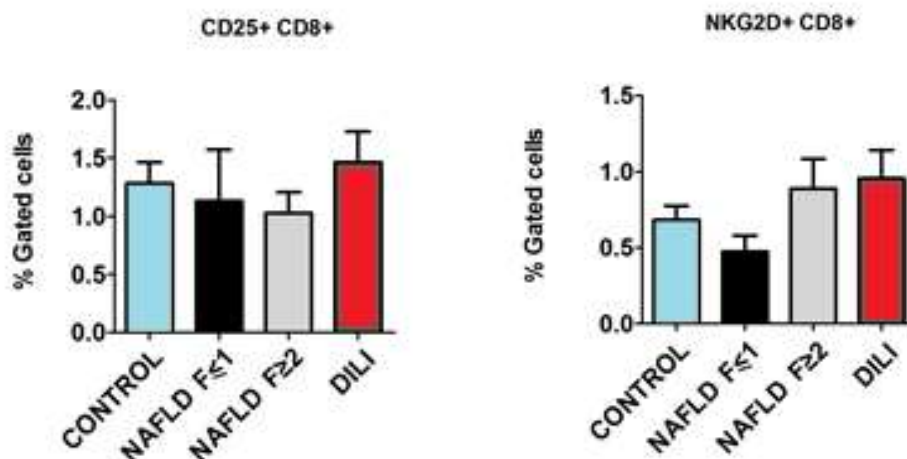


Figura 20. Porcentaje de células CD25+ y NKG2D+ en linfocitos T CD8+ de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA (NAFLD) y DILI. Los datos se presentan como media \pm DE.

9. Asociación entre el perfil de activación de las iNKT y los linfocitos CD4+ y CD8+ con las variables antropométricas/bioquímicas y los índices de hígado graso y fibrosis hepática

Cuando se analizaron todos los pacientes, se hallaron correlaciones positivas moderadas ($r > 0,4$) entre CD69+iNKT y AST ($r = 0,43$, $p = 0,003$) (Figura 21A), y entre los linfocitos T CD8+HLA-DR+ y FA ($r = 0,45$, $p = 0,001$) (Figura 21B). Además, hubo correlaciones marginales de bajas a moderadas ($0,35 < r < 0,4$) entre CD69+iNKT e insulina ($r = 0,37$, $p = 0,037$) y HOMA-IR ($r = 0,35$, $p = 0,049$), entre linfocitos T CD4+HLA-DR+ y FA ($r = 0,39$, $p = 0,005$), y entre linfocitos CD8+HLA-DR+ y AST ($r = 0,36$, $p = 0,015$). Las correlaciones restantes se muestran en la Figura 22.

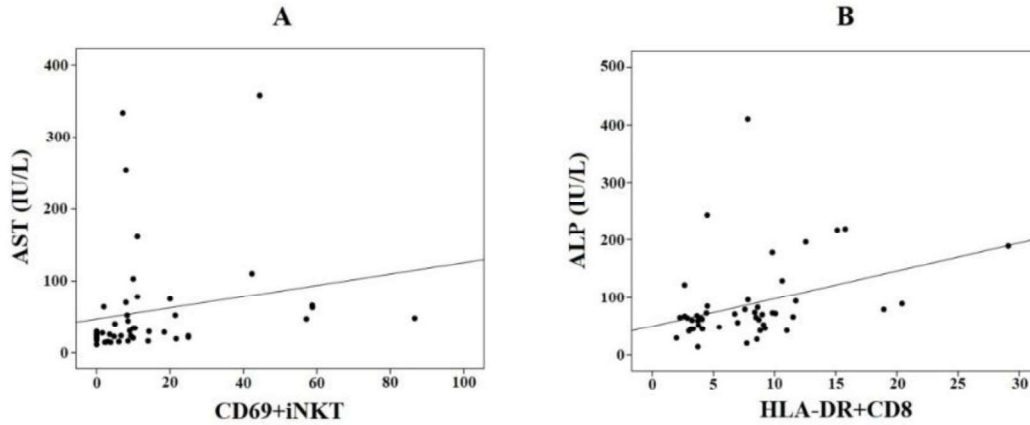


Figura 21. Correlaciones de Spearman entre el porcentaje de CD69+iNKT y AST (A), y entre el porcentaje de linfocitos T CD8+HLA-DR+ y FA (B), teniendo en cuenta toda la población estudiada (controles sanos, EHGNA y DILI).

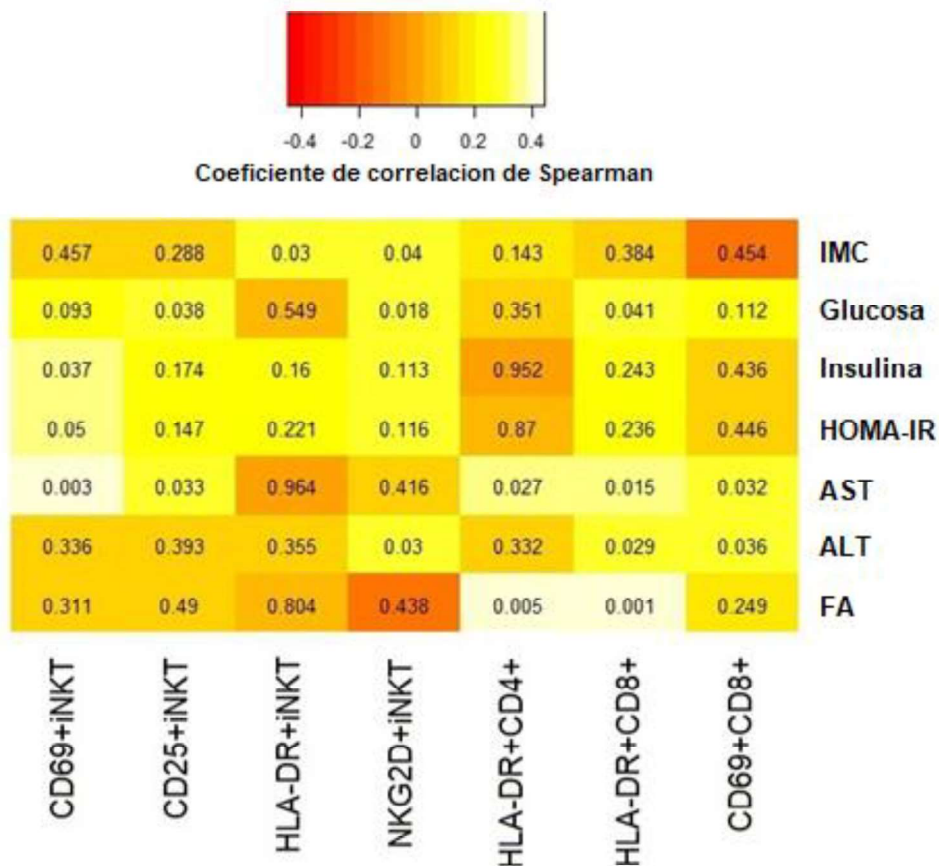


Figura 22. Correlaciones de Spearman entre los perfiles de activación de células iNKT y linfocitos T CD4+ y CD8+ con variables antropométricas/bioquímicas teniendo en cuenta toda la población estudiada (controles sanos, EHGNA y DILI) (valor p en cada celda).

Cuando sólo se consideraron los pacientes con EHGNA, la correlación positiva moderada entre CD69+iNKT y AST persistió, aunque no fue significativa ($r = 0,45$, $p = 0,068$). Por el contrario, en este subgrupo de pacientes, los niveles de ALT estaban inversamente correlacionados con la expresión tanto de HLA-DR+CD8+ ($r = -0,68$, $p = 0,001$) como de HLA-DR+CD4+ ($r = -0,47$, $p = 0,031$).

Para analizar la asociación con los índices de hígado graso y de fibrosis hepática, sólo se tuvieron en cuenta los pacientes control y los pacientes con EHGNA, excluyéndose el grupo con alto nivel de enzimas hepáticas (grupo DILI). Así, al excluir a los pacientes con DILI, la activación de CD25+iNKT se correlacionó positivamente con puntuaciones más altas de FLI ($r = 0,43$; $p = 0,021$) y APRI ($r = 0,38$; $p = 0,021$), así como entre CD69+iNKT y el índice FIB4 ($r = 0,39$; $p = 0,018$) y APRI ($r = 0,37$; $p = 0,025$).

VI. DISCUSIÓN

La relación entre el síndrome metabólico, la EHGNA y el DILI es compleja, y aún no está claro si la EHGNA supone un factor de riesgo para el desarrollo de DILI [195]. El importante papel que desempeña el sistema inmunitario en ambas entidades, así como el perfil clínico similar de esteatosis que ciertos fármacos inducen en el hígado, sugieren que pueden compartir mecanismos moleculares en los que interviene el sistema inmunitario. Por lo tanto, es fundamental caracterizar el papel del sistema inmunitario en ambas enfermedades para distinguir mejor los casos de DILI de los de EHGNA primaria.

En el grupo de pacientes con DILI, el resultado más llamativo fue el aumento de CD69+ y HLA-DR+ en los linfocitos T CD4+ y CD8+, que podrían utilizarse como biomarcadores para diferenciar entre pacientes con EHGNA y DILI, sobre todo en los que presentan elevaciones de leves a moderadas de las transaminasas. Las moléculas HLA tienen un papel relevante en la susceptibilidad al DILI y pueden explicar los diferentes patrones de daño hepático en el momento de la presentación [196]. Curiosamente, hemos observado un aumento significativo de HLA-DR+ en las células T CD4+ y CD8+ en DILI, lo que subraya el papel de la respuesta inmunitaria adaptativa en esta enfermedad hepática [197].

Podríamos hipotetizar que el aumento de CD69+CD4+ y HLA-DR+CD4+ podría explicarse por la aparición de neoantígenos tras la interacción del fármaco con proteínas, como demuestra su asociación con HLA, en una fase temprana de la exposición al fármaco. Se trataría, por tanto, de un estímulo antigénico que puede ser anterior a que se haya producido el daño hepático. La fibrosis nunca es un proceso que se detecte en las fases iniciales y reflejaría más bien el resultado de una estimulación crónica y persistente, probablemente tendente a un cambio en la polarización tanto de macrófagos como de células iNKT hacia un perfil Th2, lo que se relaciona con la fibrosis. Sin embargo, el

hecho de que haya también un aumento de CD69+ y HLA-DR+ en la población CD8+, y en menor medida en la población CD4+, sugiere más bien la participación de citoquinas Th1. A pesar de que las células CD4+ son necesarias para una respuesta inmunitaria, las células T citotóxicas CD8+ se consideran las principales células efectoras [198].

Los neoantígenos sintetizados en los hepatocitos por metabolitos reactivos también son presentados por HLA de clase I a los linfocitos T CD8+, lo que concuerda con la histología característica del DILI, rica en células T CD8+ [199]. Además, muchas de las asociaciones HLA que predicen el riesgo de DILI sugieren que la mayor parte de la lesión hepática en la DILI está causada por una respuesta inmunitaria mediada por células CD8+ [198]. Asimismo, la depleción de linfocitos T CD8+ protegía a los ratones de la lesión hepática inducida, lo que sugiere fuertemente que los linfocitos T CD8+ son en parte responsables del daño hepático [199]. Nuestros resultados encajan en este contexto con el aumento de linfocitos T CD69+CD8+, lo que sugiere que su perfil de activación está implicado en la DILI.

Maricic y sus colaboradores sugirieron la implicación de la respuesta inmunitaria mediada por células iNKT en la progresión de esteatosis a EHNA y fibrosis en un modelo experimental murino y en pacientes humanos con EHGNA [111]. Las células iNKT son proinflamatorias y pueden promover lesiones hepáticas [200]. En concordancia con estos resultados previos, hemos encontrado unos mayores niveles de células iNKT en PBMC de pacientes con EHGNA con fibrosis hepática significativa ($F \geq 2$), lo que sugiere un papel de las iNKT en la evolución de la EHGNA. Sin embargo, nuestro estudio no detalla las vías moleculares implicadas en el aumento de células iNKT en sangre periférica. Este aumento podría deberse a la pérdida de integridad intestinal y a la fuerte exposición a antígenos y metabolitos bacterianos, así como a la limpieza de lípidos libres en el microambiente proinflamatorio observado durante la esteatohepatitis [200]. Por otra parte, los pacientes con DILI mostraron un porcentaje de células iNKT similar al del grupo control, pero inferior al de los pacientes con EHGNA con mayor grado de fibrosis.

Con respecto al DILI, existen resultados contradictorios. Mientras que algunos estudios muestran un aumento de las iNKT tras el tratamiento con triptolide [201] y α -naftilisotiocianato [112], otros observan una disminución en ratones tratados con paracetamol [202]. Sin embargo, estos estudios se llevaron a cabo en el hígado de modelos animales, y no se mostraron datos sobre las células iNKT periféricas. Nuestro estudio, realizado en PBMC humanas, sugiere un papel más relevante de las células iNKT en la patogénesis de la EHGNA en comparación con el DILI, lo que puede representar una característica inmunológica diferencial entre estas dos entidades.

La activación de las células iNKT es un mecanismo crucial en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis y fibrosis, tanto en sangre periférica como en el hígado [111]. Aunque nuestros datos de sangre periférica podrían ser un reflejo de lo que ocurre en el hígado, no disponemos de datos inmunohistoquímicos que respalden esta hipótesis. Sin embargo, las correlaciones encontradas con los parámetros hepáticos apuntarían en esta dirección. Tras su activación, las células iNKT pueden mostrar una potente función efectora proinflamatoria [203]. Estudios previos han demostrado que la frecuencia de células T (CD3+) que expresan CD69 era mayor en el hígado de ratones alimentados una dieta con deficiente en metionina-colina, un modelo de EHNA ampliamente utilizado en ratones [204]. Nuestros resultados también revelaron una mayor expresión de CD69 en las células iNKT periféricas de pacientes con esteatosis con fibrosis hepática significativa. Además, encontramos una correlación positiva entre la expresión de CD69 en células iNKT y FIB4 (índice de fibrosis hepática), así como con la AST (predictor de lesión hepatocelular e insuficiencia hepática aguda) [205]. Estas correlaciones refuerzan nuestra hipótesis del posible papel de CD69+iNKT como biomarcador de la progresión de la fibrosis hepática.

La naturaleza de los antígenos que estimularían a las células iNKT es compleja. De hecho, las células iNKT humanas y de ratón pueden reconocer antígenos lipídicos y glicolipídicos de origen propio o microbiano presentados en moléculas CD1d del tipo MHC de clase I [206]. En este sentido, la permeabilidad intestinal parece estar aumentada en los pacientes con EHGNA,

lo que permitiría una exposición constante a antígenos dietéticos y microbianos. Esta permeabilidad alterada está asociada al grado de esteatosis hepática [207] y podría ser responsable del aumento de la activación CD69+ de las células iNKT. Pero, además, las células iNKT se localizan en el hígado, donde el metabolismo lipídico es muy activo, y en el tejido adiposo, otra localización con un alto metabolismo lipídico y con funciones endocrinas. Nuestros datos apoyarían el hecho de que las células iNKT desempeñan un papel importante en una enfermedad que implica un metabolismo lipídico anormal o una inflamación relacionada con los lípidos, como es el caso de la EHGNA, y en mucha menor medida en el DILI, en el que participarían preferentemente otros tipos celulares de la respuesta adaptativa clásica, como las células T CD8+ y CD4+. Sin embargo, nuestro estudio no se diseñó para extraer tal conclusión y esta hipótesis debe evaluarse en futuros estudios funcionales.

Las correlaciones positivas halladas entre CD69+iNKT e insulina y HOMA-IR refuerzan el papel de este tipo celular en la evolución de la EHGNA. Se sabe que la insulina elevada y la RI están implicadas en la etiología metabólica de la EHGNA. Como hemos podido observar, los pacientes con EHGNA con fibrosis hepática significativa muestran unos niveles más elevados de RI (mayor HOMA-IR). En los estados de RI, uno de los principales acontecimientos que se producen en el hígado es una acumulación excesiva de AGs libres y su posterior conversión en metabolitos tóxicos. Esto puede desencadenar vías de señalización oxidantes, inflamatorias, fibróticas y apoptóticas, que conducirían a una progresión de la EHGNA a EHNA [208].

En este contexto de progresión a fibrosis inducida por estrés, la NKG2D tiene un papel relevante en la mejora de la fibrosis hepática [187]. NKG2D es un marcador de daño tisular inducido por estrés [186]. Hemos observado un marcado aumento de los niveles de NKG2D+iNKT en pacientes con EHGNA con mayor fibrosis hepática, lo que coincide con los resultados hallados por Stiglund y sus colaboradores. Ellos demostraron una regulación al alza de NKG2D en células NK de sangre periférica en pacientes con EHNA [209], pero no en pacientes con hígado graso solo, en los que los niveles de NKG2D eran

similares a los encontrados en controles sanos. Postularon que el aumento de la expresión de NKG2D podría ser una reacción al aumento del estrés de los hepatocitos, la inflamación y las señales derivadas de la microbiota intestinal observadas en pacientes con EHNA [210]. Las correlaciones positivas entre NKG2D+iNKT y la glucosa sérica y el IMC, que también son marcadores subrogados de estrés y de inflamación crónica [211], podrían sugerir la activación de NKG2D en respuesta a la fibrosis hepática.

Para finalizar, sería interesante para futuros estudios poder incluir un grupo control con características similares a las del grupo EHGNA (mayor edad e IMC), pero sin RI ni anomalías a nivel hepático.



VII. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Como puntos fuertes, en primer lugar, hay que destacar la originalidad del tema de estudio, abordando una cuestión de gran trascendencia clínica y científica en biomedicina, como es la identificación de nuevos biomarcadores con utilidad para el diagnóstico no invasivo de enfermedades hepáticas muy prevalentes en la población, tales como la EHGNA y el DILI. Por otro lado a pesar de que el DILI es un acontecimiento poco frecuente, los pacientes incluidos en el estudio constituyen una población muy bien estudiada y clasificada, con un seguimiento a largo plazo. De hecho, a pesar del tamaño limitado de la muestra, los resultados fueron consistentes y no mostraron desviaciones significativas, permitiendo tras la corrección de pruebas múltiples obtener resultados sólidos. Además, el subconjunto de células iNKT y los marcadores de activación evaluados han sido poco investigados en poblaciones humanas.

Como limitaciones del estudio constatar en primer lugar que el diagnóstico en 9 de los 21 pacientes con EHGNA no se hizo mediante biopsia hepática, que es el método diagnóstico de referencia, por lo que la caracterización de este grupo de pacientes no fue homogénea. Por otro lado, se trata de un estudio unicéntrico con un tamaño muestral relativamente pequeño.



VIII. CONCLUSIONES

- Nuestros hallazgos identificaron el marcador CD69+ en linfocitos T CD8+ y CD4+ como un potencial nuevo biomarcador que podría mejorar el diagnóstico no invasivo de la hepatotoxicidad frente a la EHGNA.
- El incremento de células CD69+iNKT en pacientes con EHGNA con fibrosis hepática significativa y su asociación con los índices de fibrosis FIB4 y APRI sugieren que éstos podrían ser un biomarcador de progresión de la fibrosis hepática en la EHGNA.
- Este estudio muestra una clara implicación de los mecanismos inmunitarios en estas enfermedades hepáticas, la EHGNA y el DILI.



IX. ANEXOS

1. Check-list

ESPACIO PARA PEGATINA IDENTIFICATIVA

Rodear con un círculo según corresponda:

EHNA

CONTROL

DILI

Fecha de la visita: _____

Teléfonos de contacto: _____

Antecedentes personales:

Alergias medicamentosas: NO Sí (Indicar): _____

Hábitos tóxicos:

Tabaco: NO Sí (Indicar cig/día): _____

Alcohol: NO Sí (Indicar en g/día): _____

Otras drogas recreativas: NO Sí (Indicar): _____

Enfermedades prevalentes: NO Sí (Indicar): _____

Intervenciones quirúrgicas: NO Sí (Indicar): _____

Medicación habitual: NO Sí (Indicar): _____

Medicación ocasional (en el último mes): NO Sí (Indicar): _____

Medicación sospechosa (en casos DILI): _____

Posología: _____

Tiempo de tratamiento (fecha de inicio y fin): _____

Indicación: _____

Medidas antropométricas:

Peso (kg): _____ Talla (cms): _____ IMC: _____

Perímetro abdominal (cms): _____

Tensión arterial (mmHg): _____ FC (lpm): _____

Pruebas complementarias:

Muestras biológicas. Fecha de realización: _____

¿Se extrae muestra de sangre para Biobanco? SI NO

¿Se envía muestra de sangre a Laboratorio Local? SI NO

¿Entrega muestra de heces para Biobanco? SI NO

¿Entrega muestra de orina para Biobanco? SI NO

Ecografía abdomen. Fecha de realización: _____

¿Hígado de tamaño, morfología y ecogenicidad normales?

SI NO (indicar): _____

¿Vesícula biliar sin contenido?

SI NO (indicar): _____

¿Porta permeable y de tamaño normal?

SI NO (indicar): _____

¿VB intrahepática y extrahepática normales?

SI NO (indicar): _____

¿Páncreas y bazo normales?

SI NO (indicar): _____

¿Ausencia de líquido libre intraperitoneal?

SI NO (indicar): _____

Fibroscan. Fecha de realización: _____

Sonda empleada: M XL

Resultado Fibroscan (kPa):

Índice de éxitos (%):

IQR/med (%):

Número de mediciones válidas:

Interpretación:

Índices serológicos

Hepatic steatosis index (HSI): _____

Fatty Liver Index (FLI): _____

NAFLD fibrosis score: _____

FIB-4: _____

APRI: _____

Forns: _____

2. Lista de figuras

Figura 1. Mecanismos de DILI y vías implicadas. Adaptado de Chen M et al. *J Hepatol.* 2015;63(2):503-14.

Figura 2. Factores de riesgo más importantes dependientes del huésped y del fármaco.

Figura 3. Principales marcadores epigenéticos y mecanísticos en DILI. Modificado de Andrade et al. *Nature Rev Dis Primers* 2019.

Figura 4. Respuesta inmune adaptativa e innata en DILI (Modificado de Liu W, Zeng X, Liu Y, et al. *The Immunological Mechanisms and Immune-Based Biomarkers of Drug-Induced Liver Injury. Front Pharmacol.* 2021;12:723940).

Figura 5. Respuesta inmune adaptativa e innata en EHNA (Tomado de Huby T, Gautier EL. *Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis. Nat Rev Immunol.* 2022;22(7):429-443).

Figura 6. Estrategias de separación celular (*gating*) utilizadas para la calibración de los anticuerpos primarios por citometría de flujo.

Figura 7. Estrategias de separación celular (*gating*) utilizadas para la identificación de las células iNKT por citometría de flujo.

Figura 8. Estrategias de separación celular (*gating*) utilizadas para la identificación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ por citometría de flujo.

Figura 9. Presencia de las alteraciones asociadas al síndrome metabólico en los pacientes control y en los pacientes con EHGNA.

Figura 10. Tipo de hepatotoxicidad en los pacientes con DILI.

Figura 11. Porcentaje de células iNKT en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA y DILI.

Figura 12. Porcentaje de células CD69+iNKT en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA y DILI.

Figura 13. Porcentaje de células CD25+iNKT en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA y DILI.

Figura 14. Porcentaje de células HLA-DR+iNKT en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA y DILI.

Figura 15. Porcentaje de células NKG2D+iNKT en linfocitos T de PBMC de controles.

Figura 16. Porcentaje de células CD4+ y CD8+ en linfocitos T de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA y DILI.

Figura 17. Porcentaje de células CD69+ y HLA-DR+ en linfocitos T CD4+ de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA y DILI.

Figura 18. Porcentaje de células CD25+ y NKG2D+ en linfocitos T CD4+ de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA y DILI.

Figura 19. Porcentaje de células CD69+ y HLA-DR+ en linfocitos T CD8+ de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA y DILI.

Figura 20. Porcentaje de células CD25+ y NKG2D+ en linfocitos T CD8+ de PBMC de controles sanos, pacientes con EHGNA y DILI.

Figura 21. Correlaciones de Spearman entre el porcentaje de CD69+iNKT y AST (A), y entre el porcentaje de linfocitos T CD8+HLA-DR+ y FA (B), teniendo en cuenta toda la población estudiada (controles sanos, EHGNA y DILI).

Figura 22. Correlaciones de Spearman entre los perfiles de activación de células iNKT y linfocitos T CD4+ y CD8+ con variables antropométricas/bioquímicas teniendo en cuenta toda la población estudiada (controles sanos, EHGNA y DILI) (valor p en cada celda).

3. Lista de tablas

Tabla 1. Principales causas de enfermedad hepática a excluir antes de considerar un diagnóstico de hepatotoxicidad.

Tabla 2. Evaluación de Causalidad de un fármaco en caso de daño hepático agudo (Escala de CIOMS). Adaptado de Danan G, Benichou C. J Clin Epidemiol. England: 1993:1323-30.

Tabla 3. Principales alelos de riesgo para DILI.

Tabla 4. Criterios cardiometabólicos para el diagnóstico de EHmet

Tabla 5. Factores de riesgo asociados al desarrollo y progresión de la EHGNA.

Tabla 6. Variables antropométricas y bioquímicas de los distintos grupos del estudio.

4. Diccionario de abreviaturas

AGs: Ácidos grasos

APAP: Acetaminofeno

APRI: *AST to Platelet Ratio Index*

AST: Aspartato aminotransferasa

ALT: Alanino aminotransferasa

CHC: Carcinoma hepatocelular

Cck18: *Caspase cleaved keratin 18*

CD: Células dendríticas

CIOMS/RUCAM: *Council for International Organizations of Medical Sciences/Rousel Uclaf Casualty Assessment Method*

CPA: Célula presentadora de antígenos

CTL: *Cytolytic T Lymphocyte*

DAMP: *Damage-associated molecular pattern*

DILI: *Drug Induced Liver Injury*

DM2: Diabetes mellitus tipo II

EHGNA: Enfermedad del hígado graso no alcohólico

EHmet: Esteatosis hepática metabólica

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica

ES: Esteatosis simple

ET: Elastografía de transición

FA: Fosfatasa Alcalina

FHA: Fallo hepático agudo

GGT: Gamma-glutamiltanspeptidasa

GLDH: Glutamato deshidrogenasa

GWAs: *Genome-wide association study*

HLA: *Human leukocyte antigen*

HTA: Hipertensión arterial

HMGB1: *High-mobility group box 1*

IDILI: *Idiosyncratic DILI*

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

K18: *Keratin 18*

LSN: Límite superior de la normalidad

MALFD: *Metabolic associated fatty liver disease*

MIR: MicroRNA

MPO: Mieloperoxidasa

NAC: N-acetilcisteína

NAFLD FS: *Non-alcoholic fatty liver disease fibrosis score*

NK: *Natural killer*

NKT: *Natural killer T*

OPN: Osteopontina

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cells*

RI: Resistencia a la insulina

ROS: *Reactive oxygen species*

TLR: *Toll-like receptors*

TNF: Factor de necrosis tumoral

TREGS: T reguladoras

VLDL: *Very low-density lipoprotein*

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

5. Trabajo científico relacionado con la tesis

5.1 Publicación científica que avala la tesis doctoral

Differential iNKT and T Cells Activation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Drug-Induced Liver Injury. Caballano-Infantes E, **García-García A**, López-Gómez C, Cueto A, Robles-Díaz M, Ortega-Alonso A, Martín-Reyes F, Álvarez-Álvarez I, Arranz-Salas I, Ruiz-Cabello F, et al. *Biomedicines*. 2022; 10(1):55.

**** Publicación completa al final del texto**

5.2 Comunicaciones a congresos

Activation marker CD69 differentiates non-alcoholic steatohepatitis from drug-induced liver injury. Estefanía Caballano-Infantes, **Alberto García García**, Carlos López-Gómez, A Cueto, Mercedes Robles-Díaz, Aida Ortega-Alonso, F Martín-Reyes, Ismael Álvarez-Álvarez, Isabel Arranz-Salas, Francisco Ruiz-Cabello, María Isabel Lucena, Eduardo García-Fuentes, Raul J. Andrade, Miren García Cortes. The international Liver Congress (EASL). Online. Junio 2022.

Identification of a differential immunophenotype in iNKT cells and T cells activation profile in metabolic associated fatty liver disease and idiosyncratic drug-induced liver injury. Estefanía Caballano-Infantes, **Alberto García García**, A Cueto, Inmaculada Medina-Cáliz, Flores Martín-Reyes, Enrique del Campo Herrera, Judith Sanabria Cabrera, Camilla Stephens, Francisco Ruiz-Cabello, M Isabel Lucena, Prof. Raul J. Andrade, Miren García-Cortes, Eduardo García Fuentes. The Liver Meeting 2021 (AASLD). Online. Noviembre 2021.

Identificación de un inmunofenotipo diferencial en células iNKT y en el perfil de activación de células T en el daño hepático inducido por fármacos y en la esteatohepatitis no alcohólica. Estefanía Caballano-Infantes, **Alberto García García**, Flores Martín-Reyes, Enrique del Campo Herrera, A. Cueto-Sánchez, I. Medina-Cáliz, Aida Ortega-Alonso, Mercedes Robles-Díaz, Camilla Stephens, María Isabel Lucena, Raul J. Andrade, Miren García Cortes, Eduardo García-Fuentes. 46º congreso anual de la AEEH. Madrid. Junio 2021.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Andrade R, Lucena M. Drug induced liver disease-Mechanisms and diagnosis. In: John McDonald AB, ed. Evidence-Based Gastroenterology and Hepatology. 3th ed: Wiley-Blackwell; 2010: 771-86.
2. Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, et al. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(7):950-967.
3. Andrade RJ, Lucena MI, Fernández MC, et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period [published correction appears in *Gastroenterology*. 2005 Nov;129(5):1808]. *Gastroenterology*. 2005;129(2):512-521.
4. Björnsson ES, Bergmann OM, Björnsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1419-e20.
5. Chalasani N, Bonkovsky HL, Fontana R, et al. Features and Outcomes of 899 Patients With Drug-Induced Liver Injury: The DILIN Prospective Study. *Gastroenterology*. 2015;148(7):1340-52.e7.
6. de Abajo FJ, Montero D, Madurga M, García Rodríguez LA. Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;58(1):71-80.
7. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology*. 2002;36(2):451-455.
8. Døssing M, Sonne J. Drug-induced hepatic disorders. Incidence, management and avoidance. *Drug Saf*. 1993;9(6):441-449.
9. Larrey D. [Drug-induced hepatitis: epidemiologic, clinical, diagnostic and physiopathologic aspects in 1995]. *Rev Med Interne* 1995;16(10): 752-8.
10. Bruguera M, Barrera JM, Corradi F, Mas A. Hypertransaminasemia greater than 400 U/l in adults seen at a tertiary hospital. Prospective study of etiology. *Gastroenterol Hepatol* 2005; 28(1):15-9.
11. Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ, et al. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(6):806-815.
12. Yuan L, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver injury. *Clin Liver Dis*. 2013;17(4):507-vii.
13. Iorga A, Dara L, Kaplowitz N. Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *Int J Mol Sci*. 2017 May 9;18(5):1018.
14. Lucena MI, Molokhia M, Shen Y, et al. Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA class I and II alleles. *Gastroenterology*. 2011;141(1):338-347.
15. Stephens C, López-Nevot MÁ, Ruiz-Cabello F, et al. HLA alleles influence the clinical signature of amoxicillin-clavulanate hepatotoxicity. *PLoS One*. 2013;8(7):e68111. Published 2013 Jul 9.
16. Stephens C, Andrade RJ, Lucena MI. Mechanisms of drug-induced liver injury. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014;14(4):286-292.
17. Chen M, Suzuki A, Borlak J, Andrade RJ, Lucena MI. Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *J Hepatol*. 2015;63(2):503-514.
18. Dara L, Liu ZX, Kaplowitz N. Mechanisms of adaptation and progression in idiosyncratic drug induced liver injury, clinical implications. *Liver Int*. 2016;36(2):158-165.
19. Dara L, Liu Z-X, Kaplowitz N. Pathogenesis of idiosyncratic drug induced liver injury. In: Muriel P, editor. *Liver pathophysiology*. Elsevier; 2017. p. 87–100.
20. Moore TJ, Cohen MR, Furberg CD. Serious adverse drug events reported to the Food and Drug Administration, 1998-2005. *Arch Intern Med*. 2007;167(16):1752-1759.
21. Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries. *J Clin Epidemiol*. 1993;46(11):1323-1330.
22. Lucena MI, Andrade RJ, Kaplowitz N, et al. Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex. *Hepatology*. 2009;49(6):2001-2009.
23. Bryant AE 3rd, Dreifuss FE. Valproic acid hepatic fatalities. III. U.S. experience since 1986. *Neurology*. 1996;46(2):465-469.

24. Felker D, Lynn A, Wang S, Johnson DE. Evidence for a potential protective effect of carnitine-pantothenic acid co-treatment on valproic acid-induced hepatotoxicity. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2014;7(2):211-218.
25. Hunt CM, Yuen NA, Stirnadel-Farrant HA, Suzuki A. Age-related differences in reporting of drug-associated liver injury: data-mining of WHO Safety Report Database. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2014;70(2):519-526.
26. deLemos AS, Foureau DM, Jacobs C, Ahrens W, Russo MW, Bonkovsky HL. Drug-induced liver injury with autoimmune features. *Semin Liver Dis*. 2014;34(2):194-204.
27. Reuben A, Koch DG, Lee WM; Acute Liver Failure Study Group. Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology*. 2010;52(6):2065-2076.
28. Robles-Diaz M, Lucena MI, Kaplowitz N, et al. Use of Hy's law and a new composite algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury. *Gastroenterology*. 2014;147(1):109-118.e5.
29. Zimmerman HJ. Effects of alcohol on other hepatotoxins. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986;10(1):3-15.
30. Bruno S, Maisonneuve P, Castellana P, et al. Incidence and risk factors for non-alcoholic steatohepatitis: prospective study of 5408 women enrolled in Italian tamoxifen chemoprevention trial. *BMJ*. 2005;330(7497):932.
31. Rosenberg P, Urwitz H, Johannesson A, et al. Psoriasis patients with diabetes type 2 are at high risk of developing liver fibrosis during methotrexate treatment. *J Hepatol*. 2007;46(6):1111-1118.
32. Laharie D, Seneschal J, Schaefferbeke T, et al. Assessment of liver fibrosis with transient elastography and FibroTest in patients treated with methotrexate for chronic inflammatory diseases: a case-control study. *J Hepatol*. 2010;53(6):1035-1040.
33. Núñez M. Hepatotoxicity of antiretrovirals: incidence, mechanisms and management. *J Hepatol*. 2006;44(1 Suppl):S132-S139.
34. Singh D, Cho WC, Upadhyay G. Drug-Induced Liver Toxicity and Prevention by Herbal Antioxidants: An Overview. *Front Physiol*. 2016;6:363. Published 2016 Jan 26.
35. Thomas AM, Lewis JH. Nonacetaminophen Drug-Induced Acute Liver Failure. *Clin Liver Dis*. 2018;22(2):301-324.
36. Andrade R, Lucena M. Hepatitis tóxica. In: Montoro M, García-Pagán J, eds. Gastroenterología y hepatología Problemas comunes en la práctica clínica. 2nd ed. Madrid; 2012: 735-46.
37. Bjornsson ES, Jonasson JG. Drug-induced cholestasis. *Clin Liver Dis*. 2013;17(2):191-209.
38. Bénichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol*. 1990;11(2):272-276.
39. Medina-Caliz I, Robles-Diaz M, García-Muñoz B, et al. Definition and risk factors for chronicity following acute idiosyncratic drug-induced liver injury. *J Hepatol*. 2016;65(3):532-542.
40. Rabinowich L, Shibolet O. Drug Induced Steatohepatitis: An Uncommon Culprit of a Common Disease. *Biomed Res Int*. 2015;2015:168905.
41. Schumacher JD, Guo GL. Mechanistic review of drug-induced steatohepatitis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;289(1):40-47.
42. Grieco A, Forgione A, Miele L, et al. Fatty liver and drugs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2005;9(5):261-263.
43. Hock B, Schwarz M, Domke I, et al. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. *Addiction*. 2005;100(10):1477-1486.
44. Patel V, Sanyal AJ. Drug-induced steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2013;17(4):533-vii.
45. García-Cortés M, Stephens C, Lucena MI, Fernández-Castañer A, Andrade RJ. Causality assessment methods in drug induced liver injury: strengths and weaknesses. *J Hepatol*. 2011;55(3):683-691.
46. García-Cortés M, Lucena MI, Pachkoria K, et al. Evaluation of naranjo adverse drug reactions probability scale in causality assessment of drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(9):780-789.
47. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(6):703-711.
48. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) [published correction appears in *Methods*. 2010 Nov;52(3):268]. *Methods*. 2010;50(4):298-301.



49. Hayashi PH, Lucena MI, Fontana RJ, et al. A revised electronic version of RUCAM for the diagnosis of DILI. *Hepatology*. 2022;76(1):18-31.
50. Aithal GP. Pharmacogenetic testing in idiosyncratic drug-induced liver injury: current role in clinical practice. *Liver Int*. 2015;35(7):1801-1808.
51. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
52. Baffy G. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Med*. 2015;4(12):1977-1988. Published 2015 Dec 4.
53. Pachkoria K, Lucena MI, Crespo E, et al. Analysis of IL-10, IL-4 and TNF-alpha polymorphisms in drug-induced liver injury (DILI) and its outcome. *J Hepatol*. 2008;49(1):107-114.
54. Kasztelan-Szczerbińska B, Surdacka A, Celiński K, et al. Prognostic Significance of the Systemic Inflammatory and Immune Balance in Alcoholic Liver Disease with a Focus on Gender-Related Differences. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128347. Published 2015 Jun 24.
55. Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4402-4407.
56. McGill MR, Jaeschke H. Biomarkers of drug-induced liver injury. *Adv Pharmacol*. 2019;85:221-239.
57. Nelson RL, Povey MS, Hopkinson DA, Harris H. Electrophoresis of human l-glutamate dehydrogenase: tissue distribution and preliminary population survey. *Biochem Genet*. 1977;15(1-2):87-91.
58. Church RJ, Kullak-Ublick GA, Aubrecht J, et al. Candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of drug-induced liver injury: An international collaborative effort. *Hepatology*. 2019;69(2):760-773.
59. McGill MR, Jaeschke H. Biomarkers of drug-induced liver injury: progress and utility in research, medicine, and regulation. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(9):797-807.
60. Fu S, Wu D, Jiang W, et al. Molecular Biomarkers in Drug-Induced Liver Injury: Challenges and Future Perspectives. *Front Pharmacol*. 2020;10:1667. Published 2020 Jan 30.
61. Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, et al. High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis in vivo. *Toxicol Sci*. 2009;112(2):521-531.
62. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*. 2010;53(2):372-384.
63. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-285.
64. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
65. Amirkalali B, Poustchi H, Keyvani H, et al. Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Its Predictors in North of Iran. *Iran J Public Health*. 2014;43(9):1275-1283.
66. Caballeria J, Caballeria L. "Nonalcoholic steatohepatitis and diabetes". *Endocrinol Nutr*. 2016;63(8):377-379
67. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol*. 2018;69(4):896-904.
68. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(6):319-327.
69. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology*. 2008;48(3):792-798.
70. Marchesini G, Mazzotti A. NAFLD incidence and remission: only a matter of weight gain and weight loss? *J Hepatol*. 2015;62(1):15-17.
71. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):330-344.
72. Jin X, Ye YF, Chen SH, Yu CH, Liu J, Li YM. MicroRNA expression pattern in different stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*. 2009;41(4):289-297.
73. Lin YC, Chang PF, Chang MH, Ni YH. A common variant in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease in obese children. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(2):326-331.

74. Siddiqui MS, Idowu MO, Parmar D, et al. A Phase 2 Double Blinded, Randomized Controlled Trial of Saroglitazar in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021;19(12):2670-2672.
75. Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1139-1142.
76. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;146(3):726-735.
77. Lecoultre V, Egli L, Carrel G, et al. Effects of fructose and glucose overfeeding on hepatic insulin sensitivity and intrahepatic lipids in healthy humans. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(4):782-785.
78. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-1351.
79. O'Sullivan TA, Oddy WH, Bremner AP, et al. Lower fructose intake may help protect against development of nonalcoholic fatty liver in adolescents with obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58(5):624-631.
80. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010;52(2):774-788.
81. Qin B, Anderson RA, Adeli K. Tumor necrosis factor- α directly stimulates the overproduction of hepatic apolipoprotein B100-containing VLDL via impairment of hepatic insulin signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(5):G1120-G1129.
82. Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(5):279-297.
83. Kazankov K, Jørgensen SMD, Thomsen KL, et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(3):145-159.
84. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome [published correction appears in *Hepatology*. 2003 Aug;38(2):536]. *Hepatology*. 2003;37(4):917-923.
85. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-357.
86. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*. 2000;132(2):112-117.
87. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*. 1994;107(4):1103-1109.
88. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643-e40.
89. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2005;128(7):1898-1906.
90. Kleiner DE, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Semin Liver Dis*. 2012;32(1):3-13.
91. Fishbein M, Castro F, Cheruku S, et al. Hepatic MRI for fat quantitation: its relationship to fat morphology, diagnosis, and ultrasound. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(7):619-625.
92. Ryan CK, Johnson LA, Germin BI, Marcos A. One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation. *Liver Transpl*. 2002;8(12):1114-1122.
93. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, et al. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(10):1209-1222.
94. Tada T, Iijima H, Kobayashi N, et al. Usefulness of Attenuation Imaging with an Ultrasound Scanner for the Evaluation of Hepatic Steatosis. *Ultrasound Med Biol*. 2019;45(10):2679-2687.
95. Alkhoury N, Carter-Kent C, Feldstein AE. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5(2):201-212.
96. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology*. 2009;50(4):1072-1078.

97. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med.* 2011;43(8):617-649.
98. Joka D, Wahl K, Moeller S, et al. Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2012;55(2):455-464.
99. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(9):1499-1507.
100. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(8):1497-1502.
101. Başkol M, Başkol G, Deniz K, Ozbakir O, Yücesoy M. A new marker for lipid peroxidation: serum paraoxonase activity in non-alcoholic steatohepatitis. *Turk J Gastroenterol.* 2005;16(3):119-123.
102. Feldstein AE, Lopez R, Tamimi TA, et al. Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res.* 2010;51(10):3046-3054.
103. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(6):1372-1379.
104. Alkhouri N, Morris-Stiff G, Campbell C, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio: a new marker for predicting steatohepatitis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2012;32(2):297-302.
105. Jing J, Wang R, Zhao XY, et al. Association between the concurrence of pre-existing chronic liver disease and worse prognosis in patients with an herb- Polygonum multiflorum thub.induced liver injury: A case-control study from a specialised liver disease center in China. *BMJ Open* 2019, 9, e023567
106. Lammert C, Imler T, Teal E, Chalasani N. Patients With Chronic Liver Disease Suggestive of Nonalcoholic Fatty Liver Disease May Be at Higher Risk for Drug-Induced Liver Injury. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(13):2814-2815.
107. Kleiner DE, Chalasani NP, Lee WM, et al. Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. *Hepatology.* 2014;59(2):661-670.
108. Nati M, Chung KJ, Chavakis T. The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Innate Immun.* 2022;14(1):31-41.
109. Mishra A, Upadhyay PK, Nagarajan P. Immunotherapy in Liver Diseases: A Balance Between Immunity and Tolerance [published online ahead of print, 2016 Nov 16]. *Curr Drug Metab.* 2016
110. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):101-117.
111. Maricic I, Marrero I, Eguchi A, et al. Differential Activation of Hepatic Invariant NKT Cell Subsets Plays a Key Role in Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Immunol.* 2018;201(10):3017-3035.
112. Nong C, Zou M, Xue R, et al. The role of invariant natural killer T cells in experimental xenobiotic-induced cholestatic hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 2020;122:109579.
113. Patel SJ, Luther J, Bohr S, et al. A Novel Resolvin-Based Strategy for Limiting Acetaminophen Hepatotoxicity. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016;7(3):e153. Published 2016 Mar 17.
114. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol.* 2015;6:422. Published 2015 Aug 18.
115. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2018;24(7):908-922.
116. Akai S, Uematsu Y, Tsuneyama K, Oda S, Yokoi T. Kupffer cell-mediated exacerbation of methimazole-induced acute liver injury in rats. *J Appl Toxicol.* 2016;36(5):702-715.
117. Seo HY, Kim MK, Lee SH, Hwang JS, Park KG, Jang BK. Kahweol Ameliorates the Liver Inflammation through the Inhibition of NF-κB and STAT3 Activation in Primary Kupffer Cells and Primary Hepatocytes. *Nutrients.* 2018;10(7):863. Published 2018 Jul 4.
118. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006;26(10):1175-1186.



119. Ju C, Reilly TP, Bourdi M, et al. Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem Res Toxicol.* 2002;15(12):1504-1513.
120. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol.* 2009;51(1):212-223.
121. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology.* 2010;139(1):323-34.e7.
122. Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS One.* 2014;9(9):e107265. Published 2014 Sep 12.
123. Schuppan D, Surabattula R, Wang XY. Determinants of fibrosis progression and regression in NASH. *J Hepatol.* 2018;68(2):238-250.
124. Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014;59(1):130-142.
125. Han YH, Kim HJ, Na H, et al. ROR α Induces KLF4-Mediated M2 Polarization in the Liver Macrophages that Protect against Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Rep.* 2017;20(1):124-135.
126. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int.* 2006;26(8):912-919.
127. Nijhuis J, Rensen SS, Slaats Y, van Dielen FM, Buurman WA, Greve JW. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17(11):2014-2018.
128. Yuan Z, Hasnat M, Liang P, et al. The role of inflammasome activation in Triptolide-induced acute liver toxicity. *Int Immunopharmacol.* 2019;75:105754.
129. Fu Q, Huang X, Shu B, et al. Inhibition of mitochondrial respiratory chain is involved in triptolide-induced liver injury. *Fitoterapia.* 2011;82(8):1241-1248.
130. Lawson JA, Farhood A, Hopper RD, Bajt ML, Jaeschke H. The hepatic inflammatory response after acetaminophen overdose: role of neutrophils. *Toxicol Sci.* 2000;54(2):509-516.
131. Rensen SS, Slaats Y, Nijhuis J, et al. Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2009;175(4):1473-1482.
132. Pulli B, Ali M, Iwamoto Y, et al. Myeloperoxidase-Hepatocyte-Stellate Cell Cross Talk Promotes Hepatocyte Injury and Fibrosis in Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis. *Antioxid Redox Signal.* 2015;23(16):1255-1269.
133. Plitas G, Burt BM, Stableford JA, Nguyen HM, Welles AP, DeMatteo RP. Dendritic cells are required for effective cross-presentation in the murine liver. *Hepatology.* 2008;47(4):1343-1351.
134. Rahman AH, Aloman C. Dendritic cells and liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):998-1004.
135. Grove JI, Aithal GP. Human leukocyte antigen genetic risk factors of drug-induced liver toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015;11(3):395-409.
136. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):2154-2163.
137. Henning JR, Graffeo CS, Rehman A, et al. Dendritic cells limit fibroinflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2013;58(2):589-602.
138. Björnsson E, Kalaitzakis E, Olsson R. The impact of eosinophilia and hepatic necrosis on prognosis in patients with drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25(12):1411-1421.
139. Proctor WR, Chakraborty M, Chea LS, et al. Eosinophils mediate the pathogenesis of halothane-induced liver injury in mice. *Hepatology.* 2013;57(5):2026-2036.
140. Bahjat KS, Prell RA, Allen HE, et al. Activation of immature hepatic NK cells as immunotherapy for liver metastatic disease. *J Immunol.* 2007;179(11):7376-7384.
141. Prager I, Liesche C, van Ooijen H, et al. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *J Exp Med.* 2019;216(9):2113-2127.
142. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:413-441.
143. Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology.* 2004;127(6):1760-1774.



144. Ishida Y, Kondo T, Ohshima T, Fujiwara H, Iwakura Y, Mukaida N. A pivotal involvement of IFN-gamma in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J*. 2002;16(10):1227-1236.
145. Fasbender F, Obholzer M, Metzler S, Stöber R, Hengstler JG, Watzl C. Enhanced activation of human NK cells by drug-exposed hepatocytes. *Arch Toxicol*. 2020;94(2):439-448.
146. Csak T, Dolganiuc A, Kodys K, et al. Mitochondrial antiviral signaling protein defect links impaired antiviral response and liver injury in steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2011;53(6):1917-1931.
147. Kahraman A, Schlattjan M, Kocabayoglu P, et al. Major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MIC A/B): a novel role in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2010;51(1):92-102.
148. Wensveen FM, Jelenčić V, Valentić S, et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol*. 2015;16(4):376-385.
149. Cepero-Donates Y, Lacraz G, Ghobadi F, et al. Interleukin-15-mediated inflammation promotes non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine*. 2016;82:102-111.
150. Ronchi F, Falcone M. Immune regulation by invariant NKT cells in autoimmunity. *Front Biosci*. 2008;13:4827-4837. Published 2008 May 1.
151. Bhattacharjee J, Kirby M, Softic S, et al. Hepatic Natural Killer T-cell and CD8+ T-cell Signatures in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology Commun*. 2017;1(4):299-310.
152. Syn WK, Choi SS, Liaskou E, et al. Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;53(1):106-115.
153. Miyakawa R, Ichida T, Yamagiwa S, et al. Hepatic natural killer and natural killer T cells markedly decreased in two cases of drug-induced fulminant hepatic failure rescued by living donor liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20(7):1126-1130.
154. Wang XZ, Xue RF, Zhang SY, Zheng YT, Zhang LY, Jiang ZZ. Activation of natural killer T cells contributes to triptolide-induced liver injury in mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(12):1847-1854.
155. Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, Sugiyama T. Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21(6):673-680.
156. Feng D. The alteration of immune cells in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Res*. 2020;4(1):23-7
157. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(4):195-203.
158. Parker GA, Picut CA. Liver immunobiology. *Toxicol Pathol*. 2005;33(1):52-62.
159. Daly AK, Day CP. Genetic association studies in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev*. 2012;44(1):116-126.
160. Metushi IG, Sanders C; Acute Liver Study Group, Lee WM, Uetrecht J. Detection of anti-isoniazid and anti-cytochrome P450 antibodies in patients with isoniazid-induced liver failure. *Hepatology*. 2014;59(3):1084-1093.
161. Wälti M, Neftel K, Cohen M, de Weck AL, Perišić M. Nachweis von arzneimittel-spezifischen IgE- und IgG-Antikörpern mittels RIA: klinische Bedeutung am Beispiel Nomifensin (Alival) [Demonstration of drug-specific IgE and IgG antibodies using RIA: clinical importance as shown with nomifensin (Alival)]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1983;113(49):1865-1867..
162. Martin-Murphy BV, Kominsky DJ, Orlicky DJ, Donohue TM Jr, Ju C. Increased susceptibility of natural killer T-cell-deficient mice to acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology*. 2013;57(4):1575-1584.
163. Zhang F, Jiang WW, Li X, et al. Role of intrahepatic B cells in non-alcoholic fatty liver disease by secreting pro-inflammatory cytokines and regulating intrahepatic T cells. *J Dig Dis*. 2016;17(7):464-474.
164. Foureau DM, Walling TL, Maddukuri V, et al. Comparative analysis of portal hepatic infiltrating leucocytes in acute drug-induced liver injury, idiopathic autoimmune and viral hepatitis. *Clin Exp Immunol*. 2015;180(1):40-51.
165. Amante MF, Filippini AV, Cejas N, Lendoire J, Imventarza O, Parisi C. Dress syndrome and fulminant hepatic failure induced by lamotrigine. *Ann Hepatol*. 2009;8(1):75-77.
166. Mennicke M, Zawodniak A, Keller M, et al. Fulminant liver failure after vancomycin in a sulfasalazine-induced DRESS syndrome: fatal recurrence after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2009;9(9):2197-2202.



167. Jongsma MLM, Guarda G, Spaapen RM. The regulatory network behind MHC class I expression. *Mol Immunol*. 2019;113:16-21. doi:10.1016/j.molimm.2017.12.005.
168. Ma C, Kesarwala A, McVicar D, Weber A, Heikenwaelder M, Greten T. Abstract A132: Nonalcoholic fatty liver disease causes selective CD4+ lymphocytes loss and promotes hepatocarcinogenesis. AACR; 2016.
169. Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology*. 2005;41(4):722-730.
170. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2005;41(4):771-778.
171. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)/CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004;40(5):1062-1071.
172. Wang X, Sun L, Zhang L, Jiang Z. Effect of Adoptive Transfer or Depletion of Regulatory T Cells on Triptolide-induced Liver Injury. *Front Pharmacol*. 2016;7:99. Published 2016 Apr 22.
173. Wang X, Sun R, Chen Y, Lian ZX, Wei H, Tian Z. Regulatory T cells ameliorate acetaminophen-induced immune-mediated liver injury. *Int Immunopharmacol*. 2015;25(2):293-301.
174. Söderberg C, Marmur J, Eckes K, et al. Microvesicular fat, inter cellular adhesion molecule-1 and regulatory T-lymphocytes are of importance for the inflammatory process in livers with non-alcoholic steatohepatitis. *APMIS*. 2011;119(7):412-420.
175. Speletas M, Argentou N, Germanidis G, et al. Foxp3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:827565.
176. Ma X, Hua J, Mohamood AR, Hamad AR, Ravi R, Li Z. A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology*. 2007;46(5):1519-1529.
177. Zhao L, Qiu DK, Ma X. Th17 cells: the emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver. *J Dig Dis*. 2010;11(3):126-133.
178. Ye C, Li WY, Zheng MH, Chen YP. T-helper 17 cell: a distinctive cell in liver diseases. *Hepatol Res* 2011;41:22-29
179. Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:345803.
180. Tang Y, Bian Z, Zhao L, et al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Immunol*. 2011;166(2):281-290.
181. López-Cabrera M, Santis AG, Fernández-Ruiz E, et al. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med*. 1993;178(2):537-547.
182. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology*. 1999;97(1):159-165.
183. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods*. 2004;293(1-2):127-142.
184. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007;26(3):371-381.
185. Andrade RJ, Lucena MI, Alonso A, et al. HLA class II genotype influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease. *Hepatology*. 2004;39(6):1603-1612.
186. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285(5428):727-729.
187. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-97.e10.
188. López S, García-Serrano S, Gutierrez-Repiso C, et al. Tissue-Specific Phenotype and Activation of iNKT Cells in Morbidly Obese Subjects: Interaction with Adipocytes and Effect of Bariatric Surgery. *Obes Surg*. 2018;28(9):2774-2782.
189. Kaswala DH, Lai M, Afdhal NH. Fibrosis Assessment in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in 2016. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1356-1364.



190. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:33. Published 2006 Nov 2.
191. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007;45(4):846-854.
192. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology.* 2006;43(6):1317-1325.
193. Bourliere M, Penaranda G, Renou C, et al. Validation and comparison of indexes for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients: proposal for a pragmatic approach classification without liver biopsies. *J Viral Hepat.* 2006;13(10):659-670.
194. Bonkovsky HL, Severson T, Nicoletti P, et al. Genetic Polymorphisms Implicated in Nonalcoholic Liver Disease or Selected Other Disorders Have No Influence on Drug-Induced Liver Injury. *Hepatol Commun.* 2019;3(8):1032-1035.
195. Kumar V. NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease. *J Hepatol.* 2013;59(3):618-620.
196. Stephens C, Lucena MI, Andrade RJ. Genetic risk factors in the development of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2021;17(2):153-169.
197. Cueto-Sanchez A, Niu H, Del Campo-Herrera E, et al. Lymphocyte Profile and Immune Checkpoint Expression in Drug-Induced Liver Injury: An Immunophenotyping Study. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;110(6):1604-1612
198. Jee A, Sernoskie SC, Uetrecht J. Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury: Mechanistic and Clinical Challenges. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):2954
199. Mak A, Uetrecht J. The Role of CD8 T Cells in Amodiaquine-Induced Liver Injury in PD1-/- Mice Cotreated with Anti-CTLA-4. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(8):1567-1573.
200. Wang H, Li L, Li Y, et al. Intravital imaging of interactions between iNKT and kupffer cells to clear free lipids during steatohepatitis. *Theranostics.* 2021;11(5):2149-2169.
201. Zou M, Nong C, Yu Z, et al. The role of invariant natural killer T cells and associated immunoregulatory factors in triptolide-induced cholestatic liver injury. *Food Chem Toxicol.* 2020;146:111777.
202. Bovens AA, Wesselink TH, Behr FM, et al. Murine iNKT cells are depleted by liver damage via activation of P2RX7. *Eur J Immunol.* 2020;50(10):1515-1524.
203. Singh AK, Tripathi P, Cardell SL. Type II NKT Cells: An Elusive Population With Immunoregulatory Properties. *Front Immunol.* 2018;9:1969.
204. Sutti S, Jindal A, Locatelli I, et al. Adaptive immune responses triggered by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in NASH. *Hepatology.* 2014;59(3):886-897.
205. Stephens C, Robles-Diaz M, Medina-Caliz I, et al. Comprehensive analysis and insights gained from long-term experience of the Spanish DILI Registry. *J Hepatol.* 2021;75(1):86-97.
206. Huang W, He W, Shi X, He X, Dou L, Gao Y. The Role of CD1d and MR1 Restricted T Cells in the Liver. *Front Immunol.* 2018;9:2424.
207. De Munck TJI, Xu P, Verwijs HJA, et al. Intestinal permeability in human nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* 2020;40(12):2906-2916.
208. Bessone F, Dirchwolf M, Rodil MA, Razori MV, Roma MG. Review article: drug-induced liver injury in the context of nonalcoholic fatty liver disease - a physiopathological and clinical integrated view. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;48(9):892-913.
209. Stiglund N, Strand K, Cornillet M, et al. Retained NK Cell Phenotype and Functionality in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Immunol.* 2019;10:1255.
210. Hansen CH, Holm TL, Krych Ł, et al. Gut microbiota regulates NKG2D ligand expression on intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol.* 2013;43(2):447-457.
211. Murri M, García-Fuentes E, García-Almeida JM, et al. Changes in oxidative stress and insulin resistance in morbidly obese patients after bariatric surgery. *Obes Surg.* 2010;20(3):363-368.





Article

Differential iNKT and T Cells Activation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Drug-Induced Liver Injury

Estefanía Caballano-Infantes ^{1,†} , Alberto García-García ^{2,†} , Carlos Lopez-Gomez ^{2,3,†} , Alejandro Cueto ^{1,3}, Mercedes Robles-Diaz ^{2,3,4}, Aida Ortega-Alonso ^{2,3}, Flores Martín-Reyes ^{2,3} , Ismael Alvarez-Alvarez ^{2,3,4} , Isabel Arranz-Salas ^{3,5}, Francisco Ruiz-Cabello ^{6,7} , Isabel M. Lucena ^{1,3,4,8,*} , Eduardo García-Fuentes ^{2,3,4,*} , Raúl J. Andrade ^{2,3,4,‡} and Miren García-Cortes ^{2,3,4,‡}

- ¹ Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain; estcabinf@gmail.com (E.C.-I.); acuetos@outlook.es (A.C.)
 - ² UGC de Aparato Digestivo, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain; albergarcias@gmail.com (A.G.-G.); carlos.lopez@ibima.eu (C.L.-G.); mrobles@uma.es (M.R.-D.); aida_ortega_alonso@hotmail.com (A.O.-A.); floresmarey@hotmail.com (F.M.-R.); iaalvarez@uma.es (I.A.-A.); andrade@uma.es (R.J.A.); mirengar1@hotmail.com (M.G.-C.)
 - ³ Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, 29010 Málaga, Spain; isabellanz@yahoo.es
 - ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), 29010 Málaga, Spain
 - ⁵ UGC de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, 29010 Málaga, Spain
 - ⁶ Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, UGC de Laboratorio Clínico, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II/Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18014 Granada, Spain; fruizc@ugr.es
 - ⁷ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs, 18014 Granada, Spain
 - ⁸ UICEC IBIMA, Plataforma SCReN (Spanish Clinical Research Network), Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain
- * Correspondence: lucena@uma.es (I.M.L.); eduardo.garcia@ibima.eu (E.G.-F.); Tel.: +34-951-290-346 (E.G.-F.)
- † These authors contributed equally to this work.
- ‡ These authors contributed equally to this work.



Citation: Caballano-Infantes, E.; García-García, A.; Lopez-Gomez, C.; Cueto, A.; Robles-Diaz, M.; Ortega-Alonso, A.; Martín-Reyes, F.; Alvarez-Alvarez, I.; Arranz-Salas, I.; Ruiz-Cabello, F.; et al. Differential iNKT and T Cells Activation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Drug-Induced Liver Injury. *Biomedicines* **2022**, *10*, 55. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010055>

Academic Editor: Sanda Win

Received: 1 December 2021

Accepted: 23 December 2021

Published: 28 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and idiosyncratic drug-induced liver injury (DILI) could share molecular mechanisms involving the immune system. We aimed to identify activation immunological biomarkers in invariant natural killer T (iNKT) and CD4/CD8+ T cells in NAFLD and DILI. Methods: We analyzed the activation profile (CD69, CD25, and HLA-DR) and natural killer group 2 member D (NKG2D) on iNKT cells, and CD4/CD8 T cells in peripheral blood mononuclear cells from NAFLD, with or without significant liver fibrosis, and DILI patients. Results: There was an increase in iNKT cells in NAFLD patients compared to DILI or control subjects. Regarding the cellular activation profile, NAFLD with significant liver fibrosis ($F \geq 2$) displayed higher levels of CD69+iNKT cells compared to NAFLD with none or mild liver fibrosis ($F \leq 1$) and control patients. CD69+iNKT positively correlated with insulin resistance, aspartate aminotransferase (AST) level, liver fibrosis-4 index (FIB4) and AST to Platelet Ratio Index (APRI). DILI patients showed an increase in CD69+ and HLA-DR+ in both CD4+ and CD8+ T cells, detecting the most relevant difference in the case of CD69+CD8+ T cells. Conclusions: CD69+iNKT may be a biomarker to assess liver fibrosis progression in NAFLD. CD69+CD8+ T cells were identified as a potential distinctive biomarker for distinguishing DILI from NAFLD.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); drug-induced liver injury (DILI); immunophenotype; immune response; liver fibrosis

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), recently renamed by some authors as a metabolic-associated fatty liver disease [1], includes a wide spectrum of histological