



## Recientes avances en la hepatotoxicidad de fármacos



María Cascales Angosto  
Coordinadora de la sesión  
Sesión celebrada el 18 de mayo de 2017  
e-mail: cascales1934@gmail.com

### ORDEN DEL DÍA

#### *Introducción:*

---

Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto  
Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

#### *Ponentes:*

---

#### **“Modelos celulares hepáticos avanzados para el estudio preclínico del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos”**

Dra. María José Gómez-Lechón Moliner

Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

#### **“Hepatotoxicidad idiosincrásica por fármacos: promesas y limitaciones de las estrategias *in vitro*”**

Dra. M. Teresa Donato

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València. Unidad Mixta de Investigación en Hepatología Experimental UV-Fundación La Fe, Valencia

#### **“Esteatosis hepática y colestasis inducida por medicamentos: nuevos mecanismos y biomarcadores”**

Dr. Ramiro Jover Atienza

Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València. Unidad Mixta en Hepatología Experimental, IIS Hospital La Fe de Valencia

# Introducción

María Cascales Angosto

---

Durante muchos años la hepatotoxicidad de fármacos y agentes tóxicos, ha sido el centro de mis investigaciones cuando ejercía mi carrera como Investigadora del CSIC y prueba de ello han sido diversas mis intervenciones en esta Academia sobre este tema. Hoy la Doctora Gómez-Lechón y yo hemos querido traer a esta Tribuna los últimos avances y técnicas emergentes que evalúan los mecanismos implicados en la biotransformación de fármacos por el hígado, como etapa temprana para predecir la toxicidad de los nuevos medicamentos.

El organismo identifica a casi todos los medicamentos como xenobióticos y los somete a una serie de procesos para hacerlos más solubles y facilitar su eliminación por vía biliar o plasmática. A pesar de que casi todas las células del organismo poseen esta capacidad, es el retículo endoplásmico del hepatocito, el lugar principal del metabolismo de las sustancias químicas tanto endógenas como exógenas. Esta misión del hígado en la biotransformación de fármacos, hace que sea el órgano más susceptible a ser lesionado.

La lesión funcional o anatómica del hígado inducida por medicamentos es un importante problema de salud pública, de tal manera que es la causa más común de muerte por fallo hepático agudo y representa alrededor del 10 % de ingresos hospitalarios. Existen más de 900 medicamentos reconocidos por su toxicidad que pueden causar insuficiencia hepática acompañada, en casos graves, de encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal y muerte. Esta es una de las causas que conduce a la restricción del uso de los medicamentos y a su eliminación del mercado.

Los ensayos preclínicos deben ser capaces de detectar la toxicidad potencial en las fases tempranas del desarrollo de un nuevo fármaco, con el objeto no solo de aminorar los riesgos de reacciones adversas sino también de evitar las pérdidas financieras que ello conlleva. Sin embargo, los ensayos de toxicidad existentes en la actualidad son a menudo insuficientes como lo demuestra el alto grado de fracaso de fármacos candidatos y medicamentos en curso. Los estudios en animales de laboratorio a menudo fracasan debido a las diferencias existentes en los sistemas de detoxificación entre especies.

Los modelos celulares de origen humano están en la actualidad siendo utilizados para evaluar el potencial hepatotóxico de nuevas moléculas. Aunque no pueden reproducir la toxicidad potencial del órgano completo, su bajo costo y reproducibilidad, las convierte en un buen complemento a las pruebas tradicionales *in vivo*. Esta ampliamente demostrada su disponibilidad para evaluar los procesos celulares y moleculares implicados en la hepatotoxicidad y su capacidad para detectar los potenciales efectos secundarios de las nuevas entidades moleculares antes de que se introduzcan en pruebas clínicas.

## *Vulnerabilidad del hígado a la lesión tóxica*

El hígado es el órgano más susceptible de sufrir lesiones tóxicas, debido a su peculiar metabolismo de los xenobióticos y a su cercanía con el tracto gastrointestinal. Cerca de un 75 % de la sangre que llega al hígado procede directamente del sistema gastrointestinal a través de la vena porta, la cual acarrea los xenobióticos de forma concentrada. La presencia de estos en el hepatocito activa el sistema citocromo P450, por ejemplo el CYP2E1, con generación de radicales libres derivados de la biotransformación del fármaco y del oxígeno. Las lesiones a los hepatocitos y a las células del conducto biliar producen inflamación y acúmulo de bilis en el propio hepatocito. Otras células no pertenecientes al parénquima hepático, como los colangiocitos, las células almacenadoras de grasa o células de Ito, las células de Kupfer y los propios leucocitos ejercen una influencia importante en estos mecanismos tóxicos.

Los eventos moleculares que conducen a la lesión y muerte de las células hepáticas por acción de los fármacos pueden ser debidos a la acción directa de dichos fármacos sobre los sistemas celulares o a la acción de los productos derivados de su biotransformación. En este último caso el efecto tóxico que se desencadena se debe a una alteración del equilibrio entre bioactivación y detoxificación, que es la que determina el grado de agresión hepatocelular del metabolito reactivo derivado. Existen varios procesos que juegan un papel en estos eventos que pueden conducir a un daño celular irreversible por necrosis o apoptosis. A su vez, las reacciones adversas a los medicamentos son de dos tipos; las farmacológicas o intrínsecas y las idiosincráticas. Las primeras reflejan el 80 % de todas las reacciones adversas. Los fármacos que exhiben el efecto intrínseco son aquellos que muestran curvas de dosis-respuesta que se pueden predecir, de modo que a mayor concentración, mayor será el daño hepático, y presentan mecanismos bien caracterizados tales como la agresión directa hepatocelular o el bloqueo de un proceso metabólico. Ejemplo clásico es el acetaminofeno o paracetamol.

Las reacciones idiosincráticas causan hepatotoxicidad inesperada en individuos susceptibles no relacionada con la dosis y con un período de latencia variable. Este tipo de lesión no tiene una curva clara de dosis respuesta ni una relación temporal y en la mayoría de los casos no sigue modelos que se puedan predecir. La hepatotoxicidad idiosincrática ha producido la retirada de muchos medicamentos del mercado, aún después de un riguroso estudio clínico como parte del proceso de su aprobación y patente. Ejemplos clásicos de este fenómeno lo presentan la troglitazona y la trovafloxacin.

### ***Biotransformación de fármacos en hígado***

Este proceso se verifica en dos fases: la fase 1 incluye un conjunto de reacciones catalizadas por el complejo citocromo P 450, que aumentan la solubilidad del agente tóxico generando, a su vez, metabolitos químicamente activos y potencialmente tóxicos. La fase 2 incluye reacciones de conjugación con compuestos endógenos por medio de transferasas. Al final de la fase 2, los productos activos generados en la fase 1 se vuelven relativamente inertes y disponibles para su eliminación del organismo.

El *complejo citocromo P450* comprende un grupo de enzimas localizadas en el retículo endoplasmático del hepatocito, que cuenta con unas 50 isoformas relacionadas entre sí, de las cuales 6 de ellas metabolizan un 90 % de los xenobióticos. Existe una gran diversidad en los genes que codifican los citocromos P450 individuales y esta heterogenicidad le permite al hígado oxidar en una enorme variedad de compuestos químicos, durante la fase 1.

Hay tres elementos en el sistema P450 que juegan un papel importante en la toxicidad inducida por medicamentos.

La diversidad o *polimorfismo genético*, causante de la variabilidad en el metabolismo de fármacos entre un individuo y el otro. Este polimorfismo es de gran importancia frente a la sensibilidad o resistencia a los efectos del medicamento a dosis terapéuticas y es responsable de las respuestas entre una persona y otra en especial cuando se trata de etnias diferentes.

El cambio en actividad enzimática producido por medicamentos que ejercen influencia positiva o negativa sobre la actividad de los sistemas P450. Los fármacos que la modifican se conocen como inhibidores o activadores. Los inhibidores impiden la actividad de una o varias enzimas P450. Los activadores aumentan su actividad porque elevan su expresión genética y aumentan la velocidad de biotransformación de los fármacos con consecuencias terapéuticas importantes. Algunos fármacos pueden compartir especificidad por la misma enzima P450 compitiendo por su biotransformación. Ejemplo el etanol.

*Otros factores* afectan la biotransformación hepática e influyen en su acción terapéutica: edad, sexo, peso corporal, estado nutricional, hepatopatía previa, función renal, embarazo, interacciones medicamentosas, etnia, etc.

#### ***Tipos de lesión hepática producida por fármacos:***

*Necrosis hepatocelular.* Lo más común es encontrar necrosis de las células hepáticas confinadas en las zonas periportal o perovenosa del lóbulo hepático. Se manifiesta con altos niveles sanguíneos de ALT y disfunciones hepáticas severas que con el tiempo conlleva a insuficiencia hepática aguda. Las causas más frecuentes son las intoxicaciones por acetaminofeno y el tetracloruro de carbono

*Hepatitis.* Es otra forma de necrosis hepatocelular, asociada a infiltración de células inflamatorias. Pueden aparecer tres tipos de hepatitis inducida por fármacos: tipo viral causada por halotano isoniácida y fenitoina; la focal o no-específica, caracterizada por focos esparcidos que

acompañan al infiltrado linfocítico. Un ejemplo de este tipo de lesión es la producida por la aspirina; y la crónica, cuadro clínico, serológico e histológico similar a la hepatitis autoinmune. Actúan de este modo las intoxicaciones por metildopa y diclofenac.

*Colestasis.* El daño hepático produce un trastorno en el flujo biliar, en el que predomina la ictericia. Se puede detectar inflamación (hepatitis colestásica) o sin inflamación (parenquimatosa). Producen colestasis la píldora anticonceptiva, anabolizantes androgénicos esteroides y andrógenos. La inflamatoria está producida por: alopurinol, carbamazepina, clorpromazina, flucloxacilina, etc

*Esteatosis.* La hepatotoxicidad puede manifestarse por acumulo de triglicéridos lo que conlleva al hígado graso micro o macrovesicular. Otro tipo de esteatosis se produce por acumulación de fosfolípidos y produce un patrón similar a las enfermedades con defectos congénitos del metabolismo lipídico. Causas: aspirina, cetoprofen, tetraciclina, acetaminofeno, metotrexato, amiodarona y nutrición parenteral absoluta, entre otros.

En resumen, el daño hepático inducido por fármacos supone hoy un importante problema de salud pública y una de las causas principales de disfunción hepática y muerte por fallo hepático agudo, que conlleva la retirada del mercado de medicamentos ya autorizados. En las diferentes fases del desarrollo de un nuevo fármaco tiene una extraordinaria relevancia la detección temprana de los posibles efectos hepáticos adversos. Los estudios preclínicos en animales son poco predictivos de la toxicidad en el hombre, por ello se ha potenciado el uso de modelos celulares hepáticos de origen humano para la evaluación de la seguridad de los fármacos. Existe una necesidad urgente de conseguir biomarcadores eficientes para la evaluación del riesgo de los pacientes a quienes van dirigidos esos medicamentos. En la actualidad las investigaciones están dirigidas a profundizar en los problemas clínicos con el fin de desarrollar estrategias diagnósticas con modelos celulares complejos capaces de mimetizar el comportamiento del hígado humano y utilizar tecnologías analíticas avanzadas para el estudio de las bases moleculares del metabolismo y la hepatotoxicidad de una molécula candidata a ser registrada como un nuevo medicamento.

\*\*\*\*\*

En la Sesión Científica que presentamos hoy actúan como ponentes tres investigadores de talla internacional, la Académica María José Gómez-Lechón Moliner y dos miembros de su grupo, los doctores María Teresa Donato Martín y Ricardo Jover Atienza. La Doctora Gómez-Lechón es conocida por todos nosotros por su intervención en las actividades de esta casa en diversas ocasiones, que se plasmaron en dos Monografías: Citocromo P-450 y las Ómicas.

La línea de investigación del grupo dirigido por la Doctora Gómez-Lechón se encuentra integrada en un equipo multidisciplinar con participación de los clínicos del hospital La Fe de Valencia. Concentra los mecanismos

de hepatotoxicidad de fármacos así como la hepatotoxicidad idiosincrática. Han desarrollado estudios multiparamétricos basados en análisis de imagen, metabolómica y transcrición y están tratando de hacer una investigación cada vez más traslacional. La terapia celular hepática, tiene en marcha el primer programa de trasplante de hepatocitos en España en pacientes pediátricos con metabolopatías congénitas y en adultos con fallo hepático agudo. También están empezando a generar células iPS como terapia personalizada y líneas de células pluripotentes derivadas de células embrionarias.

A continuación voy a hacer una brevísima presentación de los tres conferenciantes

**María José Gómez Lechón** es doctora en Biología. Investigadora Principal de la Unidad de Hepatología Experimental del Hospital Universitario La Fe. Sus investigaciones sobre el metabolismo de fármacos y mecanismos moleculares de hepatotoxicidad se han enfocado en el desarrollo de modelos *in vitro* con expresión de los citocromos P 450 y su capacidad en la biotransformación de xenobióticos. Su actividad se ha dirigido al desarrollo de modelos celulares que mimeticen el comportamiento del hígado humano para estudios preclínicos del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos.

**María Teresa Donato Martín** es Doctora en Farmacia y Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Valencia. Investigadora de la Unidad de Hepatología Experimental del Hospital Universitario La Fe y Profesora contratada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

Posee amplia experiencia en el estudio de la actividad catalítica del citocromo P 450 y en desarrollo de modelos hepáticos para la evaluación *in vitro* del metabolismo de fármacos en humanos. Hoy nos va a hablar de la Hepatotoxicidad idiosincrática por fármacos.

**Ramiro Jover Atienza** es Doctor en Biología por la Universidad de Valencia, Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia. Ha realizado sus estudios postdoctorales en el Biozentrum de la Universidad de Basilea y sus publicaciones se integran en el área del metabolismo de fármacos y la regulación de la expresión de genes hepáticos. Su actividad más reciente se ha dirigido al estudio de los mecanismos de hepatotoxicidad que causan esteatosis y colestasis; así como a la búsqueda de biomarcadores predictivos. También ha investigado nuevas vías patogénicas en la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

Por urgencia del tiempo, no voy a extenderme en las importantes y numerosas publicaciones de estos tres expertos en hepatología. Todos los que me escuchan tienen acceso a ellas en el índice que recoge la red de publicaciones médicas del NIH.

Para terminar, tengo que agradecer a la Real Academia Nacional de Farmacia, a la Fundación José Casares Gil, así como al personal administrativo de esta casa, por toda

suerte de facilidades prestadas en la realización y organización de esta tarea. Mi profunda gratitud a los ponentes por su generosidad al haber aceptado tomar parte en esta Sesión Científica dedicada a un tema de extraordinaria importancia e indiscutible trascendencia farmacológica y de aplicación terapéutica, que es la biotransformación de fármacos en hígado.

# Modelos celulares hepáticos avanzados para el estudio preclínico del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos

**Title in English:** *Advanced hepatic cellular models for the preclinical study of drug metabolism and hepatotoxicity*

María José Gómez-Lechón Moliner

Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Avenida Fernando Abril Martorel 106, 46026-Valencia.

**ABSTRACT:** Drug-induced liver injury is a significant leading cause of liver disease and post-market attrition of approved drugs. Hepatotoxicity is poorly predicted by preclinical animal studies, which can be explained by differences in drug metabolism between human and experimental species. Thus, several hepatic cell-based models have been used for early safety risk assessment during drug development. Cultured hepatocytes have contributed to increase knowledge of the metabolic patterns and mechanisms involved in drug toxicity. The sandwich culture model promotes polarized cell surface and stabilizes hepatocyte functionality, particularly transport systems, better than monolayer cultures. In addition to hepatocytes, other cell-based models have been proposed for hepatotoxicity studies. Hepatoma cell lines are metabolically poor compared to hepatocytes, but offer key advantages which make them useful for screening purposes. Alternatively, hepatic cell lines engineered for stable or transient expression of key drug-metabolizing enzymes have also been used. Finally, hepatocytes derived from both embryonic (ES) and induced (iPS) pluripotent stem cells are emerging cell models that will provide a stable and unlimited source of hepatocytes. As 3D spatial organization and complex heterotypic cell interactions are essential for the functional homeostasis of the liver, hepatocyte models (3D cultures, co-cultures with NPCs and microfluidic devices) that mimic cell-cell, cell-matrix interactions and nutrient flow characteristic of the liver microenvironment have been shown to improve the metabolic competency of hepatocytes and seem highly promising for preclinical toxicological studies of drugs.

**RESUMEN:** El daño hepático causado por fármacos es una de las causas principales de disfunción hepática, de muerte por fallo hepático agudo y de retirada del mercado de fármacos ya autorizados. Los estudios preclínicos en animales con frecuencia son poco predictivos de la hepatotoxicidad en el hombre, debido a las diferencias del metabolismo hepático entre especies. Por ello, se ha potenciado el uso de modelos celulares hepáticos de origen humano para la evaluación temprana de la seguridad de los fármacos durante el desarrollo. Los estudios con hepatocitos cultivados han contribuido al conocimiento de los mecanismos implicados en la toxicidad por fármacos. Los hepatocitos cultivados en doble capa de colágeno mantienen la polaridad y los sistemas de transporte, así como una estabilización funcional más prolongada. Otras células hepáticas han sido propuestas como alternativa a los hepatocitos para evaluar la hepatotoxicidad. Si bien las líneas celulares de hepatomas humanos tienen menor capacidad metabólica que los hepatocitos, presentan ventajas clave para el cribado de fármacos. Las células manipuladas genéticamente con expresión estable o transitoria de enzimas de biotransformación son muy útiles para estudios de metabolismo y toxicidad. Por último, los hepatocitos derivados de células madre pluripotentes tanto embrionarias (ES) como inducidas (iPS) son modelos celulares emergentes que proporcionarán una fuente estable e ilimitada de hepatocitos. La organización espacial tridimensional (3D) y las interacciones celulares heterotípicas son esenciales para la homeostasis funcional del hígado. Por ello, los modelos hepáticos (cultivos 3D, co-cultivos con CNPs y dispositivos microfluídicos) que reproducen las interacciones célula-célula, célula-biomatriz y el microflujo de nutrientes y oxígeno característicos del microentorno hepático mejoran la competencia metabólica de los hepatocitos y son muy prometedores para los estudios preclínicos de la hepatotoxicidad de fármacos.

**Corresponding Author:** gomez\_mjo@gva.es

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 2 (2017), pp. 255-267

## 1. INTRODUCCIÓN

El hecho de que el hígado sea el órgano más activo en el metabolismo de los fármacos lo convierte en una diana muy vulnerable. De hecho, la hepatitis tóxica constituye el 14 % de los casos de lesión hepática que ingresan en un hospital y son una de las causas principales de fallo hepático agudo requiriendo con frecuencia un trasplante

hepático (1,2). Además, la hepatotoxicidad supone la causa principal de la interrupción del desarrollo preclínico y clínico de nuevos medicamentos, así como de la retirada del mercado o de restricción de las indicaciones de fármacos ya aprobados (3). Si bien no existen datos concluyentes sobre la incidencia de la hepatotoxicidad, parece que tiende a aumentar coincidiendo con el número

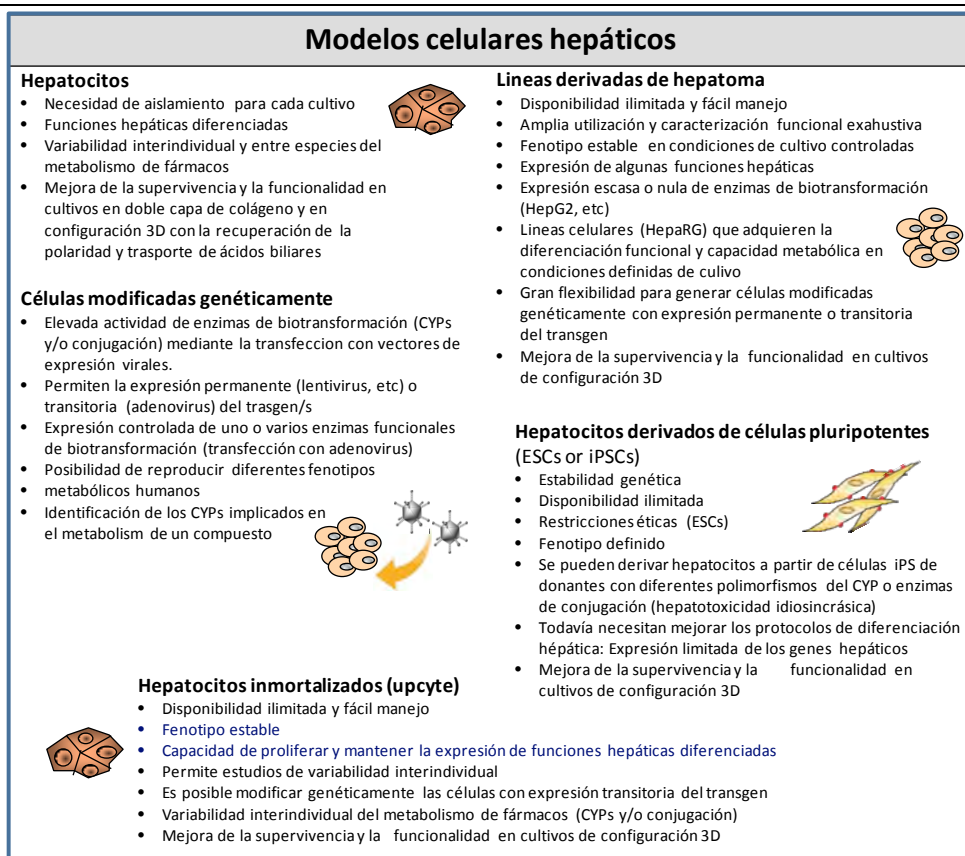
de fármacos comercializados y la situación se hace mucho más compleja con la polimedición y el acceso no controlado a medicamentos y a otros compuestos. Debido a la dificultad de establecer un diagnóstico inequívoco, ya que no existen marcadores específicos que permitan discriminar la hepatotoxicidad de otras hepatopatías, la identificación de la naturaleza y el agente causal de la hepatotoxicidad es un reto clínico cada vez más relevante.

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo y costoso cuyo objeto es investigar si reúne los requisitos de eficacia terapéutica y seguridad exigidos para su administración al ser humano. El proceso completo incluye varias etapas, desde la identificación de la diana terapéutica y los estudios preclínicos hasta los ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, solo el 10 % de los fármacos que llegan a las fases de ensayo clínico mostrando eficacia y seguridad, se comercializan (3). Por ello, la detección temprana de los posibles efectos adversos durante el desarrollo de un nuevo fármaco, así como conocer los mecanismos implicados constituye un reto para la industria farmacéutica con gran relevancia tanto a nivel clínico como económico. Los estudios preclínicos de evaluación del riesgo tóxico se realizan habitualmente en animales de experimentación pero con frecuencia los resultados no son siempre extrapolables al hombre, produciendo falsos negativos y positivos. Ello es debido a las grandes diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en el metabolismo de fármacos entre el hombre y los animales (4,5). Dichas diferencias explican por qué pueden existir moléculas que, no habiendo sido tóxicas para los animales durante los estudios preclínicos, resultan serlo para el hombre al llegar a las fases clínicas del desarrollo. Todo ello indica que los estudios preclínicos convencionales no son siempre capaces de predecir los efectos adversos de un nuevo compuesto para

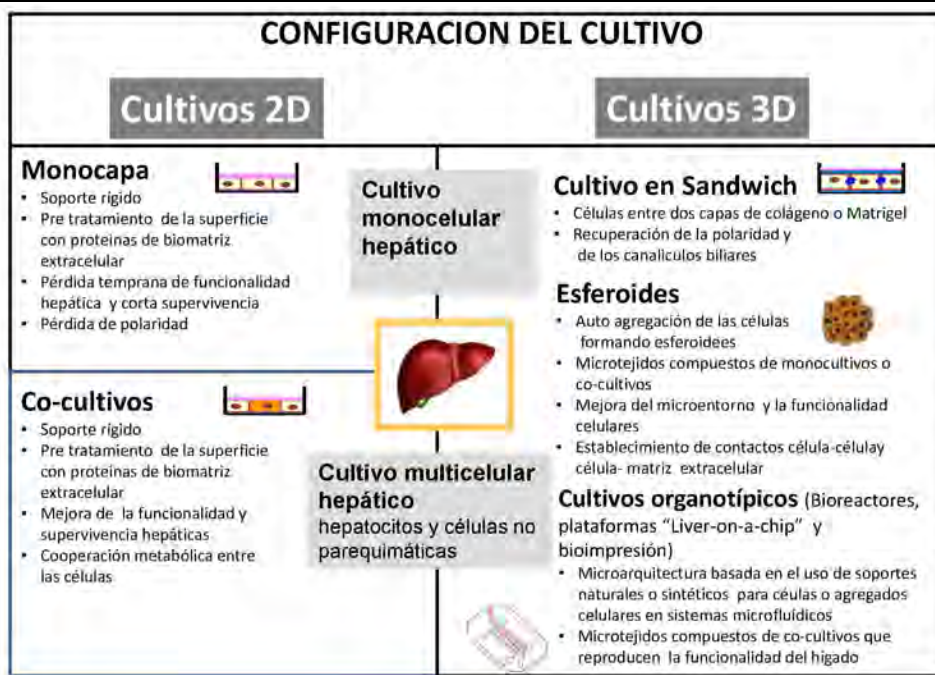
el hombre. En las últimas décadas, la baja correlación entre los datos experimentales en animales y humanos y los cambios legislativos en la UE han convertido los modelos celulares hepáticos humanos en una alternativa indispensable a la experimentación animal para una evaluación temprana de la seguridad de fármacos (12-15). Su utilización contribuye sin lugar a dudas a mejorar el diseño de los estudios, a aumentar la seguridad en la futura administración clínica del fármaco, y son de gran ayuda para la toma de decisiones estratégicas con gran ahorro en tiempo y costo económico.

En este manuscrito se presentan diferentes modelos celulares hepáticos de origen humano desarrollados en los últimos años para predecir el metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos en el hombre en fases muy tempranas de su desarrollo. Los hepatocitos humanos son el modelo más próximo al hígado humano, pero su limitada disponibilidad y la pérdida temprana del fenotipo hepático ha potenciado el uso de modelos hepáticos alternativos, tales como las líneas celulares derivadas de hepatoma humano, células modificadas genéticamente que expresan enzimas de biotransformación y los hepatocitos derivados de células pluripotentes (**Figura 1**). La organización espacial tridimensional (3D) (interacciones celulares y con la matriz extracelular y microflujo de nutrientes) y la heterocelularidad (co-cultivos) de los modelos hepáticos emergentes, permite recrear la estructura y homeostasis funcional del hígado mostrando una mayor capacidad metabólica y funcional, así como más prolongada supervivencia *in vitro* para estudios preclínicos de la hepatotoxicidad de nuevos fármacos (6-9) (**Figura 2**).





**Figura 1. Diferentes modelos celulares hepáticos para estudios de hepatotoxicidad.** Distintos modelos celulares hepáticos desarrollados en los últimos años para estudiar el metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos en el hombre en fases muy tempranas de su desarrollo. Los modelos incluyen desde líneas celulares hepáticas, células hepáticas modificadas genéticamente que expresan enzimas de biotransformación, cultivos de hepatocitos y los modelos emergentes de hepatocitos derivados de células pluripotentes.



**Figura 2. Configuración de los cultivos de células hepáticas: Modelos 2D y 3D.** En los últimos años se han desarrollado nuevos modelos capaces de reproducir la heterocelularidad del hígado, la organización espacial tridimensional, la micro-arquitectura y la circulación de fluidos esenciales para la homeostasis funcional del hígado.

## 2. HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR FÁRMACOS

La mayor parte de las sustancias que pueden actuar como hepatotoxinas lo son por razones intrínsecas, dosis-dependientes y fácilmente identificables, y su toxicidad es reproducible en animales (p.ej. paracetamol). Sin embargo, hay un significativo número de fármacos cuya hepatotoxicidad es idiosincrática, es decir ocurre de modo impredecible en un número reducido de individuos susceptibles, sin relación directa con la dosis administrada, con un período de latencia variable y no es reproducible en animales de experimentación. Por ello, no son detectadas casi nunca durante el desarrollo (p.ej. diclofenac, perhexilina). Su aparición obedece a la interacción de un conjunto de circunstancias relacionadas con factores genéticos o de otra índole asociados al individuo (polimorfismos genéticos, edad, sexo, etnia, patologías hepáticas, alcoholismo, estado nutricional, hepatopatía previa, embarazo, co-administración de otros fármacos, etc.). La hepatotoxicidad idiosincrática puede tener un origen inmunoalérgico, metabólico o inflamatorio. En ocasiones, algunos metabolitos reactivos forman aductos con proteínas celulares que pueden ser capaces de actuar como haptenos (p. ej. diclofenac, halotano, ácido tienílico) desencadenando una respuesta inmune adaptativa que finalmente produce daño hepático (10). Los polimorfismos genéticos del complejo enzimático citocromo P450 (CYP) y enzimas de conjugación de los fármacos, son la causa de la variabilidad individual en el metabolismo de los medicamentos que puede favorecer o producir reacciones de hepatotoxicidad (11). De hecho la variabilidad genética es el factor de riesgo más importante en la hepatotoxicidad idiosincrática de naturaleza metabólica, muy particularmente cuando se producen metabolitos reactivos. Por otra parte se propone la hipótesis del estrés inflamatorio, en donde las citocinas proinflamatorias liberadas tras un episodio inflamatorio actúan modulando la susceptibilidad de un individuo a ciertos fármacos y sus metabolitos precipitando reacciones hepatotóxicas (p. ej. isoniazida) (12). La hepatotoxicidad idiosincrática por su gravedad e imprevisibilidad tiene un notable interés y relevancia clínica ya que la prevalencia de las reacciones adversas hepáticas idiosincráticas se estima entre 1/10000 a 1/100000 exposiciones para la mayoría de los fármacos. En ella contribuyen diversos factores que pueden estar relacionados bien con el fármaco y su metabolismo o bien con el propio individuo. Por ello, ningún modelo animal disponible en la actualidad es capaz de reproducir los múltiples factores de susceptibilidad (genéticos y adquiridos) que determinan la hepatotoxicidad idiosincrática en el hombre.

Aunque lo más frecuente es que en el curso del metabolismo de los fármacos se produzcan metabolitos estables y no tóxicos, en algunos casos el fármaco sufre un proceso de bioactivación y se generan metabolitos reactivos que son capaces de inducir el daño hepático mediante diversos mecanismos moleculares (p.ej. troglitazona, diclofenac, flutamida) (13,14). La

bioactivación es un factor clave para la hepatotoxicidad idiosincrática de los fármacos que, aunque poco común, suele ser más severa que la intrínseca. Las interacciones entre fármacos pueden predisponer a la hepatotoxicidad, tanto por inducción de determinados isoenzimas del CYP al elevar su expresión génica, aumentando así la tasa de producción de metabolitos reactivos, como por inhibición de uno a varios CYPs. Por tanto estas interacciones pueden afectar la biotransformación hepática y como consecuencia disminuir o aumentar la acción terapéutica de un medicamento o causar efectos secundarios indeseados. Diversos mecanismos moleculares pueden estar implicados en la hepatotoxicidad inducida por el fármaco o sus metabolitos que producen un amplio abanico de manifestaciones bioquímicas a nivel celular y síntomas clínicos que abarcan desde elevaciones clínicamente asintomáticas y transitorias de niveles séricos de enzimas hepáticas, hasta la disfunción hepática o el fallo hepático agudo (10, 15).

## 3. MODELOS CELULARES DE HEPATOCITOS EN CONFIGURACIÓN 2D

### 3.1. Cultivo de hepatocitos en monocapa

Los hepatocitos humanos son, sin lugar a dudas, el modelo más próximo al hígado humano. Durante décadas se han considerado el modelo *patrón oro* para estudios del metabolismo y toxicidad *in vitro*, y el modelo ideal para investigar las diferencias interindividuales en el metabolismo de los fármacos (6,15,16-18). Los cultivos en monocapa son aquellos en los que los hepatocitos se siembran sobre un soporte rígido, generalmente plástico, recubierto de proteínas de la matriz extracelular (MEC) (colágeno, fibronectina o Matrigel) (8), sobre el que adquieren una morfología aplanada que altera la conformación del citoesqueleto. Los hepatocitos humanos cultivados en monocapa muestran funciones hepáticas clave: metabolismo de carbohidratos (síntesis, degradación y acumulación de glucógeno, gluconeogenesis, glicolisis), ureogenesis, síntesis y secreción de proteínas plasmáticas, metabolismo lipídico, síntesis de ácidos biliares y biotransformación de xenobióticos (CYP y enzimas de conjugación) (8,16-18,20). Desafortunadamente, el acceso a muestras de tejido hepático humano es tan limitado, que hace su uso inaccesible para la evaluación rutinaria de nuevas moléculas. Los hepatocitos cultivados en monocapa poseen limitaciones como son la pérdida temprana de la expresión del fenotipo y funcionalidad hepática, en particular su capacidad para el metabolismo y transporte de fármacos y la falta de polaridad celular. Ello reduce considerablemente la sensibilidad para la detección de la hepatotoxicidad y no permiten reproducir los patrones de tratamiento de fármacos *in vivo*, como son exposiciones por tiempo prolongado en estudios crónicos con dosis repetidas (6-9, 19).

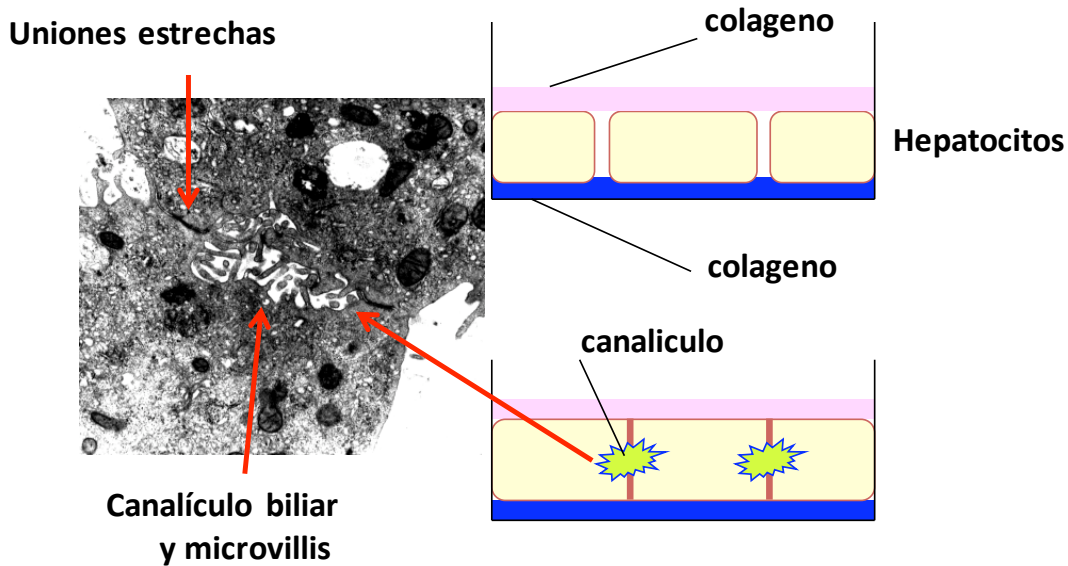
### 3.2. Hepatocitos cultivados en doble capa de colágeno

Este modelo se ha desarrollado con objeto de prolongar el mantenimiento de la funcionalidad hepática y en especial de recuperar la polaridad de los hepatocitos y el



transporte de ácidos biliares. La monocapa de hepatocitos se sitúa entre dos capas de MEC tradicionalmente colágeno o Matrigel (**Figura 3**). En estas condiciones los hepatocitos mantienen por periodos relativamente prolongados funciones hepáticas clave tales como la síntesis y secreción de albumina, la capacidad para el metabolismo y transporte de fármacos, la secreción de urea, la morfología poligonal similar a las células *in vivo*, etc. (8,9, 21). Hay que destacar que la mayor ventaja de este modelo es el mantenimiento de la polarización de la

membrana de los hepatocitos durante varios días de cultivo, con los dominios basolateral (sinusoidal) y apical (canalicular) que realizan respectivamente la captación y excreción de ácidos biliares funcionales, de tal modo que reproducen la secreción biliar *in vivo* (19). A pesar de todo, estudios genómicos y proteómicos indican la inestabilidad de la expresión de genes responsables de la funcionalidad hepática que también disminuye con el tiempo de cultivo (21).



**Figura 3. Hepatocitos cultivados en doble capa de colágeno.** La monocapa de hepatocitos se sitúa entre dos capas de MEC tradicionalmente colágeno o Matrigel. Recuperan la polaridad, la formación de canalículos biliares y el transporte de ácidos biliares.

#### 4. MODELOS CELULARES ALTERNATIVOS A LOS HEPATOCITOS HUMANOS

##### 4.1. Líneas celulares de hepatoma humano

Se han utilizado varias líneas celulares derivadas de tejido hepático humano tumoral (HepG2, Hep3B, Huh7, Fa2N4, HepaRG) para estudios de hepatotoxicidad. Una importante limitación de estas líneas celulares es que muestran, en general, una expresión muy limitada o inexistente de las isoenzimas relevantes para el metabolismo de fármacos en comparación con los hepatocitos y con el hígado humano. Aunque se utilizan ampliamente, su origen tumoral y su pertenencia a un solo genotipo, limita su representación de la amplia variación de la población humana. En cambio, presentan ventajas destacables (estabilidad fenotípica, reproducibilidad, elevada disponibilidad y fácil manejo) en comparación con los hepatocitos humanos que las hace atractivas para cribado de fármacos (22,23). Las líneas celulares más relevantes para estudios de toxicidad son HepG2 y HepaRG (22,23).

La línea de hepatoma humano HepG2 es la más utilizada y quizá por ello la mejor caracterizada funcionalmente. Se dispone de información muy exhaustiva sobre los efectos de un elevado número de compuestos (hepatotoxinas modelo, fármacos, compuestos

químicos) sobre muchos parámetros indicativos de toxicidad celular (viabilidad, integridad de la membrana, proliferación celular, niveles de ATP, estrés oxidativo, potencial de membrana mitocondrial, etc.) utilizando diferentes tecnologías (ensayos convencionales de toxicidad, metabolómica, transcriptómica y análisis de imagen de alto contenido) (24-29). Sin embargo, las predicciones de hepatotoxicidad basadas en estudios con células HepG2 son con frecuencia imprecisas ya que subestiman el efecto de metabolitos reactivos que *in vivo* se producen por bioactivación o sobre-estiman el efecto de fármacos con metabolismo rápido *in vivo*. Se han descrito ciertas mejoras de la funcionalidad de estas células utilizando diferentes tipos de cultivos 3D (microencapsulación, esferoides o sistemas microfluidicos) (15, 30,31).

Las células HepaRG se consideran actualmente el hepatoma humano más prometedor para estudios de hepatotoxicidad *in vitro* (22,23, 26, 32). Son células que en estado proliferativo no expresan el fenotipo hepático pero muestran marcadores de células progenitoras hepáticas bipotentes y son capaces de diferenciarse en condiciones adecuadas a hepatocitos o colangiocitos (33). Cuando, tras varias semanas en cultivo, alcanzan la confluencia, se puede inducir la diferenciación a hepatocitos en presencia

de DMSO mostrando la expresión de enzimas de biotransformación y de transportadores de ácidos biliares, así como la formación de canalículos biliares durante varias semanas ofreciendo la posibilidad de tratamientos prolongados con dosis repetidas (33-35). Se ha observado que el cultivo en diferentes sistemas 3D acelera el proceso de diferenciación a fenotipo hepático de estas células y mejora su capacidad funcional (36)

#### 4.2. Líneas celulares modificadas genéticamente

Una causa frecuente de la hepatotoxicidad inducida por fármacos es la bioactivación y la formación de metabolitos reactivos por los hepatocitos. Es por ello importante la detección de estos compuestos en fases muy tempranas del desarrollo pre-clínico, pero la identificación de moléculas bioactivables requiere el uso de modelos celulares con capacidad para biotransformar los fármacos y generar los metabolitos reactivos. Por tanto una alternativa muy útil para estos estudios es el uso de células manipuladas genéticamente que expresan los enzimas humanos de biotransformación (fundamentalmente los CYPs y de conjugación) con niveles similares al hígado (8,23). Se han utilizado diferentes estrategias para conferir capacidad metabólica a las líneas de hepatoma humano mediante la utilización de vectores de expresión (vaccinia virus, adenovirus, cytomegalovirus y retrovirus) que codifican por CYPs y enzimas de conjugación humanos resultando en la expresión constitutiva y estable o transitoria de los transgenes (8,23).

Existen líneas celulares derivadas de las células epiteliales humanas (THLE) y de las células HepG2 que expresan individualmente cada uno de los isoenzimas del CYP de forma constitutiva (8,23,37). Estos modelos generalmente sobre-expresan el transgen y son muy útiles para identificar el papel de los CYPs individuales en el metabolismo (bioactivación o inactivación) de un fármaco, así como para identificar los CYPs implicadas en la producción de cada uno de los metabolitos (8,23).

Alternativamente, la transducción mediada por adenovirus es un procedimiento simple, versátil y altamente reproducible para administrar eficazmente múltiples genes en células cultivadas y para obtener células que coexpresan los niveles deseados de varias enzimas de biotransformación (CYPs y enzimas de fase II) de fármacos. La estrategia se basa en la transducción de células HepG2 con combinaciones adecuadas de vectores adenovirales recombinantes que codifican estas enzimas para generar una variedad de células “a la carta” que reproducen fenotipos metabólicos de interés para el metabolismo y hepatotoxicidad de fármacos (38-40). Por ejemplo, con el uso combinado de varios adenovirus que codifican CYPs individuales y la información del fenotipo metabolizador de un paciente que haya sufrido un episodio hepatotóxico es posible crear una célula hepática que reproduzca dicho fenotipo y simule la idiosincrasia

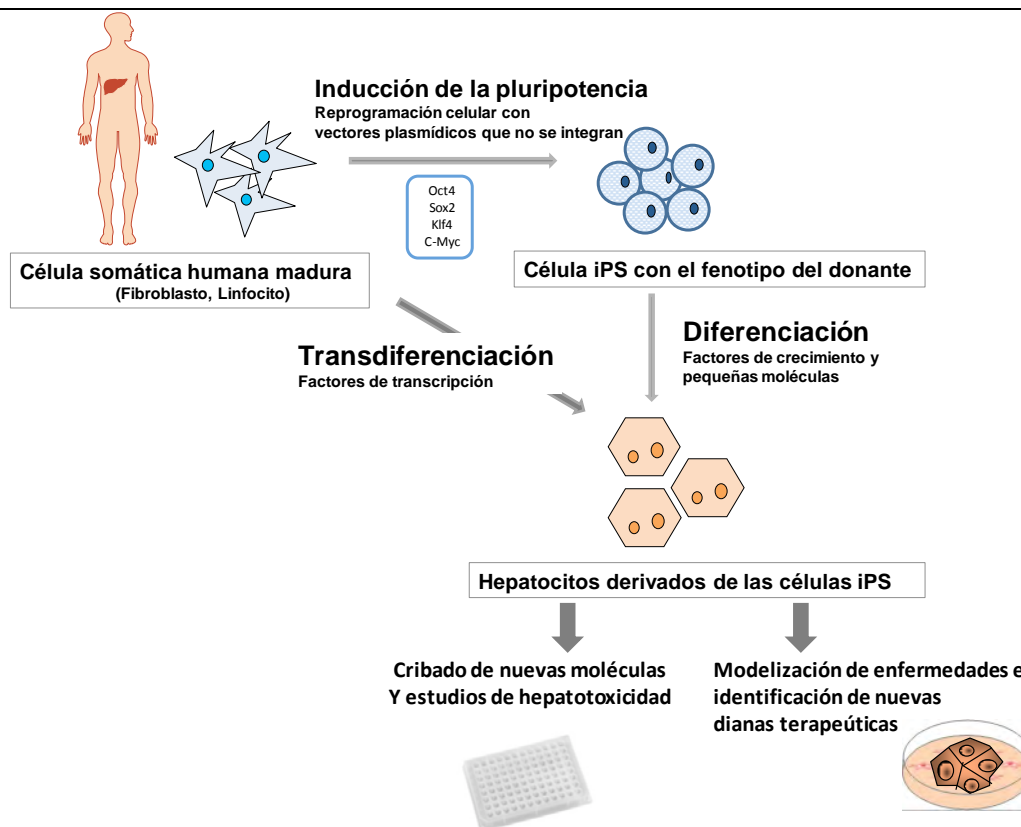
metabólica de dicho paciente, para poder estudiar los mecanismos de toxicidad implicados. La versatilidad de este modelo abre también la posibilidad de explorar el papel de enzimas hepáticos con elevada variabilidad interindividual (polimorfismo genético o fenotípico debido a inhibición/inducción enzimática por fármacos, edad, alimentación, etc.) en la bioactivación de los fármacos o evaluar comparativamente la susceptibilidad de diferentes grupos de población (metabolizadores rápidos o lentos) a la toxicidad inducida por los fármacos o identificar fenotipos de riesgo para la toxicidad del fármaco(s). Sin embargo, una limitación importante es que la expresión del transgen es transitoria y hay que realizar una nueva transfección adenoviral para cada experimento.

#### 4.3. Hepatocitos derivados de células madre pluripotentes

Una solución emergente para contrarrestar la escasez de los hepatocitos humanos para fines de investigación y clínicos es el uso de células progenitoras pluripotentes y que pueden diferenciarse a células de linaje hepático (**Figura 4**) (41). El conocimiento en torno a la reprogramación de células somáticas a pluripotentes y al tiempo la posibilidad de inducir *in vitro* su diferenciación a células de linaje hepático las convierte en un modelo celular muy atractivo para estudios de seguridad de fármacos. Por ello, actualmente se contemplan los modelos emergentes basados en hepatocitos derivados de células pluripotentes humanas como una fuente ilimitada, estable, funcional y personalizada de hepatocitos humanos alternativa a los hepatocitos nativos. Finalmente, se ha conseguido la reprogramación directa a células de fenotipo hepático desde una célula somática mediante la expresión retroviral de ciertos factores de transcripción hepáticos (Hhex, Gata4, Foxa2, HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  y HNF6) (42) (**Figura 4**).

#### 4.4. Células madre pluripotentes embrionarias (ES)

Se obtienen de la masa celular interna del blastocisto constituida por unas 30 células que son las células ES, que tienen la capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares que aparecen en el organismo adulto. Se han desarrollado protocolos para aislar estas células e inducir su diferenciación a células de linaje hepático tratando de reproducir la embriogénesis del hígado (41, 43). Actualmente, el Biobanco Nacional que dirige el Instituto de Salud Carlos III dispone de varias líneas de células ES generadas en España puestas a disposición de la comunidad científica. Sin embargo, existe gran variabilidad en la funcionalidad y metabolismo hepáticos en diferentes laboratorios por lo que hace todavía prematura la utilización de estas células para estudios de toxicidad. Se ha propuesto el cultivo en 3D de estas células con objeto de estabilizarlas para su uso en estudios de toxicidad (44).



**Figura 4. Hepatocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas.** Las células somáticas se transdiferencian directamente a linaje hepático mediante la expresión de ciertos factores de transcripción hepáticos (Hhex, Gata4, Foxa2, HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  y HNF6) o se pueden reprogramar a pluripotencia (células iPS) y después diferenciarse a hepatocitos mediante protocolos de diferenciación definidos que tratan de reproducir la embriogénesis del hígado.

#### 4.5. Células madre pluripotentes inducidas (iPS)

La reprogramación de una célula somática diferenciada a una célula pluripotente, que se asemeja a una célula madre embrionaria, es uno de los avances más impactantes en el campo de la biología celular en la última década. Las células iPS son un tipo de células madre derivadas artificialmente a partir de células somáticas en las que se induce la expresión de varios genes exógenos (Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4), conocidos como factores de Yamanaka (**Figura 4**) (45), capaces de reprogramarlas al estado de pluripotencia. Las células iPS tienen propiedades similares a las células ES, incluyendo la pluripotencia y la autorenovación y pueden dar lugar a cualquier tipo de célula adulta como los hepatocitos. Se están desarrollando protocolos de diferenciación hepática de las células iPS y si bien el grado de funcionalidad hepática conseguido es todavía menor que el de los hepatocitos primarios, se van consiguiendo importantes mejoras de los protocolos para obtener hepatocitos de funcionalidad cada vez más robusta incluyendo la metabolización de fármacos (46-48). Sin embargo, como ocurre con todos los modelos celulares hepáticos los cultivos de células iPS en esferoides o en soportes 3D con materiales biocompatibles muestran una mejor y más consistente evolución hacia hepatocitos maduros (44, 49). Hay que destacar que estas células pueden ser una fuente ilimitada de hepatocitos de

diferentes individuos con variabilidad mínima entre lotes lo que favorece la reproducibilidad y el estudio de la toxicidad específica para un individuo. Por otra parte, disponer de un modelo celular que mimetice las características fenotípicas de los hepatocitos de un determinado paciente que haya sufrido un episodio de hepatotoxicidad por fármacos, sería clave para entender el fenómeno de la hepatotoxicidad idiosincrásica y con ello desarrollar herramientas diagnósticas más específicas y precisas soslayando la barrera clínica y ética. Además, la generación de paneles de células iPS que reflejen la diversidad de los perfiles de expresión de los CYPs en la población humana permitirá realizar estudios de metabolismo humano e interacciones fármaco-fármaco (46, 50).

#### 4.6. Hepatocitos humanos immortalizados

Recientemente se ha desarrollado una tecnología denominada Upcyte basada en la modificación genética de hepatocitos en cultivo primario para que adquieran la capacidad de proliferar y mantener al mismo tiempo la diferenciación hepática (51,52). Este modelo ofrece la ventaja de combinar la expresión de las características del fenotipo hepático de hepatocitos de donantes diferentes con una disponibilidad casi ilimitada y fácil manejo, similar a las líneas celulares de hepatomas humanos. El análisis a nivel transcriptómico de genes hepáticos muestra

un perfil de expresión próximo a los hepatocitos humanos (53). Así mismo las actividades basales de los CYPs y su respuesta a inductores enzimáticos son similares a la de los hepatocitos humanos en cultivo primario. También expresan los enzimas de conjugación y funciones hepáticas clave como la síntesis de urea, lípidos, glucógeno y proteínas plasmáticas, a niveles próximos a los hepatocitos (53). Se ha mostrado su utilidad para estudios preclínicos de hepatotoxicidad y metabolismo dada su capacidad biotransformadora y buena conservación del fenotipo hepático (53).

#### 4.7. Co-cultivos de hepatocitos con otras células

El hígado se compone de dos poblaciones celulares mayoritarias, las células parenquimáticas (hepatocitos) y células no parenquimáticas (CNP) que incluyen las células endoteliales sinusoidales, estrelladas y Kupffer. Las interacciones celulares entre los distintos tipos de células son esenciales para la homeostasis funcional del hígado y para modular el metabolismo de los xenobióticos (54). Además, como muchas respuestas tóxicas *in vivo* están mediadas por una compleja interacción entre los diferentes tipos de células del hígado, la capacidad predictiva de los hepatocitos en cultivo monotípico es frecuentemente limitada. En el hígado sano se requiere una interacción directa o una comunicación vía mediadores solubles entre las células Kupffer y los hepatocitos para que éstos mantengan su funcionalidad. Los co-cultivos con CNPs particularmente células de Kupffer permite la difusión de factores y citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, TGF- $\beta$ ) a los hepatocitos para poder estudiar la hepatotoxicidad de fármacos mediada por reacciones inflamatorias. Estas citocinas están involucradas en la toxicidad idiosincrática de ciertos fármacos como el trovafloxacin (55). Kostadinova y colaboradores (56) han mostrado que los co-cultivos 3D de hepatocitos y células estrelladas, Kupffer y endoteliales permiten estudiar el efecto de los fármacos con toxicidad idiosincrática con base inflamatoria. En otro estudio reciente se ha utilizado un co-cultivo 3D de hepatocitos y células de Kupffer para estudiar el efecto anti-inflamatorio de los glucocorticoides, y se observó una distribución de metabolitos similar al observado en la orina humana (57). Por tanto, se utiliza cada vez más el co-cultivo de hepatocitos con CNPs en cualquiera de los sistemas de cultivo utilizado tanto en monocapa como en configuración 3D, dada su implicación farmacológicas y toxicológicas tras la exposición a los fármacos. Los co-cultivos establecen interacciones entre células y muestran mayor supervivencia y capacidad metabólica y funcional mejorando la fiabilidad y la predicción *in vitro* del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos (6-8, 58, 59).

## 5. MODELOS CELULARES HEPÁTICOS EN CONFIGURACIÓN 3D

Como consecuencia de las limitaciones de los modelos hepatocelulares tradicionales para el estudio pre-clínico de la hepatotoxicidad de fármacos, se han desarrollado estrategias capaces de estabilizar el fenotipo hepático en

cultivo y conseguir modelos *in vitro* más predictivos. Actualmente existen ya nuevos modelos capaces de reproducir la heterocelularidad hepática, la organización espacial tridimensional, la micro-arquitectura y la microcirculación de fluidos, aspectos todos ellos esenciales para la homeostasis funcional del hígado. Se han desarrollado diferentes tipos de bioreactores y microtejidos en los que se trata de recrear las interacciones celulares y célula-biomatriz, así como el flujo de nutrientes característicos del microambiente hepático. Los sistemas 3D pueden consistir en la microencapsulación de las células en un soporte no rígido como el alginato o los hidrogeles no adhesivos, o en la formación de agregados celulares o esferoides sin ningún tipo de soporte (6,8). Otros sistemas 3D consisten en cultivar los hepatocitos en soportes sólidos formados por matrices porosas derivadas de materiales naturales (MEC de hígados decelularizados, colágeno, alginato, quitosan) (60) o sintéticos (polietilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poli (láctico-co-glicólico) y suelen incluir también sistemas microfluídicos (**Figura 2**) (36). Los soportes naturales ofrecen ventajas en términos de biocompatibilidad y reproducen las interacciones de las células con la MEC, en cambio los soportes sintéticos ofrecen reproducibilidad y estabilidad. Los modelos más sencillos se basan en el monocultivo de hepatocitos, pero la mayor parte de los sistemas 3D utilizan co-cultivos donde conviven los hepatocitos con otras células (15, 56). Asimismo, el cultivo de líneas celulares hepáticas en configuración 3D muestra cambios importantes en la expresión génica, el fenotipo y la expresión de los receptores celulares hacia propiedades más hepáticas. En general los modelos 3D presentan mayor supervivencia y mejoran su capacidad metabólica y funcional, permitiendo tratamientos prolongados con los fármacos y administración de dosis repetidas, por lo que actualmente representan los modelos de elección para mejorar la predicción *in vitro* del metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos (6-9).

#### 5.1. Esferoides

Los hepatocitos en suspensión son capaces de autoagregarse, si se les impide la posibilidad de adherirse a un soporte sólido, restableciendo los contactos intercelulares para formar estructuras multicelulares 3D. El tamaño de los esferoides es crítico para evitar el riesgo de necrosis en su interior (200-300  $\mu$ m) puesto que la difusión de oxígeno es un factor limitante (61). Los esferoides hepáticos tanto monotípicos como heterotípicos mantienen contactos intercelulares estables y duraderos lo que es clave para la preservación de la polaridad y el mantenimiento de la expresión y actividad de los enzimas de biotransformación y de marcadores específicos de funcionalidad hepática durante semanas (6, 62-64). Un estudio reciente muestra que los esferoides de co-cultivos de hepatocitos con CNPs constituye un sistema versátil y prometedor para estudiar patologías hepáticas (colestasis, esteatosis y hepatitis vírica) y hepatotoxicidad aguda y crónica de fármacos (64).

### 5.2. Dispositivos microfluidicos

La incorporación de canales microfluídicos, que regulan la microcirculación del medio nutritivo a los sistemas 3D, constituye un paso decisivo para controlar la difusión de oxígeno y nutrientes a las células a través del soporte compuesto por materiales biocompatibles sintéticos o naturales (6,9). Las uniones con la MEC acentúan la reorganización de los componentes del citoesqueleto celular para el anclaje, generan rutas inter e intracelulares específicas de segundos mensajeros y regulan la expresión génica a largo plazo (6). Por otra parte, los co-cultivos constituyen una mayor aproximación a la anatomía y fisiología hepáticas. Además, la combinación del co-cultivo de células hepáticas (hepatocitos/CNPs, células HepG2/C3A, HepaRG/células estrelladas), con la microcirculación y gradiente de difusión fisiológico de fármacos, oxígeno, nutrientes y residuos, ha permitido desarrollar diversas plataformas hepáticas. Estas plataformas reproducen la complejidad de la arquitectura y la zonación de los sinusoides hepáticos que son funcionales y estables durante varias semanas para estudios toxicológicos y clínicos (9, 65,66). Una ventaja decisiva de estos sistemas es la posibilidad de diseñar y ajustar la velocidad del flujo así como las concentraciones de los fármacos en el medio y reproducir diferentes situaciones fisiológicas en sangre tales como los estados de ayuno, postprandial o el ciclo circadiano de las hormonas (67-70).

### 5.3. Plataformas liver-on-a-chip

La complejidad del hígado se ha reducido a la simplicidad de dispositivos que recrean a microescala las funciones del hígado durante varios días (71). Tosh y colaboradores (72) han desarrollado un biochip hepático conocido como Hepa Tox Chip con canales microfluídicos compartimentalizados por donde circula el medio de cultivo que perfunde las células inmovilizadas en colágeno. El futuro nos reserva otras plataformas de mayor complejidad y potencial, como la bioimpresión de tejidos y órganos donde confluyen las técnicas de impresión 3D, la biología celular y molecular (73). Se están desarrollando equipos que depositan células y nutrientes sobre estructuras sencillas en archivos numéricos que emplean materiales biocompatibles que actúan como soportes o armazones para su colonización por células, generando una estructura que realiza las funciones fisiológicas del hígado. El soporte podría ser biodegradable para que pudiera ser sustituido por células gradualmente hasta desaparecer una vez cumplida su función de soporte. La bioimpresión de tejido hepático se puede realizar en diferente formato como placas de cultivo o chips. Sin embargo, esta tecnología todavía se enfrenta a varios retos. Aunque es posible cultivar hepatocitos diferenciados, el problema es que éstos no se dividen y, por tanto, es muy limitada la

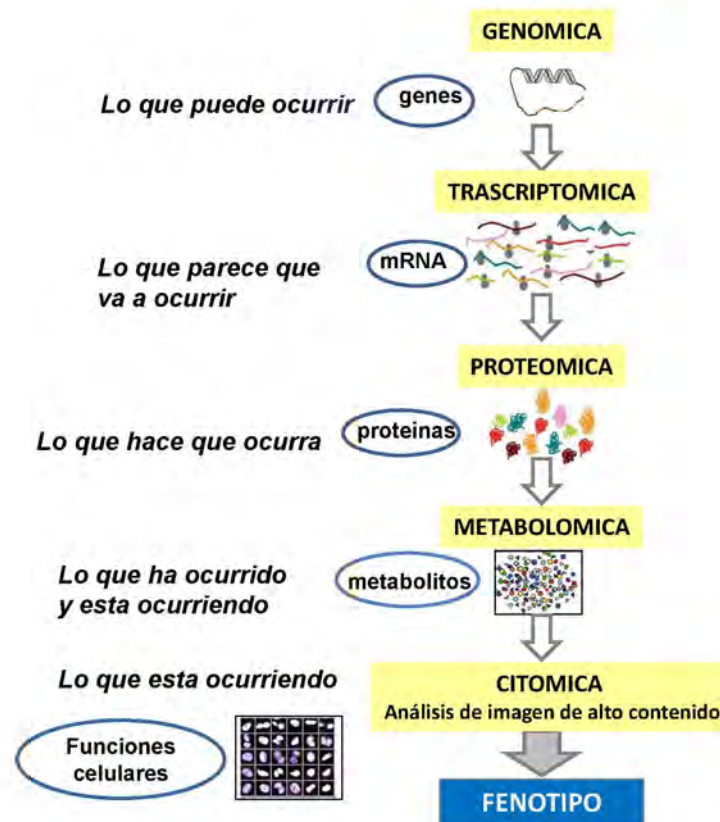
posibilidad de colonizar estructuras de gran tamaño. La solución para el futuro consistiría en emplear hepatocitos derivados de células madre iPS (74). Por tanto, la bioimpresión 3D es una tecnología emergente muy prometedora que se aproxima a la composición real del hígado incluyendo los tipos celulares relevantes y su arquitectura.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los recientes avances en el desarrollo de modelos hepáticos experimentales unido a las nuevas tecnologías ómicas abren nuevas y prometedoras perspectivas para estudios de toxicidad pre-clínica en las fases iniciales del descubrimiento de fármacos. Se han diseñado estrategias para recrear *in vitro* el microentorno *in vivo* de las células hepáticas (características mecánicas, microcirculación, difusión de oxígeno y nutrientes, interacción célula-célula y célula-biomatriz extracelular) con la finalidad de mejorar y prolongar la funcionalidad hepática. En este contexto, los cultivos 3D y los diseños microfluídicos unidos a los co-cultivos de hepatocitos con otros tipos celulares son muy prometedores para predecir de forma fiable el metabolismo y la hepatotoxicidad de fármacos en el hombre (6,8,23, 29, 75).

La identificación de pacientes con una mayor predisposición a la hepatotoxicidad por un determinado fármaco, es un problema pendiente de solución, como lo es explicar el caso clínico concreto de daño hepático en un paciente por un determinado fármaco. Los modelos animales no son capaces de reproducir el fenómeno de hepatotoxicidad idiosincrásica y por tanto no nos permiten anticipar su riesgo en el hombre. Por tanto, la posibilidad de generar modelos hepáticos con expresión “*a la carta*” de los enzimas de biotransformación es una estrategia innovadora para predecir fenotipos metabólicos de riesgo y para estudios de idiosincrasia metabólica. Los hepatocitos derivados de células pluripotentes humanas son modelos emergentes que pueden proporcionar una fuente ilimitada, estable y personalizada de hepatocitos derivados de pacientes singulares para estudios de toxicidad idiosincrásica.

Finalmente, la integración de las tecnologías ómicas y el desarrollo de estrategias multiparamétricas permitirán identificar biomarcadores y biofirmas predictivas de los mecanismos de hepatotoxicidad de fármacos y su traslación a la clínica (**Figura 5**) (25, 39, 26). La genómica, transcriptómica, proteómica y las más reciente metabolómica y citómica constituyen nuevas y eficaces aproximaciones tecnológicas para realizar estudios toxicológicos mecanísticos (76). Actualmente no hay ninguna duda de que la toxicología *in vitro* es un área muy prometedora para abordar estudios mecanísticos considerados clave hoy día para evaluar adecuadamente el riesgo de toxicidad de fármacos.



**Figura 5. Cascada de las ómicas.** Incorpora complejos conjuntos de datos que describen la respuesta de los sistemas biológicos a la toxicidad y a las perturbaciones genéticas y medioambientales de los distintos niveles ómicos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003;349:474-485.
2. Kongkaew C, Noyce PR, Ashcroft DM. Hospital admissions associated with adverse drug reactions: a systematic review of prospective observational studies. *Ann Pharmacother*. 2008; 42:1017-1025.
3. Bunnage ME. Getting pharmaceutical R&D back on target. *Nat Chem Biol*. 2011; 7:335-339.
4. Lewis DF, Ioannides C, Parke DV. Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Environ Health Perspect* 1998; 106:633-641.
5. O'Brien PJ, Chan K, Silber PM. Human and animal hepatocytes in vitro with extrapolation in vivo. *Chem Biol Interact* 2004; 150:97-114.
6. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 2013; 87:1315-1530.
7. Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, et al. Models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)* 2013; 2:23-39.
8. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Conde I, Donato MT. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014; 10:1553-1568.
9. Lauschke VM, Hendriks DF, Bell CC, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Novel 3D Culture Systems for Studies of Human Liver Function and Assessments of the Hepatotoxicity of Drugs and Drug Candidates. *Chem Res Toxicol*. 2016; 29:1936-1955.
10. Björnsson ES. Hepatotoxicity by Drugs: The Most Common Implicated Agents. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:224.
11. Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, et al. Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 2014; 109:950-966.
12. Shaw PJ, Ganey PE, Roth RA. Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2010; 118:7-18.



13. Park BK, Laverty H, Srivastava A, et al. Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity. *Chem Biol Interact* 2011; 192:30-36
14. Sakatis MZ, Reese MJ, Harrell AW, et al. Preclinical strategy to reduce clinical hepatotoxicity using in vitro bioactivation data for >200 compounds. *Chem Res Toxicol* 2012; 25:2067-2082
15. Gomez-Lechon MJ, Tolosa L, Castell JV, et al. Mechanism-based selection of compounds for the development of innovative in vitro approaches to hepatotoxicity studies in the LIINTOP project. *Toxicol In Vitro* 2010; 24:1879-1889.
16. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, et al. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2003; 4:292-312.
17. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV et al. Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab* 2004; 5:443-462.
18. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT. An update on metabolism studies using human hepatocytes in primary culture. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4:837-854.
19. Hewitt NJ, Gómez-Lechon MJ, Houston JB, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 2007; 39:159-234.
20. Kim HM, Han SB, Hyun BH, et al. Functional human hepatocytes: isolation from small liver biopsy samples and primary cultivation with liver-specific functions. *J Toxicol Sci* 1995; 20:565-578.
21. Kienhuis AS, Wortelboer HM, Maas WJ, et al. A sandwich-cultured rat hepatocyte system with increased metabolic competence evaluated by gene expression profiling. *Toxicol In Vitro* 2007; 21:892-901.
22. Donato MT, Lahoz A, Castell JV, et al. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab* 2008; 9:1-11.
23. Donato MT, Jover R, Gomez-Lechon MJ. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr Drug Metab* 2013; 14:946-968.
24. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, et al.: High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol* 2006; 80:580-604.
25. Tolosa L., Pinto S, Donato MT, et al. Development of a Multiparametric Cell-based Protocol to Screen and Classify the Hepatotoxicity Potential of Drugs. *Toxicol Sci* 2012a; 127:187-198.
26. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Donato MT. High-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in cell models. *Arch Toxicol* 2015a; 89:1007-1022.
27. Tolosa L, Carmona A, Castell JV, et al. High-content screening of drug-induced mitochondrial impairment in hepatic cells: effects of statins. *Arch Toxicol* 2015b; 89:1847-1860.
28. Van den Hof WF, Coonen ML, van Herwijnen M, et al. Classification of hepatotoxicants using HepG2 cells: A proof of principle study. *Chem Res Toxicol* 2014; 27:433-442.
29. Donato MT, Gómez-Lechón MJ, Tolosa L. Using high-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in preclinical studies. *Expert Opin Drug Discov* 2017; 12:201-211.
30. Nakamura K, Kato N, Aizawa K, et al. Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. 2011;036:625633.
31. Ramaiahgari SC, den Braver MW, Herpers B, et al. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxicol* 2014; 88:1083-1095.
32. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Jiménez N, et al. Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016b; 1:02:1-9.
33. Aninat C, Piton A, Glaise D, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 2006; 34:75-83.
34. Klein S, Mueller D, Schevchenko V, Noor F. Long-term maintenance of HepaRG cells in serum-free conditions and application in a repeated dose study. *J Appl Toxicol* 2014; 34:1078-1086.
35. Le Vee M, Noel G, Jouan E, et al. Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol In Vitro* 2013; 27:1979-86.
36. Mueller D, Kramer L, Hoffmann E, et al. 3D organotypic HepaRG cultures as in vitro model for acute and repeated dose toxicity studies. *Toxicol In Vitro* 2014; 28:104-112.
37. Gustafsson F, Foster AJ, Sarda S, et al. A correlation between the in vitro drug toxicity of drugs to cell lines that express human P450s and their propensity to cause liver injury in humans. *Toxicol Sci* 2014; 137:189-211.
38. Tolosa L, Donato MT, Pérez-Cataldo G, et al. Upgrading cytochrome P450 activity in HepG2 cells co-transfected with adenoviral vectors for drug hepatotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro* 2012b; 26:1272-1277.
39. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Pérez-Cataldo G, et al. HepG2 cells simultaneously expressing five P450

- enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Arch Toxicol*. 2013; 87:1115-1127.
40. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Upgrading HepG2 cells with adenoviral vectors that encode drug-metabolizing enzymes: application for drug hepatotoxicity testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13:137-148.
  41. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L. Human hepatocytes derived from pluripotent stem cells: promising cell model for drug hepatotoxicity screening. *Arch Toxicol*. 2016; 90:2049-2061.
  42. Yu B, He ZY, You P, et al. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*. 2013;13:328-340.
  43. Baxter MA, Rowe C, Alder J, et al. Generating hepatic cell lineages from pluripotent stem cells for drug toxicity screening. *Stem Cell Res* 2010; 5:4-22.
  44. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* 2013; 34:1781-1789.
  45. Liu X, Huang J, Chen T, et al. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Res*. 2008;18:1177-1189.
  46. Medine CN, Lucendo-Villarin B, Storck C, et al.: Developing high-fidelity hepatotoxicity models from pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2:505-9.
  47. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010; 51:297-305.
  48. Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, et al. An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet* 2014; 29:237-243
  49. Gieseck RL, Hannan NR, Bort R, et al. Maturation of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes by 3D-culture. *PLoS One* 2014; 9:e86372.
  50. Anson BD, Kolaja KL, Kamp TJ. Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89:754-758.
  51. Burkard A, Dahn C, Heinz S, et al. Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte(R) technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica* 2012; 42:939-956.
  52. Levy G, Bomze D, Heinz S, et al. Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat Biotechnol*. 2015; 33:1264-1271
  53. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, López S, et al. Human Upcyte Hepatocytes: Characterization of the Hepatic Phenotype and Evaluation for Acute and Long-Term Hepatotoxicity Routine Testing. *Toxicol Sci*. 2016a; 152:214-229.
  54. Milosevic N, Schawalder H, Maier P. Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 1999; 26:75-87.
  55. Liguori MJ, Ditewig AC, Maddox JF, et al. Comparison of TNF $\alpha$  to lipopolysaccharide as an inflammagen to characterize the idiosyncratic hepatotoxicity potential of drugs: Trovafloxacin as an example. *Int J Mol Sci*. 2010; 11:4697-714.
  56. Kostadinova R, Boess F, Applegate D, et al. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 268:1-16.
  57. Sarkar U, Rivera-Burgos D, Large EM, et al. (2015) Metabolite profiling and pharmacokinetic evaluation of hydrocortisone in a perfused three-dimensional human liver bioreactor. *Drug Metab Dispos* 43(7):1091-1099
  58. Ohno M, Motojima K, Okano T, et al. Up-regulation of drug-metabolizing enzyme genes in layered co-culture of a human liver cell line and endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 2008; 14:1861-1869.
  59. Krause P, Saghatolislam F, Koenig S, Unthanet al. Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; 45:205-12.
  60. De Kock J, Ceelen L, De Spiegelaere W, et al. Simple and quick method for whole-liver decellularization: a novel in vitro three-dimensional bioengineering tool? *Arch Toxicol* 2011; 85:607-612.
  61. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 2008; 3:1172-1184.
  62. van Zijl F, Mikulits W. Hepatospheres: Three dimensional cell cultures resemble physiological conditions of the liver. *World J Hepatol* 2010; 2:1-7.
  63. Ohkura T, Ohta K, Nagao T, Kusumoto K, Koeda A, Ueda T, Jomura T, Ikeya T, Ozeki E, Wada K, Naitoh K, Inoue Y, Takahashi N, Iwai H, Arakawa H, Ogihara T. Evaluation of human hepatocytes cultured by three-dimensional spheroid systems for drug metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2014;29:373-378.
  64. Bell CC, Hendriks DF, Moro SM, et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci Rep* 2016; 6:25187.
  65. Mueller D, Heinzle E, Noor F. 3D Hepatic In Vitro Models as Tools for Toxicity Studies. *Current Tissue Eng* 2013; 2:78-89.

66. Bhise NS, Manoharan V, Massa S, et al. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication*. 2016; 8:014101.
67. Chao P, Maguire T, Novik E, et al. Evaluation of a microfluidic based cell culture platform with primary human hepatocytes for the prediction of hepatic clearance in human. *Biochem Pharmacol* 2009; 78:625-632.
68. Goral VN, Hsieh YC, Petzold ON, et al. Perfusion-based microfluidic device for three-dimensional dynamic primary human hepatocyte cell culture in the absence of biological or synthetic matrices or coagulants. *Lab Chip* 2010; 10:3380-3386.
69. Novik E, Maguire TJ, Chao P, et al. A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies. *Biochem Pharmacol* 2010; 79:1036-1044.
70. Bhushan A, Senutovitch N, Bale SS, et al. Towards a three-dimensional microfluidic liver platform for predicting drug efficacy and toxicity in humans. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4 Suppl 1:S16.
71. Toh Y-C, Lim T C, Tai D, et al. A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing. 2009; *Lab Chip* 9: 2026–2010.
72. Bavli D, Prill S, Ezra E, et al. Real-time monitoring of metabolic function in liver-on-chip microdevices tracks the dynamics of mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016; 113: E2231–E2240.
73. Zhu W, Ma X, Gou M, et al. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 40: 103–112.
74. Ma X, Qu X, Zhu W, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016; 113: 2206–2211.
75. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Metabolic activation and drug-induced liver injury: in vitro approaches for the safety risk assessment of new drugs. *J Appl Toxicol.* 2016; 36(6):752-768.
76. Las Omicas: Genómica, proteómica, citómica y metabolómica. Nuevas Tecnologías para el desarrollo de Fármacos. María Cascales Angosto, M<sup>a</sup> José Gómez-Lechón y Enrique O'Connor, eds. Madrid: Instituto de España y Real Academia Nacional de Farmacia, Fundación José Casares Gil, 2005.

# Hepatotoxicidad idiosincrásica por fármacos: promesas y limitaciones de las estrategias *in vitro*

**Title in English:** *Drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity: Promises and limitations of in vitro Strategies*

M. Teresa Donato

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina y Odontología, Universitat de València; Unidad Mixta de Investigación en Hepatología Experimental UV-Fundación La Fe.

**ABSTRACT:** Idiosyncratic hepatotoxicity occurs unpredictably in a small group of susceptible individuals with no direct dose relationship. Although the mechanisms involved in these adverse drug reactions remain unclear, several hypotheses have been proposed to explain their idiosyncratic nature, including drug conversion into reactive metabolites (bioactivation), activation of the immune system, mitochondrial dysfunction or inflammatory stress. Safety studies conducted during drug development are clearly insufficient to predict idiosyncratic toxic damage. The current preclinical models (experimental animals and *in vitro*) are unable to reproduce the multiple genetic or acquired factors that influence the individual susceptibility, which makes it practically impossible to detect drugs with the capacity to induce idiosyncratic episodes. In recent years, a great effort has been made to develop new strategies capable of anticipating idiosyncratic liver damage induced by drugs and to identify those patients with an increased risk for hepatotoxicity. *In vitro* assays based on the use of cellular models that reflect individual idiosyncrasy, together with *omics* and multiparametric cellular analysis technologies, have reoriented the evaluation of the toxic effects induced by drugs and are postulated as tools with great projection to discriminate hepatotoxic potential of new drugs.

**RESUMEN:** La hepatotoxicidad idiosincrásica se presenta de forma impredecible en un grupo reducido de individuos susceptibles y sin relación directa con la dosis. Si bien los mecanismos implicados en estas reacciones adversas de los fármacos permanecen sin esclarecer, se han propuesto varias hipótesis para explicar su naturaleza idiosincrásica, entre las que se incluyen la conversión del fármaco en metabolitos reactivos (bioactivación), la activación del sistema inmune, la disfunción mitocondrial o el estrés inflamatorio. Los estudios de seguridad que se realizan durante el desarrollo de fármacos son insuficientes para predecir el daño tóxico de naturaleza idiosincrásica. Los actuales modelos preclínicos (animales de experimentación e *in vitro*) son incapaces de reproducir los múltiples factores genéticos o adquiridos que influyen sobre la susceptibilidad individual, lo que hace prácticamente imposible la detección de fármacos con capacidad de inducir episodios idiosincráticos. En los últimos años se viene realizado un gran esfuerzo dirigido a desarrollar nuevas estrategias capaces de anticipar el daño hepático idiosincrático inducido por fármacos e identificar aquellos pacientes que presentan mayor riesgo a la hepatotoxicidad. Los ensayos *in vitro* basados en el uso de modelos celulares que reflejen la idiosincrasia individual, junto con las tecnologías ómicas y de análisis celular multiparamétrico, han reorientado la forma de evaluar los efectos tóxicos de los fármacos y se postulan como herramientas con gran proyección para discriminar el potencial hepatotóxico de nuevos fármacos.

**Corresponding Author:** donato\_mte@gva.es

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 2 (2017), pp. 268-283

## 1. INTRODUCCIÓN

La hepatotoxicidad por fármacos es un problema de salud de importancia creciente y un motivo de preocupación para los clínicos, la industria farmacéutica y los organismos reguladores. El número de fármacos capaces de inducir daño hepático es sorprendentemente elevado con manifestaciones clínicas que abarcan desde formas leves con elevación asintomática de transaminasas en suero hasta hepatitis fulminantes (1-3). Esta especial vulnerabilidad del hígado a la acción tóxica de los fármacos puede justificarse en base a su localización anatómica entre la circulación portal y la sistémica, su papel clave en los procesos de biotransformación y la expresión elevada de transportadores de fármacos que pueden facilitar la acumulación de compuestos tóxicos en

los hepatocitos.

Los estudios de seguridad realizados durante el desarrollo de fármacos brindan una primera oportunidad para identificar y descartar moléculas con capacidad de inducir toxicidad en el hombre; no obstante, el daño hepático por fármacos es uno de los fenómenos tóxicos con menor correlación con los tests en animales por lo que con frecuencia no se detecta durante los ensayos preclínicos (4-5). La hepatotoxicidad constituye hoy en día la razón principal para la retirada del mercado de fármacos previamente aprobados y la interrupción del desarrollo de nuevos fármacos (6). La hepatotoxicidad inducida por algunos fármacos es intrínseca, lo que significa que sus efectos dependen de la dosis, se manifiesta de forma similar en todos los pacientes y es reproducible en modelos animales. La dificultad en la predicción es mucho

mayor para aquellos fármacos que inducen reacciones idiosincráticas, de tal forma que su hepatotoxicidad solo se manifiestan en una minoría de pacientes susceptibles y a dosis que son seguras para el resto de la población (1,7). Estos episodios raros de toxicidad no son predecibles en modelos experimentales por lo que en la práctica no se detectan antes de la aprobación del fármaco y solo emergen tras su autorización y comercialización, cuando miles de pacientes han sido expuestos al fármaco (6,7).

La hepatotoxicidad idiosincrática es particularmente insidiosa por su naturaleza impredecible y su potencial gravedad. En la actualidad son muchos los grupos de investigación básica, clínica y de la industria farmacéutica que están volcando sus esfuerzos para ahondar en el conocimiento de los mecanismos responsables de estas reacciones tóxicas de los fármacos y de los factores individuales que expliquen la mayor vulnerabilidad de ciertos pacientes. No cabe duda de que el desarrollo de estrategias experimentales capaces de anticipar el potencial de nuevas moléculas para inducir hepatotoxicidad idiosincrática contribuirá de forma indudable al desarrollo de fármacos más seguros.

## 2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA HEPATOTOXICIDAD IDIOSINCRÁTICA

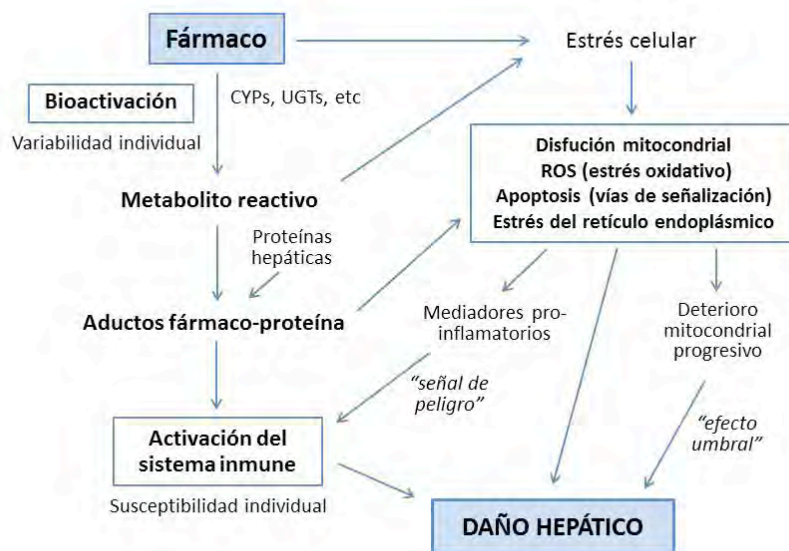
Diversos factores relacionados con el propio fármaco (*drug-dependent*) o con el individuo (*host-dependent*) pueden contribuir a la aparición de estas reacciones tóxicas singulares (**Figura 1**) (3,8). Los avances en el conocimiento mecanístico de la hepatotoxicidad idiosincrática se han visto dificultados por diversos motivos tales como su baja incidencia, que hace casi imposible su detección en el pequeño número de animales de laboratorio utilizados en las evaluaciones preclínicas de seguridad, las diferencias interespecies, la existencia de factores individuales de susceptibilidad y la falta de una relación consistente con la dosis (9). A pesar de estas limitaciones, los esfuerzos recientes encaminados al desarrollo de nuevos modelos animales y sistemas *in vitro* han contribuido a aumentar la comprensión molecular del daño hepático por fármacos de naturaleza idiosincrática (9,10).



**Figura 1. Factores de riesgo asociados a la hepatotoxicidad idiosincrática.**

Son varios los mecanismos que han sido implicados en la hepatotoxicidad idiosincrática inducida por fármacos y las hipótesis propuestas para explicar su aparición en sujetos susceptibles. Aunque los mecanismos subyacentes siguen siendo ampliamente desconocidos en muchos

casos, la bioactivación metabólica del fármaco, la respuesta inmune adaptativa, el daño mitocondrial y el estrés inflamatorio se consideran factores clave (9,11) (**Figura 2**).



**Figura 2. Mecanismos propuestos para explicar la hepatotoxicidad idiosincrática.** El metabolismo hepático de fármacos puede generar metabolitos reactivos (bioactivación) con capacidad para formar aductos con proteínas y activar la respuesta adaptativa del sistema inmune (haptización). La variabilidad interindividual en el metabolismo de fármacos y/o la respuesta del sistema inmune pueden explicar las diferencias en la susceptibilidad a la hepatotoxicidad por fármacos. Los fármacos, o con frecuencia sus metabolitos reactivos, interactúan con funciones o estructuras de los hepatocitos, induciendo estrés o daño celular a través de diferentes mecanismos. El daño progresivo sobre las mitocondrias o la liberación de señales proinflamatorias pueden contribuir también como factores adicionales para desencadenar la hepatotoxicidad. ER, retículo endoplásmico; ROS, especies reactivas del oxígeno.

Las reacciones del metabolismo de fármacos, y en particular las oxidaciones catalizadas por los citocromo P450 (CYP) hepáticos juegan un papel importante en la toxicidad idiosincrásica (8,12). Muchos fármacos son metabolizados activamente antes de ser eliminados de nuestro organismo y, en la mayoría de los casos, se generan metabolitos biológicamente inactivos. Sin embargo, dependiendo de la estructura química del compuesto, pueden formarse metabolitos más tóxicos que el fármaco original dando lugar a su bioactivación. La formación de metabolitos químicamente reactivos se ha asociado con el daño hepático inducido por muchos fármacos y se ha comprobado que una alta proporción de fármacos retirados o con restricciones de uso (*black box warnings*) por su hepatotoxicidad generan metabolitos reactivos (13).

Los metabolitos tóxicos formados durante el metabolismo de fármacos son químicamente diversos, e incluyen especies electrofílicas, radicales y especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos intermediarios reactivos pueden interactuar con estructuras o funciones celulares y causar toxicidad a través de diferentes mecanismos (14). La disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la alteración de la homeostasis del calcio intracelular o la modificación covalente de macromoléculas son algunos de los efectos inducidos por metabolitos reactivos.

En el ser humano existe una variabilidad interindividual muy significativa en los enzimas hepáticos de biotransformación que se traduce en diferencias no sólo en la velocidad de metabolización de los fármacos, sino también en los perfiles metabólicos resultantes. Dichas

diferencias son debidas a una combinación de factores genéticos (polimorfismos) o de otra índole (factores nutricionales o fisiológicos, patologías, procesos inflamatorios, consumo de fármacos, alcohol o tabaco, inducción enzimática, etc) que controlan la expresión y/o la actividad de enzimas del metabolismo de fármacos (15). Esta variabilidad fenotípica genera una idiosincrasia metabólica que puede contribuir a la aparición de reacciones tóxicas singulares. Los individuos susceptibles pueden mostrar un metabolismo característico de un fármaco en particular (p.e., aumento de la formación de metabolitos reactivos y/o disminución de su inactivación), lo que puede conducir a un mayor riesgo de hepatotoxicidad (16).

En algunos casos, los aductos covalentes formados por la interacción de metabolitos reactivos con proteínas hepáticas pueden actuar como haptenos y activar el sistema inmune ("hipótesis del hapteno") (17). Tras la haptización, las proteínas modificadas son procesadas y presentadas como antígenos para su reconocimiento por los linfocitos, poniendo así en marcha la respuesta inmunológica que culmina en daño hepático. La propensión de un fármaco para formar aductos depende de la proporción de metabolitos reactivos generados, su vida media y su capacidad para reaccionar con proteínas diana (14). Ahora bien, la formación de aductos se considera una condición necesaria, pero no suficiente, para desencadenar la respuesta inmune, en la que hay un componente idiosincrásico que determina el umbral de tolerancia de un individuo frente a los aductos formados. Las diferencias individuales en la propensión a desarrollar una respuesta inmune adaptativa pueden ser determinantes en el



resultado final (adaptación/tolerancia *versus* hepatotoxicidad) y podrían explicar por qué estas reacciones adversas al fármaco ocurren sólo en un pequeño grupo de pacientes susceptibles (3,17). En este sentido, se han establecido asociaciones interesantes entre ciertos haplotipos HLA y la mayor propensión al daño hepático inducido por determinados fármacos (17).

Se ha postulado que la generación de metabolitos reactivos y la posterior formación de aductos (haptización) son insuficientes para causar lesión hepática y, por lo tanto, se requiere una segunda señal ("señal de peligro") para precipitar la hepatotoxicidad. Las células estresadas o dañadas liberan moléculas (mediadores proinflamatorios, péptidos modificados) que pueden estimular/regular la activación linfocitaria mediada por las células presentadoras de antígenos. La disfunción mitocondrial inducida por el fármaco, la generación de ROS, el estrés del retículo endoplasmático, la activación de las vías de muerte celular, los episodios inflamatorios leves, las infecciones o las alteraciones de la microbiota han sido propuestas como posibles factores independientes que pueden actuar como coadyuvantes para modificar la respuesta inmune adaptativa (3,9,11). La necesidad de que la exposición a un fármaco que forma metabolitos reactivos con capacidad de unirse covalentemente a proteínas deba coincidir en el tiempo con una señal de activación o de peligro puede explicar la baja incidencia de la hepatotoxicidad idiosincrásica.

Una serie de características singulares de las mitocondrias (composición de su doble membrana, alta producción de ROS, síntesis de ATP, acumulación de moléculas pro-apoptóticas, vulnerabilidad del ADN mitocondrial, etc.) las convierten en una diana celular importante del daño inducido por fármacos (18). Su papel fundamental en la integración de vías de señalización y en la supervivencia y mantenimiento de la homeostasis de la célula las hacen acreedoras de un papel central en los mecanismos de hepatotoxicidad (18,19). Tras un insulto tóxico, no todas las mitocondrias de una célula son afectadas por igual, al tiempo que se desencadenan mecanismos compensatorios (mitofagia, biogénesis, fusión, fisión) para adaptar el metabolismo mitocondrial al estrés inducido por el fármaco (20). Se ha postulado que el daño mitocondrial acumulado en una célula puede no tener consecuencias directas hasta que se alcanza un umbral crítico, por encima del cual el daño a la célula se hace repentinamente evidente (19). Este "efecto umbral" puede contribuir a la idiosincrasia individual, ya que los pacientes susceptibles pueden mostrar una acumulación

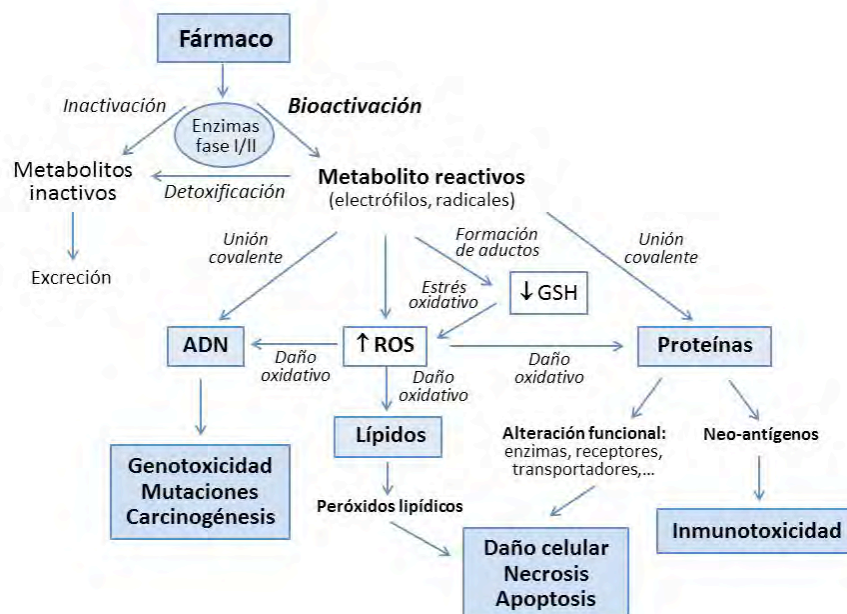
más rápida de mitocondrias con función comprometida.

Evidencias obtenidas en estudios en modelos animales sugieren que la susceptibilidad de un individuo a ciertos fármacos puede estar modulada por episodios de inflamación concurrentes, cuya aparición esporádica y errática sería la base de la hepatotoxicidad idiosincrática ("hipótesis del estrés inflamatorio") (9,19). La liberación de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores durante un estrés inflamatorio moderado puede aumentar la sensibilidad de las células hepáticas, reducir el umbral de toxicidad del fármaco y precipitar una reacción hepatotóxica. Al mismo tiempo, un fármaco podría exacerbar la respuesta a una situación inflamatoria leve e inofensiva y convertirla en perjudicial (9).

En resumen, son varias las hipótesis mecanísticas propuestas para explicar la naturaleza idiosincrática de la hepatotoxicidad inducida por algunos fármacos. Cada hipótesis se apoya en evidencias clínicas y experimentales, y ninguna ha sido definitivamente probada. Los diferentes mecanismos son compatibles y no mutuamente excluyentes, incluso para un fármaco en particular. La hepatotoxicidad idiosincrásica puede surgir de la concurrencia de múltiples factores o mecanismos que, cuando se producen individualmente, no inducen toxicidad manifiesta pero que de forma combinada pueden desencadenar una lesión hepática (**Figura 2**). Este escenario se resume en la "hipótesis de múltiples determinantes", que establece que las reacciones idiosincrásicas requieren la aparición simultánea de varios factores discretos y precipitantes (9).

### **3. METABOLISMO DE FÁRMACOS, BIOACTIVACIÓN Y HEPATOTOXICIDAD IDIOSINCRÁTICA**

La biotransformación de fármacos comprende reacciones de oxidación, reducción o de hidrólisis que introducen o exhiben nuevos grupos polares en la molécula (fase I) y reacciones de conjugación con cofactores endógenos hidrófilos (fase II) para formar metabolitos solubles en agua que se excretan fácilmente. Se han descrito relaciones estrechas entre el metabolismo del fármaco y acontecimientos hepáticos adversos (**Figura 3**). Un estudio sistemático con unos 200 fármacos ampliamente prescritos en EEUU reveló que los fármacos sin metabolismo hepático significativo raramente causan daño hepático, mientras que se encontró un riesgo aumentado para los fármacos con un metabolismo hepático superior al 50 % (21).



**Figura 3. Papel de la bioactivación en la hepatotoxicidad por fármacos.** Durante el metabolismo de fármacos se pueden formar metabolitos estables/inactivos y metabolitos reactivos. La bioactivación metabólica puede dar lugar a hepatotoxicidad por la reacción de metabolitos electrofílicos del fármaco con centros nucleofílicos de macromoléculas (ADN, lípidos, proteínas) o por el daño oxidativo inducido por un exceso de formación de ROS.

La bioactivación del fármaco suele estar relacionada con reacciones de fase I, en particular con oxidaciones mediadas por los CYPs. El CYP3A4, el más abundante en el hígado humano y principal responsable del metabolismo oxidativo de los fármacos, explica la activación metabólica de muchos de ellos (22). Otros CYPs (por ejemplo, CYP2C9, 2C19, 1A2, 2B6, 2D6 o 2E1), otras enzimas de fase I (por ejemplo, flavina monooxigenasa, monoaminoxidasa o peroxidasas) o enzimas de fase II (por ejemplo, UDP-glucuronosiltransferasas) también están implicados activamente en la bioactivación de fármacos y otros xenobióticos (23,24).

Son varios los metabolitos electrofílicos que han sido implicados en la toxicidad producida por fármacos: quinona iminas (relacionados con la toxicidad de paracetamol, diclofenaco, amodiaquina, nefazodona), hidracinas (isoniazida, hidralazina), epóxidos (furosemida), carbonilos insaturados (por ejemplo, felbamato, terbinafina) o acilglucuronidos (diclofenaco y otros AINEs) entre otros (23,24). Las especies electrofílicas pueden reaccionar con centros nucleofílicos de las células para formar aductos covalentes, que pueden alterar permanentemente la estructura y actividad de la macromolécula diana (**Figura 3**). Su interacción con ácidos nucleicos puede derivar en daño al ADN (modificación de bases, rupturas de la hebra) y genotoxicidad. Los grupos sulfidrido de la cisteína y los nitrógenos nucleofílicos de algunos aminoácidos (por ejemplo, histidina, lisina o arginina) son dianas comunes en las proteínas. La modificación covalente de enzimas, transportadores, receptores y otras proteínas celulares puede resultar en el deterioro directo de funciones metabólicas clave, alteración de las vías de señalización,

desequilibrio iónico, pérdida de la homeostasis fisiológica y muerte celular (12,14). Algunas proteínas modificadas también pueden servir como inmunógenos (haptización) e inducir una respuesta inmune.

La bioactivación también puede inducir daño celular a través de la generación de radicales derivados del metabolismo oxidativo del fármaco o por formación de ROS (Ioannides y Lewis 2004). Esto último es frecuente para los compuestos que experimentan ciclos redox (por ejemplo, quinonas). Las especies radicalarias pueden inducir daño celular por unión covalente a macromoléculas de forma similar a los intermedios electrofílicos (23) y también son capaces oxidar componentes celulares esenciales (**Figura 3**). El ataque oxidativo al ADN puede producir mutaciones y carcinogénesis. La oxidación de residuos de aminoácidos clave puede conducir a inactivación enzimática o pérdida de otras funciones proteicas. Los lípidos insaturados, particularmente los componentes de las membranas celulares, son altamente susceptibles al daño oxidativo por ROS y otras especies oxidantes. La peroxidación lipídica es una secuencia de reacciones radicalarias que se propagan en cadena y que oxidan los lípidos con formación de peróxidos lipídicos. El estrés oxidativo, la destrucción progresiva de los lípidos de la membrana, la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, la alteración de la homeostasis del calcio intracelular o la pérdida de la integridad de la membrana celular son consecuencias de la peroxidación lipídica (12).

La propensión de un compuesto relativamente inerte para transformarse en un metabolito reactivo depende principalmente de su estructura química. El análisis exhaustivo de fármacos objeto de medidas reguladoras o con advertencias de uso por hepatotoxicidad idiosincrásica

ha permitido la propuesta de grupos funcionales o motivos químicos susceptibles de formar intermediarios reactivos (25). Estas alertas estructurales (toxicóforos) incluyen aminopiridinas, anilinas, furano, hidrazinas, tiazoles, tiofeno, catecol, ciclopropilamina, nitrobenzeno, ácidos heteroarilacéticos y ácidos arilacéticos (22). Se han diseñado aplicaciones informáticas que incorporan información sobre el metabolismo y la toxicidad de fármacos conocidos con el objetivo de desarrollar sistemas capaces de predecir el metabolismo oxidativo de nuevos compuestos y anticipar la posible formación de metabolitos reactivos. La finalidad de estas herramientas *in silico* es servir de ayuda para el diseño químico y propuesta de moléculas durante el descubrimiento de nuevos fármacos (12). Se dispone asimismo de ensayos *in vitro* para identificar la posible bioactivación de moléculas candidatas. Básicamente estos ensayos consisten en la incubación del compuesto con un sistema biológico que presente una actividad metabólica elevada (microsomas hepáticos, preparaciones enzimáticas) y la posterior aplicación de métodos que permitan revelar la formación de metabolitos reactivos (detección de aductos con proteínas hepáticas, captura o *trapping* de metabolitos, inhibición en enzimas) (12,22,26). La información proporcionada por estos estudios se utiliza para identificar

y descartar compuestos de riesgo durante las fases tempranas del descubrimiento de fármacos y seleccionar aquellas moléculas con menor tendencia a la bioactivación.

En vista del papel clave del metabolismo de fármacos en la hepatotoxicidad, varios estudios han establecido asociaciones potenciales entre los polimorfismos genéticos de enzimas de biotransformación y el aumento del riesgo de hepatotoxicidad de ciertos fármacos (Tabla 1) (27-30). La susceptibilidad individual se ha relacionado también con variantes polimórficas o mutaciones puntuales en proteínas implicadas en el transporte de fármacos o en la defensa antioxidante (31,32). Estos hallazgos sugieren que la toxicidad se produce ante un desequilibrio entre la producción de metabolitos reactivos y su desintoxicación, tal y como ocurre en situaciones que conducen a una actividad aumentada de vías de bioactivación y/o una menor capacidad de neutralizar especies reactivas. Por tanto, no sólo la mayor o menor tendencia de un fármaco a producir intermediarios reactivos, sino también ciertos factores de riesgo preexistentes en pacientes susceptibles (genotipo, edad, sexo, inducción/inactivación enzimática, enfermedades subyacentes) van a ser determinantes en la aparición de hepatotoxicidad idiosincrásica.

**Tabla 1. Factores genéticos asociados a un mayor riesgo de susceptibilidad individual a la hepatotoxicidad por fármacos**

Genes polimórficos asociados	Fármacos	Referencias
CYP2E1, NAT2, GSTM1, GSTT1	Isoniazida y otros agentes antituberculosos	(29)
CYP2C8, UGT2B7, ABCC2	Diclofenac	(27)
CYP2B6	Ticlopidina	(28)
GSTM1/GSTT1 (doble nulo)	Varios fármacos (antibióticos, AINEs)	(30)
UGT1A1	Pazopanib	(29)
ABCB11	Estrógenos	(32)
MnSOD2, GPX1	Varios fármacos	(31)
POL G1	Valproato	(32)
HLA-A, HLA-B	Amoxicilina-Clavulánico	(32)
HLA-DRB1/DQB1	Varios fármacos colestáticos	(32)

#### 4. ESTRATEGIAS *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA HEPATOTOXICIDAD POR FÁRMACOS

La relación entre bioactivación y hepatotoxicidad es compleja y permanece sin estar completamente esclarecida, incluso para los fármacos más investigados (8). El hecho de que un fármaco pueda transformarse en un metabolito reactivo no implica necesariamente que llegue a inducir un efecto tóxico. Si la bioactivación representa una ruta secundaria del metabolismo del fármaco, la formación de intermediarios reactivos puede minimizarse mediante otras vías metabólicas que conducen a la conversión masiva del fármaco en metabolitos estables no tóxicos. Además, los metabolitos perjudiciales formados en las vías de bioactivación pueden ser neutralizados por los mecanismos de defensa celular (unión a GSH, sistemas de defensa antioxidante y eliminación de especies

electrofilicas), evitando que lleguen a producir efectos nocivos. Y aún en el caso de que llegaran a formarse aductos con macromoléculas celulares, la identidad de la molécula diana, su función bioquímica, la magnitud de la modificación covalente o la eficacia de los mecanismos de reparación o sustitución serían los determinantes del efecto tóxico final (12,23,26). Por tanto, durante el desarrollo farmacéutico se hace necesario no sólo comprobar la formación de metabolitos potencialmente tóxicos, sino también verificar la capacidad de éstos de inducir daño celular.

##### 4.1. Modelos celulares

Los ensayos *in vitro* de toxicidad basados en células tienen el potencial de proporcionar información rápida y económicamente viable que sirva de retroalimentación durante las fases tempranas del desarrollo farmacéutico. La

capacidad de estos ensayos para predecir el efecto tóxico del fármaco depende de forma crítica de las características y comportamiento funcionales de las células utilizadas. Por ello, en los últimos años se están realizando esfuerzos importantes encaminados al desarrollo y optimización de ensayos *in vitro* basados en células hepáticas capaces de identificar/anticipar la hepatotoxicidad inducida por nuevos fármacos. Los modelos celulares que se utilizan en estudios de hepatotoxicidad son muy diversos y comprenden desde los modelos más tradicionales, como las líneas celulares de hepatoma o los hepatocitos primarios cultivados en monocapa, hasta modelos surgidos más recientemente, como sistemas celulares complejos en configuración 3D o células hepáticas derivadas de células madre. Las ventajas e inconvenientes de los diferentes modelos hepáticos han sido ampliamente revisadas en publicaciones previas (33,34). Cada sistema celular presenta características bien definidas y aporta un enfoque particular a la hora de abordar la toxicidad por fármacos. En la Tabla 2 se reflejan los modelos celulares más aplicados en la actualidad para el estudio de la hepatotoxicidad idiosincrática y aquellos considerados con mayor proyección en un futuro próximo.

Las líneas de hepatoma son muy utilizadas para el cribado de compuestos y, dentro de su limitación funcional, posibilitan el estudio de los mecanismos implicados en la toxicidad. Los hepatocitos constituyen un modelo más diferenciado y cercano al hígado, si bien su comportamiento funcional y sus aplicaciones dependen en gran medida de la modalidad de cultivo utilizada. Los hepatocitos en monocapa conservan niveles aceptables de enzimas de metabolización de fármacos y son muy apreciados en estudios dirigidos a profundizar en los mecanismos de toxicidad. Las mejoras en los protocolos de crioconservación han incrementado la disponibilidad de hepatocitos humanos y han contribuido a extender su uso para la evaluación rutinaria de la hepatotoxicidad de nuevos fármacos (33). En un intento por mejorar las funciones hepáticas durante periodos de cultivo más largos, se ha propuesto el cultivo de hepatocitos en configuración sándwich (entre dos capas de colágeno u otros componentes de la matriz extracelular). Los hepatocitos mantenidos en esta configuración restauran la

polaridad característica de los hepatocitos *in vivo*, restablecen el transporte funcional de fármacos y moléculas endógenas a través de las membranas basolateral y biliar, por lo que son considerados un sistema *in vitro* útil para el estudio de fármacos con efectos colestásicos y de alteración del transporte hepatobiliar (33). Los hepatocitos en formatos 3D, que recrean la organización espacial de las células en el hígado, facilitan el restablecimiento de los contactos célula-célula y el mantenimiento prolongado de funciones específicas. Diversos estudios apuntan que los hepatocitos en sistemas 3D ofrecen una mejor predicción de la toxicidad humana que los cultivos convencionales, posibilitan la realización de estudios de toxicidad crónica y pueden ser de gran valor para la propuesta de biomarcadores de hepatotoxicidad (34-36).

No existe un solo modelo *in vitro* capaz de reproducir y/o anticipar la hepatotoxicidad de cualquier fármaco y las predicciones de daño hepático se benefician del uso combinado de varios sistemas celulares. La dificultad aún es mayor a la hora de predecir las reacciones de naturaleza idiosincrática. Los hepatocitos y las líneas celulares de hepatoma, los modelos más utilizados en los ensayos de hepatotoxicidad, no satisfacen los requisitos experimentales para reproducir y controlar los factores que determinan la susceptibilidad individual en la hepatotoxicidad idiosincrática, por lo que se hace necesaria la disponibilidad de modelos celulares alternativos (34). Para alcanzar este desafío se han propuesto nuevas estrategias entre las que se incluyen la transfección de células con vectores adenovirales que codifican genes de enzimas de biotransformación para el estudio de la idiosincrasia metabólica, la generación de células con fenotipo hepático a partir de células pluripotentes inducidas (iPSC) de pacientes específicos y el co-cultivo de hepatocitos con células hepáticas no parenquimatosas (células Kupffer, estrelladas, endoteliales,...) para el estudio del papel de estas células en el daño hepatotóxico mediado por señales inflamatorias y por el sistema inmune (33-36). Estos modelos parecen alternativas prometedoras, si bien su utilidad real no ha sido suficientemente contrastada.

**Tabla 2. Modelos celulares de aplicación al estudio de hepatotoxicidad inducida por fármacos**

Modelo	Principales aplicaciones
Hepatocitos cultivados en monocapa.	Los hepatocitos primarios, y en concreto los de origen humano, son considerados como el modelo celular que reproduce mejor la fisiología y funcionalidad del hígado humano ( <i>gold standard</i> ). Se trata de un modelo muy utilizado para el cribado de compuestos hepatotóxicos, el estudio de mecanismos de toxicidad y de efectos de los fármacos sobre funciones hepáticas específicas, ensayos de unión covalente y de generación de metabolitos reactivos. También se aplican para el análisis del perfil metabólico de fármacos y de interacciones fármaco-fármaco.
Hepatocitos cultivados en <i>sándwich</i> (entre dos capas de colágeno u otros componentes de la matriz extracelular).	Este sistema de cultivo mejora la supervivencia de los hepatocitos en cultivo y la expresión de diversas funciones hepáticas, y entre ellas, el transporte de moléculas a través de las membranas del hepatocito. Este modelo celular es particularmente útil para estudiar el transporte hepatobiliar de fármacos, la hepatotoxicidad inducida por compuestos colestásicos y los efectos de fármacos sobre transportadores hepáticos clave (BSEP, NTCP).
Cultivos 3D organotípicos.	Los sistemas 3D de cultivo tratan de reproducir el entorno fisiológico y la organización celular del hígado in vivo. Los hepatocitos pueden ser cultivados durante periodos prolongados (varias semanas), lo que posibilita los estudios a largo plazo (toxicidad crónica). Los sistemas de co-cultivo permiten evaluar la toxicidad sobre diferentes tipos de células hepáticas y la contribución de células no parenquimatosas al daño hepatotóxico de naturaleza idiosincrásica (liberación de señales inflamatorias, papel de células Kupffer, etc.).
Líneas celulares de hepatoma (HepG2, HepaRG)s.	Su elevada disponibilidad, fácil manejo, bajo coste y estabilidad fenotípica convierten a estas células en las más utilizadas para los estudios <i>in vitro</i> de hepatotoxicidad durante el desarrollo de nuevos fármacos ( <i>screening</i> de largas series de compuestos). Su uso combinado con aproximaciones multiparamétricas (transcriptómicas, metabolómicas y HCS) ha permitido el desarrollo de ensayos para identificar/clasificar compuestos que inducen hepatotoxicidad a través de diferentes mecanismos.
Líneas celulares hepáticas manipuladas (expresión de enzimas CYP y de fase II).	Mediante el uso de vectores virales se obtienen células que expresan de forma estable o transitoria un enzima o varios enzimas implicados en la biotransformación de fármacos. Las aplicaciones potenciales de estas células son la identificación de los enzimas responsables del metabolismo de fármacos y de la generación de metabolitos reactivos, el cribado de moléculas bioactivables, el análisis del papel del metabolismo en la hepatotoxicidad idiosincrásica y la identificación de perfiles metabólicos con mayor riesgo de hepatotoxicidad.
Hepatocitos derivados de células iPSC (modelos personalizados).	Las células con fenotipo hepático ( <i>hepatocyte-like cells</i> ) diferenciadas a partir de células iPSC se presentan como una alternativa ideal para obtener "hepatocitos" <i>in vitro</i> con las características individuales (fenotipo) del donante del que han sido obtenidas. Su uso permitiría analizar el efecto de polimorfismos genéticos y otros factores individuales sobre el riesgo/susceptibilidad a determinados grupos de fármacos. Además la obtención de estas células a partir de individuos que han sufrido episodios de hepatotoxicidad permitiría estudiar sobre células del propio paciente los efectos del fármaco responsable del episodio tóxico.

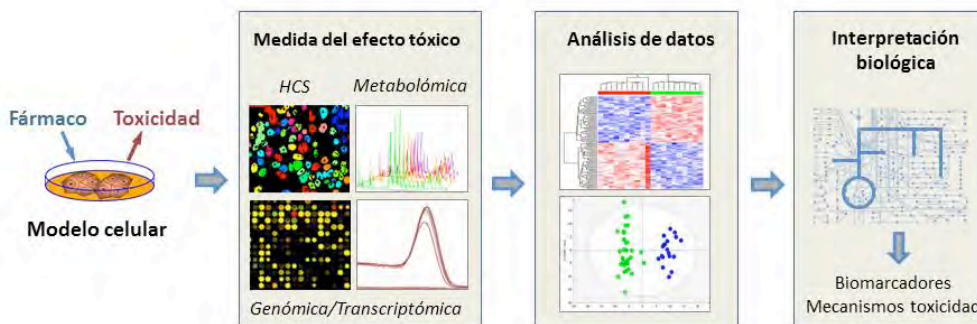
#### 4.2. Aproximaciones experimentales

Otro aspecto clave en las evaluaciones de toxicidad son los procedimientos o tests utilizados para identificar el daño inducido por el fármaco. Los ensayos citotoxicidad convencionales están basados en la medida de parámetros o marcadores individuales que informan sobre alteraciones

en el número de células, viabilidad, integridad de la membrana o depleción de moléculas críticas. Estos tests muestran una baja sensibilidad para identificar moléculas hepatotóxicas debido, entre otras razones, a que solo detectan eventos que ocurren en las últimas etapas de la citotoxicidad, cercanas a la muerte celular (5). La

alternativa son las estrategias multiparamétricas basadas en la medida simultánea de un conjunto amplio de marcadores que informan sobre alteraciones moleculares,

bioquímicas o funcionales, posibilitan la detección de alteraciones tempranas (pre-letales) y aportan una visión global de la toxicidad (Figura 4) (5,37).



**Figura 4. Aplicación de estrategias multi-paramétricas para el estudio de la hepatotoxicidad en modelos celulares.**

El desarrollo de plataformas “ómicas” ha reorientado la investigación en diferentes áreas del conocimiento, como es el caso de la toxicología. Las “ómicas” posibilitan el análisis masivo de cientos de biomoléculas (genes, proteínas, metabolitos), lo que nos permite disponer de un reflejo fiel de los distintos procesos que están ocurriendo en la célula a nivel molecular (38-40). En concreto la transcriptómica y la metabolómica, a través del análisis de los perfiles de expresión génica y de los perfiles metabólicos respectivamente, han recibido una gran acogida a la hora de evaluar los efectos tóxicos de los fármacos sobre células en cultivo (39,42).

La premisa que subyace en la aplicación de la transcriptómica al estudio de la toxicidad es que la homeostasis celular se altera tras un efecto adverso producido por un tóxico y la célula intenta restaurarla activando o inactivando la expresión de genes específicos. La huella transcriptómica resultante (alteraciones en niveles de mRNAs) puede ser descifrada y usada para identificar marcadores potenciales de hepatotoxicidad y definir cambios a nivel molecular característicos de cada uno de los mecanismos de toxicidad (41,43). Estos perfiles transcriptómicos pueden constituir una herramienta muy potente para predecir la toxicidad de un fármaco candidato e incluso clasificarlo en función de su mecanismo, basándose en el concepto de que mecanismos similares de toxicidad provocan cambios comparables en la expresión génica (39,43).

La metabolómica se basa en el análisis exhaustivo y cuantitativo de todos los metabolitos de bajo peso molecular (metaboloma) presentes en una muestra biológica. Esta disciplina completa la información mecanística aportada por otras “ómicas” y ofrece aspectos ventajosos al proporcionar una información más cercana sobre el estado funcional o metabólico de la célula en un momento determinado y, por tanto, refleja mejor los cambios fenotípicos (39,44). Los avances técnicos en las plataformas metabolómicas han posibilitado su expansión hacia diversos campos de investigación. El análisis de los

cambios en el metaboloma tras la exposición a un tóxico posibilita la identificación de huellas toxico-metabólicas, un mejor conocimiento de los mecanismos de toxicidad y la propuesta de nuevos biomarcadores (39). Si bien su aplicación a estudios de toxicidad en modelos celulares es incipiente, los resultados obtenidos son prometedores y sugieren que la toxicometabolómica puede llegar a convertirse en un futuro cercano en una herramienta muy potente para discriminar el potencial hepatotóxico de nuevos fármacos (39,42,45).

En la última década, los sistemas de rastreo de alto contenido (*high content screening*, HCS) han ganado una rápida aceptación en el campo de la toxicología *in vitro* como una tecnología con un enorme potencial para evaluar los efectos perjudiciales de fármacos y otros productos químicos (5,46,47). Los ensayos HCS, basados en la aplicación de la microscopía automatizada y el análisis de imágenes a células en cultivo, permiten la medición de una amplia gama parámetros a nivel celular. El uso combinado de varios marcadores fluorescentes posibilita el análisis paralelo de múltiples marcadores celulares y la detección cuantitativa y la monitorización cinética de alteraciones morfológicas, bioquímicas o funcionales inducidas por el fármaco (5,46). Al integrar los datos obtenidos de diferentes indicadores de función celular permiten distinguir no sólo efectos tardíos/irreversibles sino también cambios tempranos/reversibles, proporcionando un análisis más detallado de la toxicidad inducida por el compuesto y del mecanismo implicado (46-49).

## 5. APLICACIÓN DE MODELOS CELULARES PARA INVESTIGAR EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS

Los estudios preclínicos de seguridad son de aplicación obligatoria durante el desarrollo farmacéutico. Desde hace décadas los modelos basados en células hepáticas vienen siendo utilizados, junto con métodos tradicionales *in vivo*, para la selección de moléculas y la toma de decisiones durante las fases tempranas de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Durante este tiempo se han realizado



importantes avances con miras a mejorar la capacidad predictiva de los ensayos *in vitro* de hepatotoxicidad humana. En la presente sección se muestran ejemplos de la contribución de diferentes modelos *in vitro* a la hora de evaluar y anticipar el riesgo potencial de hepatotoxicidad de los fármacos, así como para ampliar el conocimiento de los mecanismos implicados en la toxicidad y ayudar a la comprensión de los factores que determinan la susceptibilidad individual.

### 5.1. Predicción del potencial hepatotóxico

Las líneas de hepatoma HepG2 y HepaRG y los hepatocitos humanos en cultivo primario son los modelos celulares más utilizados en la actualidad por la industria farmacéutica para evaluar hepatotoxicidad de nuevas moléculas (34). Su uso combinado con ensayos multiparamétricos ha permitido desarrollar herramientas muy potentes que cada vez tienen mayor aceptación en los estudios de seguridad de fármacos. Recientemente se han propuesto diferentes ensayos HCS que han mostrado gran especificidad y selectividad para identificar compuestos con capacidad de inducir daño hepático (5,47,50). La mayor parte de estos ensayos utilizan células HepG2 expuestas al compuesto a estudiar y sobre las que se analizan no sólo eventos de toxicidad tardía (viabilidad celular), sino también en otros parámetros indicativos de toxicidad temprana (generación de ROS, aumento de calcio intracelular, disfunción mitocondrial, cambios nucleares, etc). Las plataformas HCS automatizadas integran de forma rápida los datos obtenidos a partir de diferentes indicadores de función celular y pueden incorporarse fácilmente y con alto rendimiento en los procesos de cribado de compuestos, facilitando la identificación temprana de aquellos con potencial hepatotóxico y contribuyendo al desarrollo de fármacos más seguros (5,46). La metabolómica también se ha mostrado como una estrategia sensible y eficaz para evaluar efectos tóxicos sobre células en cultivo (42,45), aunque su elevada exigencia desde el punto de vista técnico supone una importante limitación para el cribado de largas series compuestas. No obstante la toxicometabolómica puede aplicarse de forma complementaria a otras plataformas, por ejemplo los ensayos HCS, para confirmar la toxicidad en moléculas seleccionadas y puede aportar información de gran valor en la propuesta de biomarcadores de hepatotoxicidad.

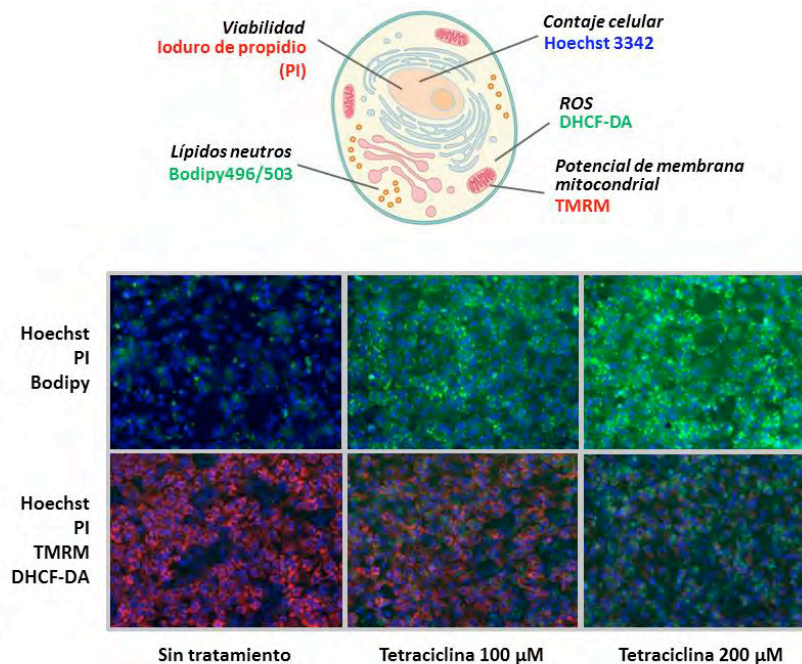
Las estrategias multiparamétricas basadas en el examen de una batería de marcadores pre-letales ofrecen la posibilidad de detectar cambios sutiles relacionados con la toxicidad con mayor sensibilidad que los ensayos de convencionales que detectan sólo citotoxicidad manifiesta (5,50). Ello hace posible detectar alteraciones inducidas a concentraciones más bajas del compuesto y, por tanto, más cercanas a los niveles del fármaco alcanzados en el plasma o el tejido hepático durante su administración terapéutica, lo que permite obtener información relevante desde el punto de vista clínico. El uso de bajas concentraciones

permite además el diseño de estudios de toxicidad a largo plazo con adiciones repetidas de los fármacos para imitar un régimen de dosificación crónica en la administración de fármacos (14). Un valor añadido de las evaluaciones multiplexadas es que no sólo se obtiene información sobre múltiples parámetros celulares, sino que también se pueden establecer relaciones entre diferentes parámetros medidos en la misma célula, lo que podría contribuir a interpretar mejor los cambios observados.

### 5.2. Clasificación de los mecanismos de hepatotoxicidad

Los ensayos generales de hepatotoxicidad permiten la identificación de compuestos capaces de inducir daño celular, independientemente del mecanismo implicado en su toxicidad. Con la finalidad de discriminar los compuestos que actúan a través de un mecanismo particular, se analizan diversos parámetros específicos que incluyen marcadores de daño a biomoléculas, alteraciones bioquímicas, alteración de la homeostasis celular, desregulación metabólica, alteración de actividades enzimáticas o de transporte y deterioro estructural o funcional de los componentes celulares (14). Este conocimiento mecanístico es relevante para mejorar la evaluación del balance eficacia/seguridad de los fármacos; sin embargo, los ensayos convencionales miden de forma individualizada un único parámetro, por lo que se requiere la aplicación de una batería de tests, lo que dificulta y entorpece la obtención de información (5).

Una estrategia útil para obtener una visión preliminar del mecanismo implicado en la hepatotoxicidad de un fármaco o grupo de fármacos es la evaluación combinada de múltiples parámetros, cada uno indicativo de un mecanismo concreto. Los ensayos HCS basados en la medida simultánea de parámetros que informan sobre alteraciones celulares clave (por ejemplo, apoptosis, estrés oxidativo, desregulación de la homeostasis del calcio, disfunción mitocondrial, etc.) son una buena alternativa. Una vez sugerido un mecanismo(s) particular(es), el análisis posterior de marcadores específicos ayuda a completar la información. Para ello, se han propuesto diferentes ensayos HCS dirigidos a examinar de forma específica los principales mecanismos implicados en la hepatotoxicidad: estrés oxidativo, toxicidad mitocondrial, genotoxicidad, esteatosis, colestasis, fosfolipidosis (ver revisión en 47). La información aportada por estos ensayos viene limitada por la necesidad de incubar las células con una mezcla de marcadores fluorescentes ópticamente compatibles. Mediante una adecuada selección de fluoróforos con longitudes de onda de absorción y emisión no superpuestas es posible diseñar baterías de colorantes (combinaciones de hasta cinco sondas fluorescentes) que informan de forma simultánea sobre un conjunto de alteraciones celulares relacionadas con el mecanismo estudiado (**Figura 5**) (48,49).



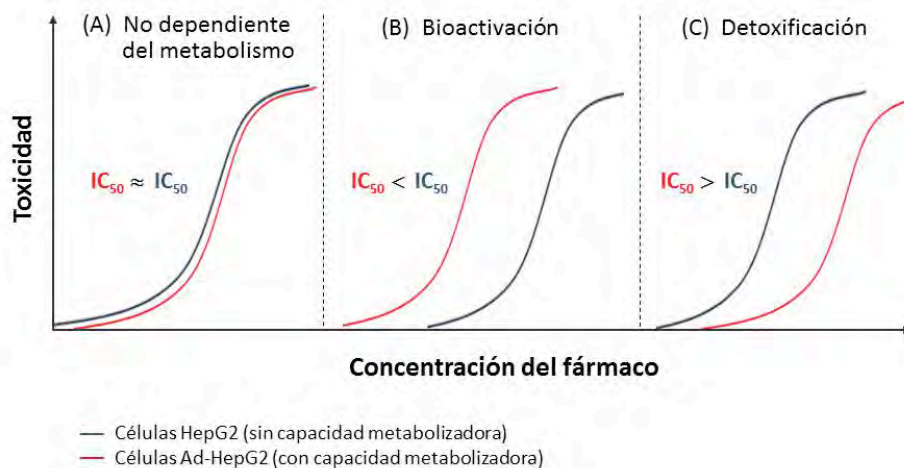
**Figura 5. Ensayo HCS de esteatosis inducida por fármacos.** El ensayo consiste en la utilización de células fluorescentes para medir los efectos de los fármacos sobre la acumulación intracelular de lípidos neutros (BODIPY 493/503), la formación de ROS (DCF), el potencial de membrana mitocondrial (TMRM) y la viabilidad celular. Los fluorocromos se pueden combinar atendiendo a su compatibilidad óptica. Las fotografías muestran las alteraciones observadas en células HepG2 tratadas durante 24 h con tetraciclina (fármaco con capacidad esteatótica). DHCF-DA, 2',7-Dihidro dicloro fluoresceína diacetato; TMRM, tetrametilrodamina metil éster).

Una de las ventajas del uso de enfoques holísticos, como es el caso de la metabolómica, es que aportan una instantánea más completa de la perturbación inducida por el fármaco (44). Los cambios en el metaboloma informan sobre la respuesta dinámica del metabolismo celular ante la agresión tóxica y ayudan a comprender el mecanismo subyacente (39). Es lógico pensar que las alteraciones metabólicas desencadenadas por un fármaco se pueden relacionar con el tipo de daño inducido y que diferentes mecanismos de toxicidad generan perfiles metabolómicos diferentes. Estudios recientes basados en la aplicación de aproximaciones metabolómicas UPLC/MS/MS a células HepG2 tratadas con compuestos modelo evidencian la capacidad de esta estrategia para el estudio de los mecanismos de hepatotoxicidad (42,45). Tras el análisis multivariante de los datos extraídos de los perfiles toxicometabolómicos se obtuvo un modelo predictivo que permitía no sólo discriminar entre fármacos no hepatotóxicos y hepatotóxicos, sino también clasificar

estos últimos según su principal mecanismo de toxicidad (estrés oxidativo, esteatosis, fosfolipidosis). Además, la posibilidad de identificar los metabolitos característicos/discriminantes de cada mecanismo es un excelente punto de partida para la propuesta de posibles biomarcadores diagnósticos.

### 5.3. Toxicidad de moléculas bioactivables

La influencia del metabolismo de un fármaco sobre su toxicidad se puede analizar fácilmente *in vitro* comparando sus efectos sobre células con o sin capacidad biotransformadora (**Figura 6**). Para el desarrollo de esta estrategia se han utilizado fundamentalmente dos modelos celulares: células THLE manipuladas para la expresión permanente de un enzima CYP o células HepG2 transfectadas con vectores adenovirales para la expresión transitoria de enzimas de biotransformación.



**Figura 6. Ensayo in vitro para estudiar la influencia del metabolismo sobre la hepatotoxicidad de fármacos.** El ensayo compara la toxicidad del fármaco en células HepG2 y en células Ad-HepG2 (modificadas con adenovirus para conferirles expresión de enzimas de metabolización de fármacos). Efectos similares del fármaco sobre ambos tipos de células indican que la toxicidad no depende del metabolismo del fármaco (A). Una toxicidad mayor sobre células Ad-HepG2 (efectos tóxicos a concentraciones más bajas del fármaco) sugiere que se trata de un fármaco bioactivable (B). La mayor sensibilidad de las células HepG2 indica que el metabolismo contribuye a la detoxificación (C).

Las células CYP-THLE han sido generadas mediante el uso de vectores virales que se integran en el genoma de la célula y permiten una sobreexpresión estable e individual de un único CYP. La evaluación de la toxicidad de un fármaco sobre una batería de células CYP-THLE (CYP1A2-THLE, CYP3A4-THLE, etc) y sobre las células parentales THLE (que no expresan CYPs) es posible estudiar la contribución del metabolismo mediado por cada uno de los CYPs (51). Sin embargo, una limitación importante de las células CYP-THLE es que muestran una expresión desequilibrada de los enzimas de biotransformación, con niveles altos del CYP sobreexpresado y presencia muy reducida o nula del resto de enzimas (otros CYPs y enzimas de conjugación). Esto es debido a que los procedimientos utilizados para la generación de estas células no permiten la expresión controlada del CYP de interés ni la introducción de varios transgenes, por lo que los niveles de actividad resultantes son con frecuencia muy diferentes a los de los hepatocitos humanos (52).

Como alternativa, se ha propuesto el uso de vectores adenovirales para la obtención de células HepG2 con capacidad metabólica adecuada para estudios de hepatotoxicidad (48,52). Los adenovirus recombinantes permiten la introducción eficaz y controlada de genes de interés en células hepáticas, si bien la expresión es transitoria y se debe realizar una nueva transfección para cada experimento. Una gran ventaja de esta estrategia es que se pueden generar con facilidad células que expresan simultáneamente varios enzimas y, además, es posible seleccionar el nivel de actividad enzimática que se desea obtener (33,53). Utilizando este procedimiento se han generado con éxito células AdvCYP-HepG2 que co-expresan los cinco CYPs más importantes en el metabolismo hepático de fármacos (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4) a niveles similares al

hepatocito humano (48). Este modelo de “hepatocito artificial”, llamado así por su semejanza metabólica con los hepatocitos humanos, se ha mostrado muy eficaz para discriminar entre fármacos bioactivables (más tóxicos en células AdvCYP-HepG2 que en células HepG2 no transfectadas) y no bioactivables (la misma toxicidad sobre ambos tipos celulares).

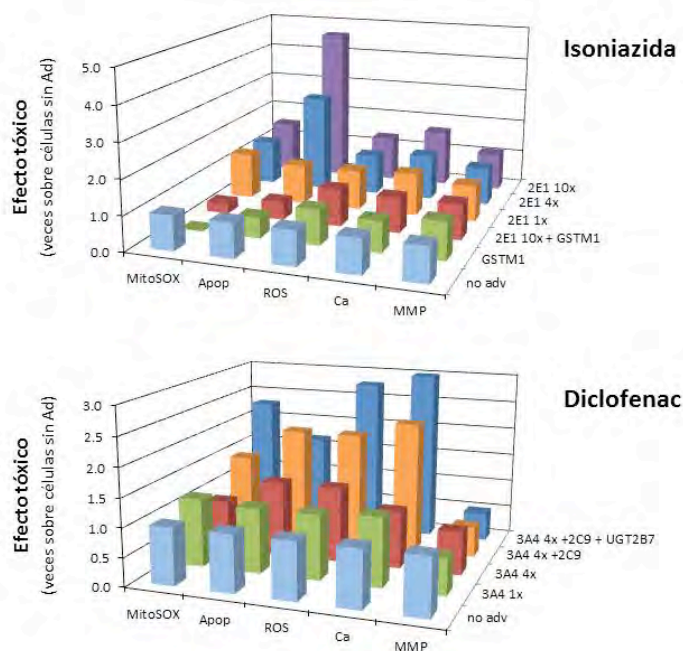
#### 5.4. Identificación de perfiles metabólicos con mayor riesgo de hepatotoxicidad

Dada la variabilidad interindividual en la expresión de enzimas hepáticas implicados en el metabolismo de fármacos, cada persona o grupo de población muestra una capacidad metabólica característica y, en consecuencia, una susceptibilidad potencialmente única a la hepatotoxicidad. Es razonable suponer que los individuos con un fenotipo metabólico que tiene como resultado un aumento en la generación de metabolitos reactivos a partir de un fármaco dado mostrarán un riesgo aumentado de hepatotoxicidad inducida por ese fármaco; mientras que aquellos pacientes con un metabolismo acelerado de inactivación serán menos sensibles al fármaco. La disponibilidad de estrategias *in vitro* capaces de imitar diferentes fenotipos metabólicos característicos del hígado humano sería de utilidad indudable para anticipar el daño tóxico asociado a la idiosincrasia metabólica y mejorar con ello la predicción de la hepatotoxicidad.

La transducción mediada por adenovirus es un procedimiento simple, versátil y altamente reproducible para obtener células que co-expresan los niveles deseados de varias enzimas (33,48,54). Por lo tanto, la estrategia basada en el uso de diferentes combinaciones de adenovirus abre la posibilidad de generar una variedad de células que reproducen fenotipos metabólicos individualizados de interés para estudios de hepatotoxicidad (53). El estudio comparativo de los efectos de un fármaco sobre una batería de células con

diferentes perfiles metabólicos permitiría realizar predicciones *in vitro* sobre su hepatotoxicidad potencial en grupos particulares de población (por ejemplo, metabolizadores rápidos o lentos). Se trata de una estrategia innovadora y, si bien hasta el momento sólo se ha explorado en un número muy reducido de compuestos modelo, los resultados obtenidos son prometedores (33,53,54). A modo de prueba de concepto la **figura 7** muestra los efectos de isoniazida y diclofenac, dos fármacos con hepatotoxicidad idiosincrática y metabolismo hepático conocido, en células HepG2 creadas

*ad-hoc* con niveles variables de enzimas de biotransformación, observándose que la toxicidad de cada fármaco varía en función del nivel de expresión y/o de la combinación de enzimas CYPs y de fase II presente en las células. La aplicación de estos modelos celulares de idiosincrasia metabólica es de particular interés para el estudio de la hepatotoxicidad de fármacos que son metabolizados de forma mayoritaria por enzimas que muestran gran variabilidad fenotípica en la población (por ejemplo, enzimas polimórficos o inducibles).



**Figura 7. Estudio del efecto del perfil metabólico de las células sobre la hepatotoxicidad de fármacos.** El uso de diferentes combinaciones de adenovirus permite generar células HepG2 que expresan los niveles deseados de uno o varios enzimas de metabolización de fármacos. La utilización de marcadores fluorescentes y la aplicación de ensayos de rastreo de alto contenido (high content screening, HCS) permite la evaluación multi-paramétrica de la toxicidad en células expuestas durante 24 h a los fármacos. La toxicidad de isoniazida es mayor sobre las células con los niveles más altos de actividad CYP2E1 (2E1 x10), mientras que dichos efectos son contrarrestados por el enzima GSTM1 (2E1 x10 + GSTM1). La toxicidad del diclofenac varía en función de la mezcla de adenovirus de CYP3A4, CYP2C9 y UGT2B7 utilizada para preparar las células, siendo más sensibles las células co-transfectadas con la combinación de los tres adenovirus (3A4 + 2C9+ UGT2B7). MitoSox, superóxido mitocondrial; Apop, apoptosis; ROS, especies reactivas del oxígeno; Ca, concentración intracelular de calcio; MMP, potencial de membrana mitocondrial.

### 5.5. Modelos personalizados

Como se ha señalado anteriormente, el metabolismo juega un papel importante en la hepatotoxicidad idiosincrática, pero no es el único responsable del resultado final. Las reacciones idiosincráticas se presentan como un fenómeno multifactorial y en su aparición influyen características individuales muy diversas tales como la edad, sexo, raza, dieta, hábitos de consumo, enfermedades, inflamación o respuesta del sistema inmune. A pesar de los intentos realizados hasta el momento, no existen modelos preclínicos que permitan analizar este conjunto tan amplio de factores y la posible contribución de cada uno de ellos en la aparición de hepatotoxicidad en determinados pacientes; no obstante, se han propuesto modelos *in vitro* que cubren de forma individual algunos de los aspectos implicados en estos

episodios de naturaleza idiosincrática (12,34). En esta dirección, algunos autores apuestan por modelos experimentales que permitan analizar el papel de los diferentes tipos de células presentes en el hígado (por ejemplo, co-cultivos 3D de hepatocitos con células no parenquimatosas) o la contribución de mediadores solubles de estrés inflamatorio (por ejemplo, adición de citoquinas pro-inflamatorias al medio de cultivo) (55,56). Estos modelos persiguen imitar las interacciones celulares heterotípicas y el entorno fisiológico del hígado para facilitar la investigación de los mecanismos que subyacen en la hepatotoxicidad. Sin embargo, algunas cuestiones como la comprensión del por qué un determinado fármaco sólo induce daño hepático en un grupo concreto de pacientes o la identificación de aquellos pacientes con mayor susceptibilidad a la hepatotoxicidad por un fármaco

en concreto permanecen por resolver.

Disponer de modelos personalizados que reflejen el comportamiento de los hepatocitos de un determinado paciente puede ser clave para entender el fenómeno de la hepatotoxicidad idiosincrásica y con ello desarrollar herramientas diagnósticas para confirmar la sospecha de hepatotoxicidad y la causalidad de forma específica e inequívoca. La obtención directa de hepatocitos del paciente no es posible por razones obvias. La alternativa sería generar células con fenotipo hepático (hepatocyte-like cells, HLC) a partir de células del paciente que pudieran ser obtenidas de una manera éticamente aceptable. Esto es posible a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las iPSCs se pueden generar a partir de células obtenidas por procedimientos mínimamente invasivos y se han desarrollado protocolos para su diferenciación a células que expresan marcadores y características funcionales típicas del hígado (57). Las HLC derivadas de iPSC están emergiendo como una fuente potencialmente estable de células con fenotipo hepático para el cribado de nuevas moléculas durante el desarrollo de fármacos (58,59). En concreto, las HLC obtenidas a partir de pacientes con polimorfismos genéticos singulares serían de gran valor en las predicciones de toxicidad de fármacos. Además, la posibilidad de disponer de HLC de individuos que han sufrido episodios de hepatotoxicidad idiosincrásica constituiría una oportunidad única para estudiar *in vitro* el episodio clínico acontecido en el paciente (58,60). No obstante, las expectativas que ofrece este modelo celular se ven limitadas en la actualidad por la necesidad de introducir mejoras sustanciales en los protocolos de diferenciación de las iPSC para aumentar la calidad funcional de las HLC obtenidas.

## 6. CONCLUSIONES

Los episodios de hepatotoxicidad idiosincrásica son de muy difícil predicción durante el desarrollo de nuevos medicamentos. Los modelos animales son claramente insuficientes al no ser capaces de reproducir los múltiples factores de susceptibilidad (genéticos y adquiridos) que determinan las reacciones idiosincrásicas en el hombre. Las células hepáticas de origen humano constituyen, a priori, una buena alternativa. Los hepatocitos primarios y las líneas de hepatoma HepG2 o HepaRG son los modelos celulares más utilizados por la industria farmacéutica para el cribado de la hepatotoxicidad intrínseca de nuevas moléculas. Sin embargo, su idoneidad es limitada cuando se trata de estudiar la hepatotoxicidad idiosincrásica debido, entre otras causas, a su inestabilidad fenotípica (hepatocitos) o a su carácter tumoral y baja expresión de enzimas del metabolismo de fármacos (líneas de hepatoma). Además, en ambos casos la respuesta a la acción tóxica del fármaco está condicionada por las características genéticas del donante del que fueron obtenidas las células, por lo que se muestran incapaces de predecir la toxicidad idiosincrásica en individuos susceptibles. Es por ello que en los últimos años se está realizando un esfuerzo innovador encaminado a la

consecución de modelos hepáticos de aplicación al estudio de la hepatotoxicidad idiosincrásica. De la mano de los recientes avances técnicos en biología molecular y celular, se han alcanzado logros importantes no sólo en la optimización de sistemas de cultivo que mejoren la capacidad predictiva de los modelos disponibles (hepatocitos, células de hepatoma), sino también en la generación de nuevos modelos que reflejen la idiosincrasia individual característica del hígado humano (modelos personalizados). Además, la aplicación de plataformas ómicas facilita el análisis de los cambios celulares relacionados con el daño tóxico por fármacos y posibilita el desarrollo de ensayos sensibles y específicos para la detección de la hepatotoxicidad. Las perspectivas son prometedoras y cabe esperar que, en un futuro próximo, se puedan formular estrategias *in vitro* capaces de anticipar moléculas con potencial para inducir hepatotoxicidad idiosincrásica e identificar pacientes potencialmente vulnerables y, en base a ello, contribuir al desarrollo de fármacos más seguros.

## 7. CONFLICTO DE INTERESES

La autora declara no tener conflicto de intereses.

## 8. AGRADECIMIENTOS

La autora agradece la financiación recibida por parte del Instituto de Salud Carlos III (Plan Estatal de I+D+I 2013-2016) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través de las ayudas PI13/00986 y PI16/00333.

## 9. REFERENCIAS

1. Andrade RJ, Robles M, Fernandez-Castañer A, *et al.* Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: A challenge for gastroenterologists. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 329-40.
2. Chen M, Vijay V, Shi Q, Liu Z, *et al.* FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury. *Drug Discov Today* 2011; 16: 697-703.
3. Fontana RJ. Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives. *Gastroenterology* 2014; 146: 914-28.
4. Olson H, Betton G, Robinson D, *et al.* Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 32: 56-67.
5. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, *et al.* High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *in vitro* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening *Arch Toxicol* 2006; 80: 580-604.
6. Siramshetty VB, Nickel J, Omieczynski C, *et al.* WITHDRAWN--a resource for withdrawn and discontinued drugs. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: D1080-6.
7. Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, *et al.* Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 950-66.



8. Thompson RA, Isin EM, Ogese MO, *et al.* Reactive Metabolites: Current and Emerging Risk and Hazard Assessments. *Chem Res Toxicol* 2016; 29: 505-33.
9. Shaw PJ, Ganey PE, Roth RA. Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2010; 118:7-18.
10. Yano A, Oda S, Fukami T, *et al.* Development of a cell-based assay system considering drug metabolism and immune- and inflammatory-related factors for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol Lett* 2014; 228: 13-24.
11. Roth RA, Ganey PE. Intrinsic versus idiosyncratic drug-induced hepatotoxicity--two villains or one? *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 692-7.
12. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Metabolic activation and drug-induced liver injury: in vitro approaches for the safety risk assessment of new drugs. *J Appl Toxicol* 2016; 36: 752-68.
13. Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 2005; 5: 325-61.
14. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Gombau L, *et al.* In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1963-77
15. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV, *et al.* Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 443-62.
16. Roth RA, Ganey PE. Animal models of idiosyncratic drug-induced liver injury--current status. *Crit Rev Toxicol* 2011; 41: 723-39
17. Uetrecht J. Idiosyncratic drug reactions: current understanding. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 513-39.
18. Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22: 335-53.
19. Boelsterli UA, Lim PL. Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 220: 92-107.
20. Han D, Dara L, Win S, *et al.* Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34: 243-53.
21. Lammert C, Bjornsson E, Niklasson A, *et al.* Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events. *Hepatology* 2010; 51: 615-20.
22. Kalgutkar AS, Soglia JR. Minimising the potential for metabolic activation in drug discovery. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005; 1: 91-142.
23. Srivastava A, Maggs JL, Antoine DJ, *et al.* Role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity. *Handb Exp Pharmacol* 2010; 196: 165-94.
24. Leung L, Kalgutkar AS, Obach RS. Metabolic activation in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev* 2012; 44: 18-33.
25. Stepan AF, Walker DP, Bauman J, *et al.* Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 1345-410.
26. Thompson RA, Isin EM, Li Y, *et al.* Risk assessment and mitigation strategies for reactive metabolites in drug discovery and development. *Chem Biol Interact* 2011; 192: 65-71.
27. Daly AK, Aithal GP, Leathart JB, *et al.* Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology* 2007; 132: 272-81.
28. Ariyoshi N, Iga Y, Hirata K, *et al.* Enhanced susceptibility of HLA-mediated ticlopidine-induced idiosyncratic hepatotoxicity by CYP2B6 polymorphism in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010; 25: 298-306.
29. Hawkins MT, Lewis JH. Latest advances in predicting DILI in human subjects: focus on biomarkers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012; 8: 1521-30.
30. Lucena MI, Andrade RJ, Martínez C, *et al.* Spanish Group for the Study of Drug-Induced Liver Disease. Glutathione S-transferase m1 and t1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology* 2008; 48: 588-96.
31. Lucena MI, García-Martín E, Andrade RJ, *et al.* Mitochondrial superoxide dismutase and glutathione peroxidase in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2010; 52: 303-12.
32. Andrade R. Hepatopatía inducida por fármacos. XIX Curso de Postgrado AGA-SEPD. Semana de las Enfermedades Digestivas, Bilbao, 2-5 Junio 2012; pp.52-7. Disponible en: ([https://www.sepd.es/pdf/SED2012-Curso %20AGA %20SEPD.pdf](https://www.sepd.es/pdf/SED2012-Curso%20AGA%20SEPD.pdf))
33. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, *et al.* Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 2013; 87: 1315-530.
34. Gomez-Lechon MJ, Tolosa L, Conde I, *et al.* Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014; 10: 1553-68.
35. Sarkar U, Rivera-Burgos D, Large EM, *et al.* Metabolite profiling and pharmacokinetic evaluation of hydrocortisone in a perfused three-dimensional human liver bioreactor. *Drug Metab Dispos* 2015; 43: 1091-9.



36. Ware BR, Berger DR, Khetani SR. Prediction of Drug-Induced Liver Injury in Micropatterned Co-cultures Containing iPSC-Derived Human Hepatocytes. *Toxicol Sci* 2015; 145: 252-62.
37. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Donato MT. High-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in cell models. *Arch Toxicol* 2015; 89:1007-22.
38. Chen M, Zhang M, Borlak J, *et al.* A decade of toxicogenomic research and its contribution to toxicological science. *Toxicol Sci* 2012;.130:217-28.
39. Wilmes A, Limonciel A, Aschauer L, *et al.* Application of integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling for the delineation of mechanisms of drug induced cell stress. *J Proteomics* 2013; 79: 180-94.
40. Cho YE, Moon PG, Baek MC. An integrated proteomic and transcriptomic approach to understanding azathioprine- induced hepatotoxicity in rat primary hepatocytes. *Electrophoresis* 2014; 35: 911-22.
41. Benet M, Moya M, Donato MT, *et al.* A simple transcriptomic signature able to predict drug-induced hepatic steatosis. *Arch Toxicol* 2014; 88: 967-82.
42. García-Cañaveras JC, Jiménez N, Gómez-Lechón MJ, *et al.* LC-MS untargeted metabolomic analysis of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Electrophoresis* 2015 Jun 1. doi: 10.1002/elps.201500095.
43. Donato MT, López-Riera M, Castell JV, *et al.* Both cholestatic and steatotic drugs trigger extensive alterations in the mRNA level of biliary transporters in rat hepatocytes: Application to develop new predictive biomarkers for early drug development. *Toxicol Lett* 2016; 263: 58-67.
44. León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, *et al.* Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis* 2013; 34: 2762-75.
45. García-Cañaveras JC, Castell JV, Donato MT, *et al.* A metabolomics cell-based approach for anticipating and investigating drug-induced liver injury. *Sci Rep* 2016; 6: 27239.
46. Giuliano KA, Gough AH, Taylor DL, *et al.* Early safety assessment using cellular systems biology yields insights into mechanisms of action. *J Biomol Screen* 2010; 15: 783-97.
47. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Donato MT. High-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in cell models. *Arch Toxicol* 2015; 89: 1007-22.
48. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Pérez-Cataldo G, *et al.* HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Arch Toxicol* 2013; 87: 1115-27.
49. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Jiménez N, *et al.* Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016; 302: 1-9.
50. Tolosa L, Pinto S, Donato MT, *et al.* Development of a multiparametric cell-based protocol to screen and classify the hepatotoxicity potential of drugs. *Toxicol Sci* 2012; 127: 187-98.
51. Gustafsson F, Foster AJ, Sarda S, *et al.* A correlation between the in vitro drug toxicity of drugs to cell lines that express human P450s and their propensity to cause liver injury in humans. *Toxicol Sci* 2014; 137: 189-211.
52. Donato MT, Jover R, Gómez-Lechón MJ. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr Drug Metab* 2013; 14: 946-68.
53. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Upgrading HepG2 cells with adenoviral vectors that encode drug-metabolizing enzymes: application for drug hepatotoxicity testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2017; 13: 137-48.
54. Kwon SJ, Lee DW, Shah DA, *et al.* High-throughput and combinatorial gene expression on a chip for metabolism-induced toxicology screening. *Nat Commun* 2014; 5: 3739.
55. Cosgrove BD, King BM, Hasan MA, *et al.* Synergistic drug-cytokine induction of hepatocellular death as an in vitro approach for the study of inflammation-associated idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 237: 317-30.
56. Kostadinova R, Boess F, Applegate D, *et al.* A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 268:1-16.
57. Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, *et al.* An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet* 2014; 29: 237-43.
58. Kia R, Sison RL, Heslop J, *et al.* Stem cell-derived hepatocytes as a predictive model for drug-induced liver injury: are we there yet? *Br J Clin Pharmacol* 2013; 75: 885-96.
59. Gao X, Liu Y. A transcriptomic study suggesting human iPSC-derived hepatocytes potentially offer a better in vitro model of hepatotoxicity than most hepatoma cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2017 Jan 31. doi: 10.1007/s10565-017-9383-z.
60. Medine CN, Lucendo-Villarin B, Storck C, *et al.* Developing high-fidelity hepatotoxicity models from pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2: 505-9.

# Esteatosis hepática y colestasis inducida por medicamentos: nuevos mecanismos y biomarcadores

**Title in English:** *Drug-induced hepatosteatosis and cholestasis: novel mechanisms and biomarkers*

Ramiro Jover Atienza

Departamento Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València. Unidad Mixta en Hepatología Experimental. IIS Hospital La Fe de Valencia

**ABSTRACT:** Liver steatosis and cholestasis are two of the most common manifestations of hepatotoxicity. Drug-induced steatosis may be included in the spectrum of conditions that comprise the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). This disease is very prevalent and a significant part of the patients progress towards steatohepatitis, which is a condition with poor prognosis. Drugs can contribute to a greater or lesser extent to NAFLD. However, none of the current diagnostic tools is able to predict if the fat accumulated in the liver has a metabolic or iatrogenic origin. Recent studies in our laboratory have shown that steatotic drugs have a very significant impact on the hepatocyte transcriptome, which in turn has allowed us to find alterations in the level of some microRNAs, which are specifically induced by drugs; thus opening the path to postulate biomarkers for drug-induced steatosis. These small RNAs may become, in the future, a non-invasive diagnostic method as they are excreted into the bloodstream, where they can be analyzed and quantified easily. Cholestatic drugs adversely affect the biliary flow through the liver, causing accumulation of bilirubin (yellow pigmentation of the skin) and bile salts, which are toxic at high concentrations. This phenomenon is quite common and appears in almost 50 % of the clinical manifestations of hepatotoxicity. However, cholestasis occurs only in a fraction of patients taking the causative agent. One possible explanation for drug-induced cholestasis would be the direct inhibition of hepatobiliary transporters by drugs and another possibility would be the presence of polymorphisms in transporter genes that associate with slower transport and increased susceptibility. However, these mechanisms are not able to explain neither the idiosyncrasy of the response nor the high interindividual variability in the levels of the hepatobiliary transporters. We have investigated other possible mechanisms and have found that cholestatic drugs alter the expression of many transporter genes, suggesting that these drugs also affect the enterohepatic bile flow by interfering with transcriptional regulatory mechanisms.

**RESUMEN:** La esteatosis hepática y la colestasis son dos de las manifestaciones más habituales de la hepatotoxicidad. La esteatosis iatrogénica podría incluirse en el espectro de condiciones que presenta la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Esta enfermedad es muy prevalente y una parte significativa de los pacientes evolucionarán hacia esteatohepatitis, que es una condición con mal pronóstico. Los fármacos pueden contribuir en mayor o menor medida a la EHGNA. Sin embargo, ningún método diagnóstico actual es capaz de predecir si la grasa acumulada en el hígado tiene un origen metabólico o iatrogénico. Estudios recientes de nuestro laboratorio han permitido comprobar que los fármacos esteatósicos tienen un impacto muy significativo en el transcriptoma del hepatocito, lo que a su vez nos ha permitido postular a algunos microRNAs como biomarcadores de esteatosis por medicamentos. Estos pequeños RNAs podrían ser, en un futuro, un método diagnóstico no invasivo ya que son excretados al torrente circulatorio, donde pueden ser analizados y cuantificados fácilmente. Los fármacos colestásicos afectan negativamente el flujo biliar a través del hígado, provocando la acumulación de bilirrubina (pigmentación amarilla de la piel) y de ácidos biliares, que a concentraciones elevadas son tóxicos. Este fenómeno es bastante habitual y aparece en casi el 50 % de los cuadros clínicos de hepatotoxicidad. Sin embargo, la colestasis sólo se presenta en una fracción de los pacientes que toman el agente causal. Un posible mecanismo de la colestasis por fármacos es la inhibición directa de los transportadores hepatobiliares por los medicamentos, y otro es la existencia de polimorfismos en los genes de estos transportadores, asociados con una peor función y una mayor susceptibilidad. Sin embargo, estos mecanismos no pueden explicar la idiosincrasia de la respuesta ni la gran variabilidad interindividual en los niveles de los transportadores hepatobiliares. Nosotros hemos investigado otras posibles vías y hemos encontrado que los fármacos colestásicos también alteran la expresión de muchos de los genes de estos transportadores, lo que sugiere una interferencia con los mecanismos reguladores transcripcionales.

**Corresponding Author:** ramiro.jover@uv.es

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 2 (2017), pp. 284-293

## 1. HEPATOESTEATOSIS INDUCIDA POR MEDICAMENTOS

### 1.1. Metabolismo lipídico en el hígado

El hígado es un órgano central en el metabolismo de

los lípidos. Durante el **período postprandial**, los hepatocitos absorben ácidos grasos (AG) principalmente por la hidrólisis de los triglicéridos (TG) de los quilomicrones. La lipoproteína lipasa, que hidroliza las lipoproteínas ricas en TG, se sintetiza principalmente en el

tejido muscular y adiposo, y se transporta a las células endoteliales de los capilares. La lipoproteína lipasa hidroliza grasas dietéticas empaquetadas en los quilomicrones, liberando así AG, de los cuales aproximadamente el 20 % se envían al hígado unidos a la albúmina. Este proceso resulta en la conversión de los quilomicrones en remanentes, que también son importados a los hepatocitos por receptores de remanentes, a través de la interacción con la ApoE. Durante los **períodos de ayuno**, los hepatocitos absorben AG libres no esterificados derivados de la lipólisis del tejido adiposo (1). Además, los hepatocitos tienen la capacidad de sintetizar AG a partir del exceso de glucosa (lipogénesis *de novo*). Los AG, obtenidos de diversas fuentes, se utilizan para muchos procesos celulares importantes, como la síntesis de membranas celulares y para vías de señalización intracelular. Además, los AG hepáticos pueden oxidarse para producir acetil-CoA, que puede a su vez oxidarse para generar NADH y ATP, o utilizarse para sintetizar cuerpos cetónicos. Los AG también pueden utilizarse para la síntesis de TG, que se almacenan en gotas lipídicas dentro de hepatocitos, o secretarse al torrente circulatorio como partículas VLDL, que suministran TG hepáticos al tejido adiposo para su almacenamiento y al músculo como fuente de energía.

En resumen, en el hígado se pueden utilizar AG derivados de tejidos periféricos o de la dieta, así como AG sintetizados endógenamente para: 1) la producción de energía y cuerpos cetónicos a través de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, 2) la esterificación en TG y almacenamiento en gotas lipídicas (esteatosis), y 3) la síntesis de TG y formación de VLDL, junto con la ApoB, para la secreción en la circulación (2). Además, el hígado desempeña un papel importante en el metabolismo de colesterol y fosfolípidos.

La regulación del metabolismo de los lípidos en el hígado es compleja y quedan aspectos por descifrar; su alteración puede contribuir al establecimiento y progresión de varias enfermedades hepáticas, como el hígado graso no alcohólico (EHGNA). Por ello, la identificación de los actores claves involucrados en la regulación del metabolismo lipídico en el hígado puede contribuir a una mejor comprensión de diversas hepatopatías, así como facilitar el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas.

### 1.2. La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)

La EHGNA es una causa muy común de hepatopatía crónica, que está alcanzando proporciones de epidemia en los países desarrollados, donde afecta aproximadamente a un 20-30 % de los adultos y a un número creciente de niños. La enfermedad comienza con una acumulación anormal de TG en el hígado (esteatosis), que en algunos individuos desencadena una respuesta inflamatoria y fibrosis (esteatohepatitis no alcohólica, EHNA) que puede

progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (3, 4).

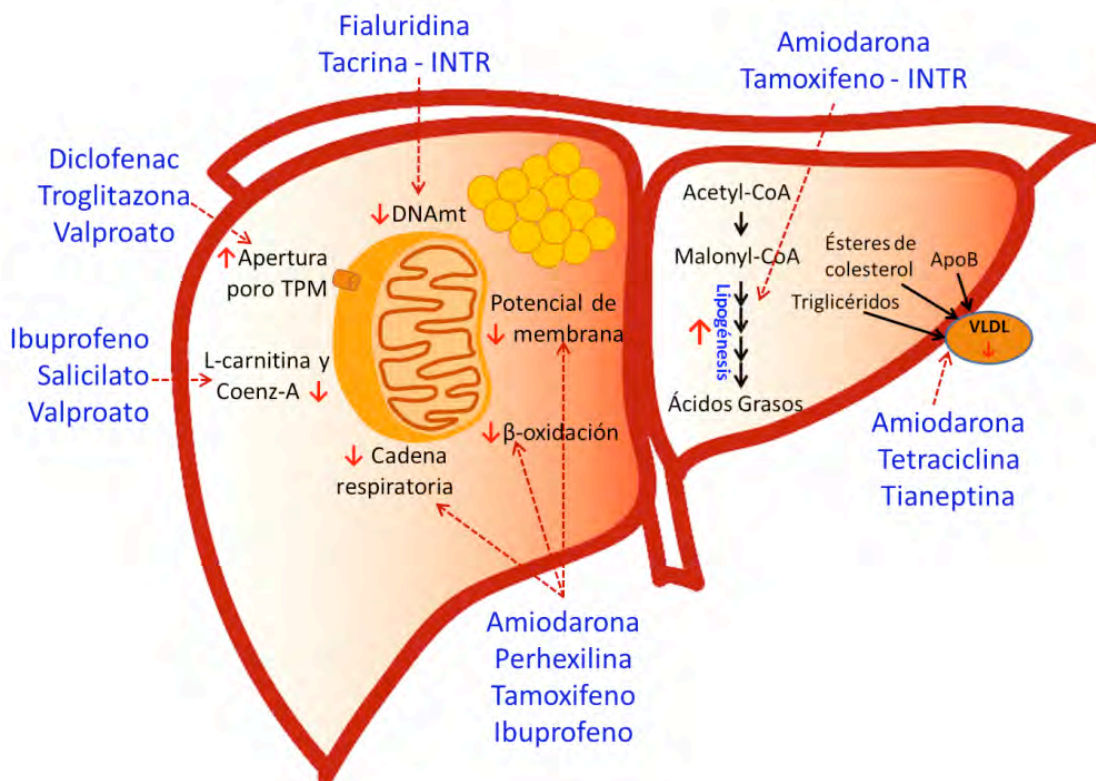
La principal asociación etiológica de la EHGNA es con el síndrome metabólico que está caracterizado por la coexistencia de varios factores de riesgo, incluyendo obesidad, resistencia a la insulina/diabetes mellitus tipo II, hiperglicemia, dislipidemia (TG  $\uparrow$ , HDL  $\downarrow$ ), e hipertensión arterial. La prevalencia de la EHGNA aumenta hasta el 70-90 % en estos pacientes, y también aumenta en paralelo el riesgo de fibrosis y cirrosis (5, 6). La EHGNA también se observa a menudo en los pacientes con hepatitis C crónica (hasta en un 50 %) (7) y en otras muchas y diversas patologías (disfunciones del intestino delgado, estados inflamatorios crónicos, metabolopatías etc.).

A nivel molecular, la esteatosis hepática no alcohólica y su progresión a esteatohepatitis son el resultado de una infinidad de mecanismos patogénicos (8). Por esta razón, los pacientes con EHGNA son un grupo heterogéneo en el que la progresión y la respuesta a la terapia son a menudo imprevisibles y variables; debido seguramente a las numerosas influencias ambientales (estilo de vida, enfermedad, fármacos, etc.) y sus interacciones con sutiles variaciones genéticas (9). La EHGNA más estudiada por su alta prevalencia es la EHGNA asociada al síndrome metabólico, que tiene sus orígenes en la sobrealimentación y la hipoactividad (3-6). Sin embargo, mucha menos atención se ha prestado a la EHGNA iatrogénica, que es causada, promovida o exacerbada por los medicamentos (8, 10).

### 1.3. EHGNA iatrogénica: mecanismos

Se estima que sólo un 2 % de los fármacos comercializados desempeñan un papel etiológico directo en la EHNA (10). Sin embargo, es probable que muchos otros fármacos puedan exacerbar o precipitar la esteatosis en presencia de determinados factores de riesgo y condiciones patológicas (11), como son las propias del síndrome metabólico.

Para muchos fármacos investigados, el mecanismo de esteatosis sugerido se ha relacionado con vías de metabolismo energético y orgánulos asociados. Diversos medicamentos han mostrado un marcado efecto negativo en la beta-oxidación mitocondrial de los AG, bien por la inhibición directa de enzimas específicas (12), o indirectamente por secuestrar cofactores de esta vía o por inhibir enzimas para el transporte de AG a la mitocondria (13). En general, los fármacos que afectan la cadena respiratoria, la apertura de poro de transición de permeabilidad o el potencial transmembrana causan disfunción mitocondrial e, indirectamente, inhibición de la beta-oxidación de los AG (14, 15). Otros medicamentos pueden aumentar la síntesis *de novo* de AG y la síntesis de TG. La inhibición de la actividad de la MTTP, una enzima clave en la formación y secreción de VLDLs, se ha propuesto también como un mecanismo para algunos medicamentos esteatósicos (16, 17) (**Figura 1**).



**Figura 1. Mecanismos implicados en el desarrollo de la esteatosis por medicamentos.** Los fármacos esteatóticos pueden inhibir la función mitocondrial y la síntesis y secreción de VLDLs; y activar las vías lipogénicas, conduciendo a la acumulación de grasa en el hígado. Otros mecanismos, no mostrados en la figura, implicarían la desregulación transcripcional y post-transcripcional (miRNAs) de genes del metabolismo lipídico. (INTR: inhibidores análogos de los nucleósidos de la transcriptasa reversa).

Con la llegada de las "-ómicas" se han desarrollado nuevas estrategias para investigar los mecanismos de toxicidad y proponer firmas y biomarcadores predictivos. En este sentido, varios estudios han investigado el efecto de fármacos esteatóticos bien caracterizados en el perfil de expresión génica en hígado de ratón (18-22). Sin embargo, cada uno de estos estudios se centró en un fármaco esteatótico particular y no determinó si los fármacos de este grupo tenían un efecto común (una biofirma). Lo que sí demostraron estos estudios fue que los fármacos esteatóticos (que supuestamente actúan por perturbación directa de rutas metabólicas o daño a la mitocondria) también fueron capaces de producir efectos muy llamativos en el transcriptoma (niveles de RNA) del hígado de ratón. De hecho, el número de RNAs alterado por estos fármacos esteatóticos fue muy elevado: 96 con tetraciclina (22), 414 con tamoxifeno (20), 908 con metotrexato (19) y 1910 / 1325 con valproato agudo / crónico (18, 21). El mecanismo molecular que subyace a estas profundas alteraciones en la expresión génica no se ha investigado. Podría ser un mecanismo causal desencadenado por los fármacos esteatóticos o una secuela secundaria, pero en cualquier caso es muy probable que la inhibición / activación de factores de transcripción y/o mecanismos epigenéticos (ej. microRNAs) sean una de las razones de esta marcada perturbación transcriptómica.

Nosotros hemos investigado estas hipótesis, incubando células hepáticas humanas con fármacos esteatóticos

modelo (tetraciclina, valproato, amiodarona y tianeptina) y con compuestos control no esteatóticos (amitriptilina, ketotifen y citrato). Hemos determinado la expresión de factores de transcripción (mRNA) y microRNAs implicados en metabolismo energético, y hemos comprobado con sorpresa que los compuestos esteatóticos causan una perturbación muy importante en los niveles de expresión de estos genes (23, 24). Estos resultados refuerzan la idea de que los compuestos esteatóticos alteran vías primarias de regulación génica y generan una huella característica en los perfiles transcriptómicos de mRNA y miRNA. El mecanismo subyacente a este proceso no ha sido investigado todavía. Su estudio permitiría descifrar nuevos mecanismos moleculares y nuevas aproximaciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas.

#### 1.4. Identificación de fármacos esteatóticos en investigación pre-clínica

La hepatotoxicidad (en general) y la esteatosis hepática (en particular) son una causa importante de fracaso en el desarrollo preclínico y clínico de medicamentos, y es la razón más citada de los "black box warnings" y de la retirada de fármacos aprobados (25). Por lo tanto, la detección de fármacos esteatóticos y el desarrollo de ensayos fiables que permita la identificación de estas moléculas son cuestiones clave en las primeras etapas de desarrollo farmacéutico.

Los ensayos *in vitro* que evalúan el potencial esteatósicos de nuevos medicamentos son limitados (17, 26). El ensayo predictivo *in vitro* más popular consiste en medir la acumulación de lípidos neutros en las células cultivadas. Las sondas fluorescentes como Rojo Nilo o Bodipy 493/503 son aproximaciones simples para identificar compuestos que inducen esteatosis (15, 27, 28). Sin embargo, no proporcionan información sobre el mecanismo. Además, su sensibilidad es baja y requiere el uso de plataformas tecnológicas difíciles de implementar en cribados de alto rendimiento, como la citometría de flujo o la microscopía y el análisis de imagen. Tampoco son métodos extrapolables a la práctica clínica.

Nuestros resultados en células hepáticas humanas en cultivo (23, 24) y los estudios publicados con modelos animales (18-22) indican que los fármacos esteatósicos alteran vías de regulación transcripcional singulares y generan una huella característica en el perfil de muchos genes que podría tener utilidad para entender mejor su mecanismo patogénico y para prevenir o detectar nuevos compuestos o fármacos con este potencial. En este sentido, hemos propuesto un ensayo, basado en la medida de los niveles de mRNA de 3 de estos genes (FOXA1, SREBP1c y HEX), que tiene una elevada sensibilidad y especificidad para detectar fármacos esteatósicos (23). Este ensayo podría utilizarse como método de cribado rápido y de alto rendimiento en la investigación preclínica de medicamentos, ya que tiene la ventaja de ser más sensible que los ensayos basados en parámetros bioquímicos o morfológicos y, desde el punto de vista técnico, es más fácil de implementar.

### *1.5. Diagnóstico de esteatosis iatrogénica en la práctica clínica*

La lesión inducida por medicamentos se considera un evento poco frecuente, pero está probablemente subestimada debido a la falta de sistemas de vigilancia y sistemas fiables de reconocimiento y diagnóstico. De hecho, la extrapolación a partir de registros prospectivos bien elaborados indica que los casos reales son 16 veces superiores a los detectados, y que la lesión inducida por medicamentos es probablemente una causa común de insuficiencia hepática aguda grave y potencialmente fatal (~44,000 casos anuales de hepatotoxicidad en EEUU que causan al menos 2700 muertes) (29).

Los enfermos con síndrome metabólico, generalmente crónicos y de edad avanzada, son más susceptibles a las reacciones adversas debido a las terapias combinadas, las altas dosis y los largos períodos de administración. Son particularmente preocupantes las terapias combinadas agresivas para disminuir los riesgos asociados con este síndrome. Por ejemplo, estatinas, niacina y fibratos, para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, junto con tiazolidinedionas, para la diabetes, y tiazidas y bloqueadores del sistema renina-angiotensina, para el control de la presión arterial (30, 31).

¿Cuál es la contribución de estos cócteles farmacológicos a la esteatosis hepática de estos pacientes?

La posibilidad de que estas combinaciones de fármacos contribuyan al hígado graso en pacientes con síndrome metabólico no ha sido valorada todavía. Sin embargo, estudios previos sugieren que muchos de estos fármacos pueden causar daño directo en el hígado. Encontramos, por ejemplo, casos de hepatotoxicidad y/o esteatosis causada por hipolipemiantes (32, 33), medicamentos para la obesidad (34), antidiabéticos orales (35, 36), antihipertensivos (37), etc. Estas consideraciones permiten postular que la combinación de estos fármacos en pacientes con propensión a la esteatosis puede contribuir a dicha esteatosis, y promover la lesión hepática y el avance de la EHGNA. Sin embargo, no existe ningún método diagnóstico en la práctica clínica habitual para identificar la EHGNA específica por medicamentos. Por ello, el desarrollo de un método que permita identificar la esteatosis iatrogénica en pacientes con síndrome metabólico permitiría, en los pacientes identificados, el uso de terapias combinadas más racionales y la prescripción de fármacos alternativos que no potencien su condición patológica.

El diagnóstico de esteatosis iatrogénica mediante una huella basada en niveles de mRNAs intracelulares requeriría tejido hepático y, por lo tanto, no sería un procedimiento recomendado para pacientes. Para abordar este método diagnóstico serían necesarios marcadores liberados al torrente circulatorio. Nuestros resultados demuestran que los medicamentos esteatósicos alteran múltiples factores de transcripción en los hepatocitos y estos han de afectar, a su vez, a la expresión de múltiples genes diana; entre ellos: 1) genes codificantes de enzimas del metabolismo energético del hepatocito; y 2) genes de RNAs no codificantes, como los miRNAs, de los que algunos serán exportados al torrente circulatorio, donde podrán ser identificados como una huella mirnómica (de miRNAs).

Los miRNAs circulantes son relativamente estables y tienen un gran potencial como biomarcadores de enfermedad. La evidencia sugiere que los miRNAs se exportan selectivamente por múltiples tipos celulares (incluido el hígado (38)) con distintas firmas que se han encontrado alteradas en muchas patofisiologías. Los miRNAs circulantes son transportados en vesículas derivadas de membrana (exosomas y micropartículas), en lipoproteínas y en complejos con otras proteínas, como Argo2 (39-41). Nuestros resultados recientes apoyan el uso de miRNAs como biomarcadores no invasivos de esteatosis por fármacos. En primer lugar, hemos detectado que los fármacos esteatósicos modelo inducen selectivamente varios miRNAs en cultivos de hepatocitos. Además, algunos de estos miRNAs se detectaron fácilmente en el torrente circulatorio (24). Por otra parte hemos demostrado que varios de los fármacos de uso común en los enfermos con EHGNA (ej: irbesartan, metformina, fenofibrato, omeprazol) son capaces de inducir estos mismos miRNAs y de inducir la esteatosis en cultivos celulares. Esto nos indicaría que una parte de la acumulación grasa en los enfermos con EHGNA está

promovida por los fármacos que toman. Como prueba de que esta posibilidad es real, hemos medido miRNA séricos en enfermos que se medican con fibratos y hemos comprobado que estos miRNAs biomarcadores están aumentados y que el nivel de esteatosis en la biopsia hepática es superior que el observado en los enfermos que no toman fibratos (24). Demostramos así, por primera vez, que determinados miRNAs pueden servir para un diagnóstico diferencial (no invasivo) de la esteatosis iatrogénica.

## 2. COLESTASIS INDUCIDA POR MEDICAMENTOS

### 2.1. ¿Qué es la colestasis?

La colestasis se define como la reducción o el bloqueo del flujo biliar normal como consecuencia de una alteración del transporte y/o excreción de la bilis impidiendo, total o parcialmente, su llegada al duodeno. Es un síndrome clínico y bioquímico caracterizado por niveles elevados de ácidos biliares (AB) y bilirrubina en sangre, ictericia, prurito y elevación sérica de enzimas hepáticas, en particular la fosfatasa alcalina (ALP). Si el origen de la colestasis radica en el hepatocito o en el árbol biliar del interior del parénquima hepático, la colestasis recibe el nombre de intrahepática; por el contrario, si la obstrucción se encuentra en las vías biliares externas del hígado recibe el nombre de extrahepática. Por su aparición y mantenimiento en el tiempo, la colestasis también se clasifica en aguda y crónica. La ictericia constituye el signo clínico más evidente de las colestasis, consecuencia de la acumulación de bilirrubina en el organismo, lo que confiere a la piel y a las mucosas una coloración amarillenta característica.

### 2.2. Colestasis iatrogénica por fármacos

El hígado es un órgano potencialmente vulnerable a los fármacos debido a su ubicación anatómica y a la elevada expresión de transportadores que facilitan la acumulación de medicamentos en los hepatocitos. La lesión hepática inducida por fármacos (*Drug Induced Liver Injury*, DILI) es la causa más común de insuficiencia o fallo hepático agudo (42), así como de mortalidad causada por medicamentos. Además, es una de las principales razones de interrupción en el desarrollo de nuevos fármacos. En la praxis clínica se utilizan criterios de consenso basados en parámetros analíticos (ALT y ALP séricas elevadas y la relación entre ambas) para clasificar la hepatotoxicidad en hepatocelular ( $ALT/ALP \geq 5$ ), colestásica ( $ALT/ALP \leq 2$ ) y mixta ( $2 < ALT/ALP < 5$ ) (43).

El primer estudio poblacional sobre la incidencia de DILI se llevó a cabo en Francia y reveló una incidencia de 14 casos por cada 100.000 habitantes por año (43). Dentro de los episodios de DILI la prevalencia de la colestasis es bastante elevada y oscila entre el 15 y el 50 %: En el estudio francés se encontró un patrón colestásico (puro o mixto) en el 33 % de los casos de DILI (43). De los 784 casos examinados por el comité asesor de DILI sueco entre 1970 y 2004, casi el 50 % tuvieron hepatotoxicidad

colestásica o mixta (44). La colestasis aguda supuso aproximadamente el 16 % de los 1100 casos de DILI evaluados en un estudio danés entre 1978 y 1987 (45). En los Estados Unidos, los medicamentos fueron responsables de aproximadamente el 20 % de los casos de ictericia en la población anciana (46). En el registro de hepatotoxicidad español se anotaron 650 casos de DILI ente 1994 y 2007, de los que entre el 48 % (hombres) y el 43 % (mujeres) se clasificaron como hepatitis colestásica o mixta (47). Pese a la importancia de las cifras, se cree que los casos registrados podrían ser sólo una pequeña fracción de todas las colestasis por fármacos, debido a su difícil diagnóstico, basado tan sólo en la sospecha de un agente causal (fármaco) y en una elevación de enzimas hepáticas. Por ello, es posible que el número real de casos y los costes socio sanitarios asociados superen lo estimado para esta patología (48).

La colestasis iatrogénica es una respuesta idiosincrásica que afecta a una fracción de los pacientes que toman el medicamento causal (49), y cuyos mecanismos subyacentes son con mucha frecuencia desconocidos. En muchos pacientes la recuperación es razonablemente rápida tras la interrupción de la administración de la medicación sospechosa. Sin embargo, en otros, la resolución es notablemente más lenta, adquiriendo tintes de colestasis crónica (50). En un estudio reciente de seguimiento de DILI se observó que en pacientes en los que los parámetros bioquímicos persistían elevados tras 12 meses, la colestasis iatrogénica era la manifestación predominante (51). Estos casos crónicos vienen acompañados de sintomatología más invalidante para el paciente (prurito difícil de tratar), requiriendo tratamiento con MARS (*Molecular Adsorbent Recirculating System*) y teniendo más probabilidad de evolucionar a enfermedad hepática crónica (52, 53). Sorprendentemente, la base molecular de esta cronicidad es desconocida y quedan muchas cuestiones por resolver: ¿Se acumula el fármaco en el organismo por un bloqueo en su eliminación? ¿Es por una alteración severa de los mecanismos reguladores, que no se resuelven tras la retirada del fármaco? ¿Es por la activación de una respuesta inflamatoria, inducida por altos niveles de AB, que se auto-perpetúa? (54, 55).

También es importante destacar que no existen marcadores específicos para predecir o anticipar el tipo de respuesta colestásica y su severidad. La medida de las concentraciones séricas de AB podría aportar mucho al diagnóstico y pronóstico de estos pacientes. Actualmente, la ictericia es posiblemente el único factor pronóstico de gravedad para los casos de DILI ya que se asocia con una mayor tasa de mortalidad o necesidad de trasplante de hígado (Ley de Hy:  $ALT > 3 \text{ ULN} + \text{bilirrubina} > 2 \text{ ULN}$ ) (56). Esta tasa oscila entre el 9 % y el 12 % según tres estudios de grandes series de pacientes en los Estados Unidos, España y Suecia (57-59). El pronóstico es mejor para el DILI colestásico, en comparación con el hepatocelular, en base a los datos de España y Suecia, pero ocurre lo contrario en los registros de los Estados Unidos.



Además de fármacos, hay otros compuestos y remedios herbales que también pueden desencadenar una colestasis iatrogénica. El uso ilícito de esteroides anabolizantes es una causa creciente de DILI con colestasis que puede conducir a lesión hepática y renal grave. Estos pacientes presentan un fenotipo distinto caracterizado por elevaciones considerables y muy persistentes de bilirrubina conjugada en suero (60).

La lesión o daño hepatocelular que en ocasiones también se produce en el transcurso de la colestasis iatrogénica puede deberse a los fármacos (y/o sus metabolitos), a los propios AB, o por una combinación de ambos. Los AB pueden ser citotóxicos cuando alcanzan altas concentraciones en los hepatocitos. Su toxicidad está directamente relacionada con su hidrofobicidad, y sigue el siguiente orden: LCA > CDCA, DCA > CA > UDCA (61). En condiciones normales, la concentración de los AB libres en el citosol es baja debido su unión a proteínas citosólicas. Sin embargo, si las concentraciones de AB exceden la capacidad de unión, puede aparecer daño mitocondrial y en última instancia apoptosis o necrosis hepatocelular (62) o del ducto biliar (63). Un razonamiento similar puede aplicarse a los fármacos causantes del DILI. Su excreción biliar puede verse disminuida, pudiendo acumularse en el citosol y causar citotoxicidad por mecanismos hepatotóxicos clásicos.

### 2.3. Transportadores biliares

Para entender los mecanismos implicados en la colestasis iatrogénica es importante comprender primero los principios del flujo biliar que está fundamentalmente mediado por los transportadores del sistema enterohepático.

La síntesis de AB a partir de colesterol se realiza en los hepatocitos e implica a más de 15 enzimas, entre los que destaca la colesterol-7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1), enzima limitante de la ruta biosintética mayoritaria. Los AB primarios en humanos son el cólico (CA) y el chenodesoxicólico (CDCA), que en el intestino son transformados por la microbiota en los AB secundarios desoxicólico (DCA) y litocólico (LCA). Más del 95 % de los AB se conjugan en el hígado con glicina y taurina, aunque en determinadas circunstancias también pueden ser sulfatados o glucoronidados. Los AB conjugados son más hidrosolubles, menos tóxicos, y más fácilmente excretados por heces y orina (64).

Los AB son transportados desde el sinusoides hacia el canalículo biliar de un modo vectorial por los transportadores de la membrana basolateral/sinusoidal (fundamentalmente NTCP y OATPs) y los de la membrana canalicular (BSEP y MRP2). En esta membrana también encontramos el transportador MDR3/4 que es crítico para el transporte de fosfolípidos y el ABCG5/8, responsable del transporte del colesterol biliar. Los hepatocitos también pueden bombear AB por la membrana basolateral para devolverlos al torrente circulatorio, una actividad mediada por MRP3, MRP4 y OSTa/b. Las enzimas implicadas en el metabolismo de los AB son las de conjugación con glicina

y taurina (BAAT), con sulfato (SULT2A1) o con ácido glucurónico (UGT2B4 y otras UGTs). Además para evitar su toxicidad y aumentar su solubilidad pueden ser hidroxilados por distintos CYPs como los CYP3As y CYP2Bs. En el epitelio intestinal destaca la presencia del transportador ASBT que es crucial para la recaptación de los AB y su flujo enterohepático. Aquí se reabsorben y se devuelven a la circulación portal hacia el hígado un 95 % de los AB que llegan desde la vesícula biliar. Sólo el 5 % se excretan por las heces (64).

La bilirrubina, el pigmento de degradación del hemo, es transportada por el torrente circulatorio unida a la albúmina hasta los hepatocitos. La captación, a través de la membrana basolateral, podría ser por difusión pasiva y/o facilitada por transportadores OATP1Bs. En el retículo endoplasmático, es conjugada por la UGT1A1 con ácido glucurónico y finalmente es excretada al canalículo por el transportador MRP2 y también, en menor medida, por ABCG2/BCRP1 (65).

Los AB no sólo tienen importantes propiedades en la función digestiva para la absorción de las grasas y las vitaminas liposolubles en el intestino. Recientemente se ha descubierto su papel como moléculas señalizadoras, capaces de regular múltiples procesos metabólicos e inflamatorios, entre otros, y se están desarrollando diversos fármacos, derivados de AB, para enfermedades hepáticas como la EHNA, la cirrosis biliar primaria (CBP) y la fibrosis. Por ello es importante también tener en cuenta la regulación del metabolismo y transporte de AB ya que su alteración puede tener múltiples efectos negativos. En la regulación de estos procesos participan numerosos receptores nucleares, muchos de ellos capaces de unirse y activarse por AB como FXR, PXR y VDR. También están implicados CAR, SHP, LRH1, HNF4a, LXRA, PPARs, etc. Además, hay otros reguladores importantes de otras familias como TGR5 y FGF15/19 (66).

A diferencia de las colestasis asociadas a la CBP o a la colangitis esclerosante, donde los mecanismos subyacentes están bien caracterizados, en la colestasis inducida por fármacos los aspectos mecanísticos y causales apenas son conocidos.

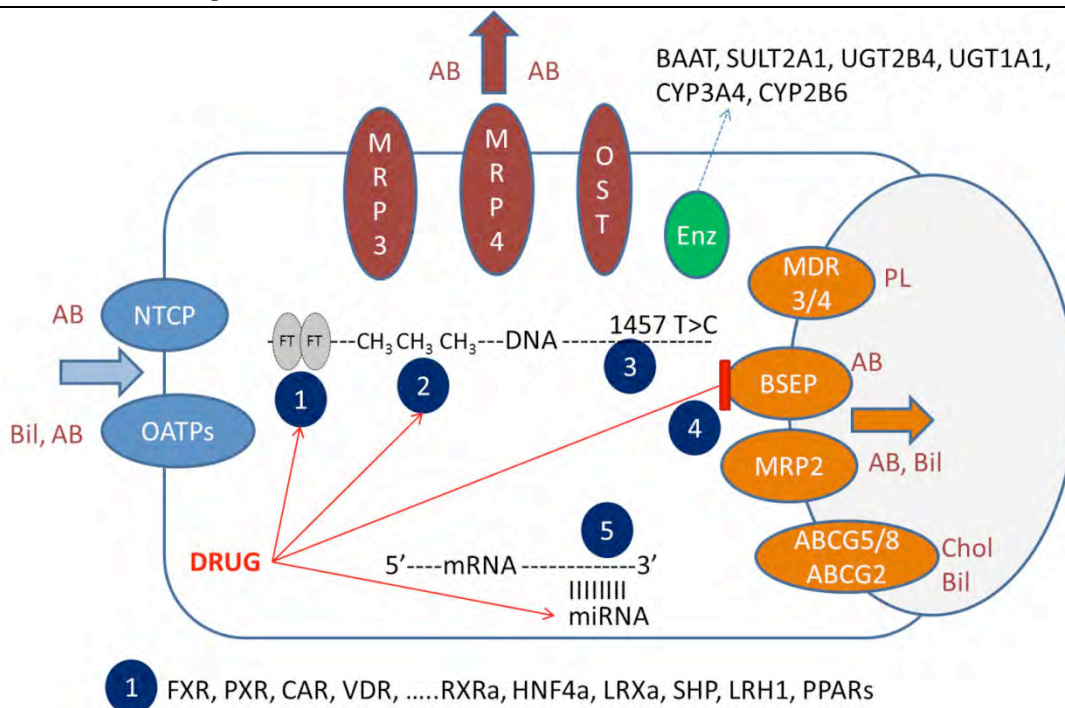
### 2.4. Mecanismos moleculares en la colestasis por medicamentos

Diversos estudios han asociado la inhibición directa de transportadores canaliculares como BSEP o variantes polimórficas de los mismos, con la colestasis inducida por fármacos. Se sabe, por ejemplo, que muchos medicamentos pueden inhibir directamente a BSEP en sistemas *in vitro* (vesículas de membranas de células Sf9 con BSEP expresado por baculovirus) (67). Pero si este mecanismo de inhibición directa fuera determinante en humanos, ¿por qué no ocurre en todos los pacientes? Hay necesariamente que pensar en diferencias interindividuales que hagan susceptibles sólo a una parte de la población. Y así, por ejemplo, existe un polimorfismo de BSEP, 1331T>C, que constituye un factor de riesgo potencial

(68). Sin embargo, este alelo tiene una frecuencia alrededor del 50 %, lo que no se corresponde con la baja frecuencia del DILI colestásico. Además, otros estudios no han encontrado asociaciones entre esta variante polimórfica y el DILI colestásico (69, 70). Por último, el análisis de un pequeño banco de hígados reveló una gran variabilidad interindividual en la expresión de BSEP (19 veces en mRNA y 31 veces en proteína) (71), que no se puede explicar sólo por las variantes polimórficas (68). Estos resultados concuerdan con datos preliminares de nuestro laboratorio, en un cohorte mayor de pacientes, que muestran variaciones en el nivel de mRNA de BSEP de hasta 100 veces. Sin embargo, quedan bastantes cuestiones por resolver: ¿Cuáles son los transportadores más variables en la población? ¿existen individuos con fenotipos de riesgo?

Las evidencias existentes hasta ahora sugieren que las variantes alélicas de los transportadores no puede explicar por sí mismas la idiosincrasia de la colestasis por fármacos, por lo que es muy probable que existan mecanismos reguladores y epigenéticos adicionales que contribuyan de forma más importante a esta variabilidad.

En este sentido, hay que señalar que nuestro grupo ha demostrado, en hepatocitos de rata en sándwich de colágeno, que la mayoría de fármacos colestásicos afectan muy significativamente la expresión (mRNA) de los transportadores de AB (NTCP, BSEP, OATP1A1, MRP2) (72). De nuevo, los mecanismos subyacentes son desconocidos, pero ciertamente, en esas condiciones experimentales, las variantes alélicas o la inhibición directa de los transportadores no serían mecanismos plausibles. Antes bien, sería más lógico pensar que los fármacos colestásicos pueden alterar la regulación transcripcional y/o epigenética de los transportadores. Los mecanismos reguladores también podrían explicar la variabilidad interindividual y la respuesta idiosincrásica. Esta hipótesis no se ha explorado nunca en relación con la colestasis iatrogénica. La alteración de la expresión de los transportadores inducida por fármacos podría tener su origen en a) la represión/inhibición de factores de transcripción activadores, b) la inducción de microRNAs inhibidores, o c) la alteración de la metilación de los genes implicados (**Figura 2**).



**Figura 2. Mecanismos implicados en la colestasis por medicamentos.** 1) Alteración de la actividad de los factores de transcripción encargados de la regulación de los genes de transporte y metabolismo de la bilis. 2) Alteraciones epigenéticas mediadas por los fármacos en la metilación del DNA y en la condensación de la cromatina. 3) Polimorfismos genéticos (variabilidad y susceptibilidad). 4) Inhibición directa de los transportadores por los medicamentos colestásicos. 5) Inducción/represión de microRNAs que regulan la expresión (mRNA → Prot) de los genes de transporte y metabolismo de la bilis.

2.5. ¿Hay tratamiento para la colestasis por fármacos?

En la actualidad no existe un consenso para el tratamiento clínico de los pacientes con colestasis iatrogénica. El UDCA (ácido ursodesoxicólico) es un AB altamente soluble y no tóxico, que ha sido aprobado para uso terapéutico para la disolución de cálculos biliares y para el tratamiento paliativo de la CBP. El UDCA parece

reducir la citotoxicidad del conjunto de los AB, protege a los colangiocitos, estimula la secreción hepatobiliar, tiene actividad antioxidante e inhibe la apoptosis de los hepatocitos (61). El UDCA también podría activar al PXR e inducir la expresión de sus genes diana, CYP3A4, SULTs, UGTs, BSEP, MDR3 y MRP4, facilitando la detoxificación de los AB (73). El ácido norursodesoxicólico (norUDCA) es un homólogo del UDCA

que no puede ser conjugado, se secreta en la bilis, se reabsorbe por los colangiocitos y vuelve al hígado. Esta circulación cole-hepática conduce a un aumento de bicarbonato en la bilis e induce hipercolelisis. De este modo, el norUDCA revierte la colangitis esclerosante en el modelo Mdr2<sup>-/-</sup> (ABCB4) de colangiopatía (73). Por último, el ácido obeticolico (OCA, 6ethyl-CDCA o INT-747) es un agonista potente y selectivo del FXR (74). En estudios con animales, el OCA aumenta la sensibilidad a la insulina, inhibe la gluconeogénesis, inhibe la lipogénesis, y también tiene propiedades anti-inflamatorias y anti-fibróticas (74). En estudios clínicos de pacientes con CBP, el OCA redujo significativamente la ALP. Sin embargo, la mayoría de los pacientes desarrollaron prurito, un síntoma común de la colestasis y un efecto secundario habitual en las terapias con AB (73).

### 3. CONCLUSIONES

La esteatosis y la colestasis por fármacos son el resultado de múltiples mecanismos, siendo la alteración de la regulación transcripcional una vía potencial adicional que debe investigarse, ya que permitiría un mejor conocimiento de la hepatotoxicidad y la posibilidad de desarrollar nuevas herramientas diagnósticas que complementen a las actuales.

### 4. BIBLIOGRAFÍA

- Canbay A, Bechmann L, Gerken G. Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol* 2007;45:35-41.
- Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology* 2013;48:434-441.
- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011;332:1519-1523.
- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99-S112.
- Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleveland Clinic journal of medicine* 2008;75:721-728.
- Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology* 2005;16:421-427.
- Ramesh S, Sanyal AJ. Hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in liver disease* 2004;24:399-413.
- Larrain S, Rinella ME. A myriad of pathways to NASH. *Clinics in liver disease* 2012;16:525-548.
- Anstee QM, Daly AK, Day CP. Genetics of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in liver disease* 2011;31:128-146.
- Grieco A, Forgione A, Miele L, Vero V, Greco AV, Gasbarrini A, et al. Fatty liver and drugs. *European review for medical and pharmacological sciences* 2005;9:261-263.
- Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *Journal of clinical pathology* 2009;62:481-492.
- Begrache K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of hepatology* 2011;54:773-794.
- Aires CC, Ijlst L, Stet F, Prip-Buus C, de Almeida IT, Duran M, et al. Inhibition of hepatic carnitine palmitoyl-transferase I (CPT IA) by valproyl-CoA as a possible mechanism of valproate-induced steatosis. *Biochemical pharmacology* 2010;79:792-799.
- Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacology & therapeutics* 1995;67:101-154.
- Donato MT, Gomez-Lechon MJ. Drug-induced liver steatosis and phospholipidosis: cell-based assays for early screening of drug candidates. *Current drug metabolism* 2012;13:1160-1173.
- Letteron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 2003;38:133-140.
- Amacher DE. The mechanistic basis for the induction of hepatic steatosis by xenobiotics. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2011;7:949-965.
- Lee MH, Hong I, Kim M, Lee BH, Kim JH, Kang KS, et al. Gene expression profiles of murine fatty liver induced by the administration of valproic acid. *Toxicology and applied pharmacology* 2007;220:45-59.
- Lee MH, Hong I, Kim M, Lee BH, Kim JH, Kang KS, et al. Gene expression profiles of murine fatty liver induced by the administration of methotrexate. *Toxicology* 2008;249:75-84.
- Lee MH, Kim JW, Kim JH, Kang KS, Kong G, Lee MO. Gene expression profiling of murine hepatic steatosis induced by tamoxifen. *Toxicology letters* 2010;199:416-424.
- Lee MH, Kim M, Lee BH, Kim JH, Kang KS, Kim HL, et al. Subchronic effects of valproic acid on gene expression profiles for lipid metabolism in mouse liver. *Toxicology and applied pharmacology* 2008;226:271-284.
- Yin HQ, Kim M, Kim JH, Kong G, Lee MO, Kang KS, et al. Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline. *Toxicological sciences* 2006;94:206-216.
- Benet M, Moya M, Donato MT, Lahoz A, Hervas D, Guzman C, et al. A simple transcriptomic signature able to predict drug-induced hepatic steatosis. *Archives of toxicology* 2014;88:967-982.
- Lopez-Riera M, Conde I, Tolosa L, Zaragoza A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, et al. New microRNA Biomarkers for Drug-Induced Steatosis and Their Potential to Predict the Contribution of Drugs to Non-

- alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in pharmacol* 2017;8:3.
25. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR, et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of toxicology* 2006;80:580-604.
  26. Amacher DE. Strategies for the early detection of drug-induced hepatic steatosis in preclinical drug safety evaluation studies. *Toxicology* 2011;279:10-18.
  27. Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, Negro A, Herrera G, Castell JV, et al. Cytometric analysis for drug-induced steatosis in HepG2 cells. *Chemico-biological interactions* 2009;181:417-423.
  28. Donato MT, Tolosa L, Jimenez N, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. High-content imaging technology for the evaluation of drug-induced steatosis using a multiparametric cell-based assay. *J Biomol Screen* 2012;17:394-400.
  29. Bell LN, Chalasani N. Epidemiology of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Seminars in liver disease* 2009;29:337-347.
  30. Rembold CM. Combination therapy of dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Current diabetes reports* 2004;4:330-334.
  31. Kim-Mitsuyama S. Combination therapy of angiotensin receptor blocker with statin or thiazolidinediones as promising therapeutic strategy for metabolic syndrome and atherosclerosis. *Hypertension research* 2009;32:639-640.
  32. Parra JL, Reddy KR. Hepatotoxicity of hypolipidemic drugs. *Clinics in liver disease* 2003;7:415-433.
  33. Chalasani N. Statins and hepatotoxicity: focus on patients with fatty liver. *Hepatology* 2005;41:690-695.
  34. Ghali P, Lindor KD. Hepatotoxicity of drugs used for treatment of obesity and its comorbidities. *Seminars in liver disease* 2004;24:389-397.
  35. Masubuchi Y. Metabolic and non-metabolic factors determining troglitazone hepatotoxicity: a review. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2006;21:347-356.
  36. Dourakis SP, Tzemanakis E, Sinani C, Kafiri G, Hadziyannis SJ. Gliclazide-induced acute hepatitis. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2000;12:119-121.
  37. Da Silva GH, Alves AV, Duques P, Seva-Pereira T, Soares EC, Escanhoela CA. Acute hepatotoxicity caused by enalapril: a case report. *Journal of gastrointestinal and liver diseases* 2010;19:187-190.
  38. Wang XW, Heegaard NH, Orum H. MicroRNAs in liver disease. *Gastroenterology* 2012;142:1431-1443.
  39. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:5003-5008.
  40. Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013;33:186-192.
  41. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* 2011;13:423-433.
  42. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2003;349:474-485.
  43. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology* 2002;36:451-455.
  44. Bjornsson ES, Bergmann OM, Bjornsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology* 2013;144:1419-1425, 1425 e1411-1413; quiz e1419-1420.
  45. Friis H, Andreasen PB. Drug-induced hepatic injury: an analysis of 1100 cases reported to the Danish Committee on Adverse Drug Reactions between 1978 and 1987. *J Intern Med* 1992;232:133-138.
  46. Lewis JH. Drug-induced liver disease. *Med Clin North Am* 2000;84:1275-1311, x.
  47. Lucena MI, Andrade RJ, Kaplowitz N, Garcia-Cortes M, Fernandez MC, Romero-Gomez M, et al. Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex. *Hepatology* 2009;49:2001-2009.
  48. Yang K, Kock K, Sedykh A, Tropsha A, Brouwer KL. An updated review on drug-induced cholestasis: mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. *J Pharm Sci* 2013;102:3037-3057.
  49. Padda MS, Sanchez M, Akhtar AJ, Boyer JL. Drug-induced cholestasis. *Hepatology* 2011;53:1377-1387.
  50. Andrade RJ, Lucena MI, Kaplowitz N, Garcia-Munoz B, Borraz Y, Pachkoria K, et al. Outcome of acute idiosyncratic drug-induced liver injury: Long-term follow-up in a hepatotoxicity registry. *Hepatology* 2006;44:1581-1588.
  51. Fontana RJ, Hayashi PH, Barnhart H, Kleiner DE, Reddy KR, Chalasani N, et al. Persistent liver biochemistry abnormalities are more common in older patients and those with cholestatic drug induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 2015;110:1450-1459.
  52. Diaz FC, Saez-Gonzalez E, Benlloch S, Alvarez-Sotomayor D, Conde I, Polo B, et al. Albumin dialysis with MARS for the treatment of anabolic steroid-induced cholestasis. *Ann Hepatol* 2016;15:939-943.
  53. Wittebole X, Hantson P. Use of the molecular adsorbent recirculating system (MARS) for the

- management of acute poisoning with or without liver failure. *Clin Toxicol (Phila)* 2011;49:782-793.
54. Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *The American journal of pathology* 2011;178:175-186.
  55. Cai SY, Ouyang X, Chen Y, Soroka CJ, Wang J, Mennone A, et al. Bile acids initiate cholestatic liver injury by triggering a hepatocyte-specific inflammatory response. *JCI Insight* 2017;2:e90780.
  56. Reuben A. Hy's law. *Hepatology* 2004;39:574-578.
  57. Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC, Pelaez G, Pachkoria K, Garcia-Ruiz E, et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* 2005;129:512-521.
  58. Bjornsson ES, Jonasson JG. Drug-induced cholestasis. *Clin Liver Dis* 2013;17:191-209.
  59. Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Davern T, Serrano J, et al. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology* 2008;135:1924-1934, 1934 e1921-1924.
  60. Robles-Diaz M, Gonzalez-Jimenez A, Medina-Caliz I, Stephens C, Garcia-Cortes M, Garcia-Munoz B, et al. Distinct phenotype of hepatotoxicity associated with illicit use of anabolic androgenic steroids. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:116-125.
  61. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 2009;15:1677-1689.
  62. Roberts LR, Kurosawa H, Bronk SF, Fesmier PJ, Agellon LB, Leung WY, et al. Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1997;113:1714-1726.
  63. Fickert P, Fuchsbichler A, Marschall HU, Wagner M, Zollner G, Krause R, et al. Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice. *Am J Pathol* 2006;168:410-422.
  64. Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol* 2013;58:155-168.
  65. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World J Gastroenterol* 2013;19:6398-6407.
  66. Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol* 2009;156:7-27.
  67. Morgan RE, Trauner M, van Staden CJ, Lee PH, Ramachandran B, Eschenberg M, et al. Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development. *Toxicol Sci* 2010;118:485-500.
  68. Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, Klein K, Schaeffeler E, Nussler AK, et al. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology* 2006;44:62-74.
  69. Kagawa T, Hirose S, Arase Y, Oka A, Anzai K, Tsuruya K, et al. No contribution of the ABCB11 p.444A polymorphism in Japanese patients with drug-induced cholestasis. *Drug Metab Dispos* 2015;43:691-697.
  70. Ulzurrun E, Stephens C, Crespo E, Ruiz-Cabello F, Ruiz-Nunez J, Saenz-Lopez P, et al. Role of chemical structures and the 1331T>C bile salt export pump polymorphism in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Liver Int* 2013;33:1378-1385.
  71. Ho RH, Leake BF, Kilkenny DM, Meyer Zu Schwabedissen HE, Glaeser H, Kroetz DL, et al. Polymorphic variants in the human bile salt export pump (BSEP; ABCB11): functional characterization and interindividual variability. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20:45-57.
  72. Donato MT, Lopez-Riera M, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Jover R. Both cholestatic and steatotic drugs trigger extensive alterations in the mRNA level of biliary transporters in rat hepatocytes: Application to develop new predictive biomarkers for early drug development. *Toxicol Lett* 2016;263:58-67.
  73. Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* 2013;3:1191-1212.
  74. Ali AH, Carey EJ, Lindor KD. Recent advances in the development of farnesoid X receptor agonists. *Ann Transl Med* 2015;3:5.