



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA. FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD DE MALAGA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMEDICA DE MALAGA

ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS,
LOS FACTORES DEL HUÉSPED Y SU INTERACCIÓN EN
EL DESARROLLO DE HEPATOTOXICIDAD ASOCIADA A
FÁRMACOS.

Tesis Doctoral

Andrés González Jiménez


16/01/2017

El presente trabajo ha sido desarrollado principalmente en las instalaciones del Departamento de Farmacología de la Universidad de Málaga. Este estudio ha sido financiado por el "Instituto de Salud Carlos III" cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional – FEDER "Una manera de hacer Europa" (código de proyecto: PI15/01440) y por el "Plan Propio" Universidad de Málaga



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Andrés González Jiménez

 <http://orcid.org/0000-0002-7059-1577>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

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

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

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

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



AUTORIZACION DEL DIRECTOR DE TESIS

DÑA. MARIA ISABEL LUCENA GONZALEZ, CATEDRATICA DE FARMACOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y PEDIATRIA DELA FACULTAD DE MEDICINA EN LA UNVERSIDAD DE MÁLAGA. FACULTATIVO ESPECIALISTA DEL AREA DE FARMACOLOGIA CLINICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA VICTORIA DE MÁLAGA.

CERTIFICA:

Que la memoria que lleva por título "Análisis de las propiedades farmacológicas, los factores del huésped y su interacción en el desarrollo de hepatotoxicidad asociada a fármacos" presentada por Don Andrés González Jiménez con DNI 26804441B, para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizado bajo mi dirección. Una vez finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Málaga 15 de enero de 2017

UNIVERSIDAD DE MALAGA
REGISTRO GENERAL

Entrada

Nº. 201700200000867

16/01/2017 10:03:23



Fdo: MARIA ISABEL LUCENA GONZALEZ

AUTORIZACION DEL DIRECTOR DE TESIS

D. RAUL JESUS ANDRADE BELLIDO, CATEDRATICO DE DIGESTIVO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA DE LA FACULTAD DE MEDICINA EN LA UNVERSIDAD DE MÁLAGA. FACULTATIVO ESPECIALISTA DEL AREA DE APARATO DIGESTIVO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA VICTORIA DE MÁLAGA.

CERTIFICA:

Que la memoria que lleva por título "Análisis de las propiedades farmacológicas, los factores del huésped y su interacción en el desarrollo de hepatotoxicidad asociada a fármacos" presentada por Don Andrés González Jiménez con DNI 26804441B, para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizado bajo mi dirección. Una vez finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Málaga 15 de enero de 2017



Fdo: RAUL JESUS ANDRADE BELLIDO


AUTORIZACION DEL DIRECTOR DE TESIS

DÑA. CAMILLA STEPHENS, INVESTIGADORA CONTRATADO POR EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS Y DIGESTIVAS (CIBERehd), Y MIEMBRO DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE MÁLAGA (IBIMA)

CERTIFICA:

Que la memoria que lleva por título "Análisis de las propiedades farmacológicas, los factores del huésped y su interacción en el desarrollo de hepatotoxicidad asociada a fármacos" presentada por Don Andrés González Jiménez con DNI 26804441B, para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizado bajo mi dirección. Una vez finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Málaga 15 de enero de 2017



Fdo: CAMILLA STEPHENS

Dedicado a mis tíos.

Antonio y Loli

Me gustaría que estuvieran aquí.
Pero la vida tuvo otros planes.

Agradecimientos

En estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a aquellas personas quienes, de una manera u otra, han contribuido al planteamiento, realización y conclusión de este trabajo de tesis doctoral.

En primer lugar, deseo manifestar mi agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral los Doctores M^a Isabel Lucena, Raúl J. Andrade y Camilla Stephens, por impulsarme a realizar esta tesis, así como su dirección y guía en la realización de la misma

A mi pareja M^a José, por apoyarme a lo largo de todos mis estudios y no permitirme abandonar en los malos momentos. Así como por su ayuda y ánimo que han conseguido que finalice este proyecto. Y a mi hijo Ángel que me ha estimulado para seguir creciendo en la vida.

A los Drs. Ayako Suzuki y Minjun Chen, los cuales fueron un soporte inestimable en mi trabajo en los Estados Unidos, de los cuales recibí apoyo y ayuda de manera incondicional. Siempre les estaré agradecido.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a mi hermana que realizo las tareas de revisora y lectora incondicional de este trabajo.

A mis padres, hermanas y cuñados que me han servido de ejemplo de trabajo y dedicación, y quienes me han animado para que la terminara. Gracias por estar a mi lado.

Por último, me gustaría agradecerles a los miembros del Departamento de Farmacología de la Universidad de Málaga, tanto a aquellos que continúan como a los que ya se marcharon. Por su inestimable colaboración a la hora de desarrollar mi carrera científica.

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....I
 INDICE DE TABLAS.....III
 ABREVIATURAS..... V
 FINANCIACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL..... VII
 COLABORACIÓN INTERNACIONAL..... VII
 SUMMARYIX

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION 1

1.1 **MECANISMOS DE TOXICIDAD HEPATICA** 2

1.1.1 TOXICIDAD INTRÍNSECA (DOSIS DEPENDIENTE)..... 3

1.1.2 TOXICIDAD IDIOSINCRÁTICA (DOSIS “INDEPENDIENTE”)..... 5

1.2 **CARACTERIZACION DE LA LESION HEPATICA** 6

1.2.1 CRITERIOS DIAGNÓSTICOS 7

1.2.2 ESCALAS DIAGNOSTICAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA RELACIÓN DE CAUSALIDAD 8

1.2.3 TIPO DE DAÑO HEPÁTICO I. PERFIL BIOQUÍMICO 11

1.2.4 TIPO DE DAÑO HEPÁTICO II. PRESENTACIÓN CLÍNICA 12

1.2.5 GRAVEDAD DE LA LESIÓN INDUCIDA POR FÁRMACOS 14

1.3 **POTENCIAL TOXICO DE LOS FÁRMACOS EN DILI** 16

Antibacterianos 17

Agentes antituberculosos..... 19

Agentes antifúngicos 20

Antirretrovirales 21

Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES)..... 21

Nucleósidos inhibidores de transcriptasa inversa 22

Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)..... 22

Anticonvulsivos..... 23

Antidepresivos..... 24

Agentes antidiabéticos 24

Hipolipemiantes 24

Preparaciones a base de plantas y suplementos dietéticos 25

1.4 **METABOLISMO DE LOS FARMACOS EN EL HIGADO** 29

1.4.1 REACCIONES DE FASE I 30

Familia del citocromo P450 32

1.4.2 REACCIONES DE FASE II y Transportadores..... 36

Uridina difosfato glucuronosiltransferasa UGT 36

N-acetiltransferasa NAT2 37

Glutati3n S transferasa GST..... 37

Super3xido dismutasa de Manganeso (MnSOD)..... 38

BSEP 39

MRP2 39



P-glicoproteína 1	40
1.5 PROPIEDADES DE LOS FÁRMACOS	40
Dosis diaria	40
1.5.1 PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS	41
Solubilidad	41
Sistema de clasificación biofarmacéutica de la disponibilidad de fármacos (BDDCS)	42
Vida media del medicamento ($t_{1/2}$)	44
Tasa de unión a proteínas séricas	44
Circulación enterohepática	44
Formación de metabolitos reactivos	45
Daño mitocondrial	46
Excreción	47
1.6 FACTORES DEL HUÉSPED	47
Edad	47
Genero	48
Estilo de vida	49
Comedicación	49
Enfermedades subyacentes	50
Variabilidad individual	50

MATERIALES Y METODOS

2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	54
2.2 TAMAÑO MUESTRAL	55
2.3 METODOLOGÍA DEL SPANISH DILI REGISTRY	55
2.4 SELECCIÓN DE LOS CASOS	57
2.5 PARÁMETROS DEL ESTUDIO	59
2.5.1 PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS	59
2.5.2 SINTOMATOLOGÍA	60
2.5.3 ENFERMEDADES SUBYACENTES	62
2.5.4 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	65
2.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS	71
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72

RESULTADOS

3. RESULTADOS..... 77

3.1 ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES EN EL TIPO DE DAÑO HEPÁTICO. 77

3.1.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS 78

3.1.2 COMORBILIDADES EN EL TIPO DE DAÑO HEPÁTICO 82

3.1.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS ASOCIADOS AL TIPO DE DAÑO 83

3.1.4 COMEDICACIÓN Y SU INFLUENCIA EN EL TIPO DE DAÑO 85

3.1.5 ANÁLISIS MULTIVARIANTE (REGRESIÓN LOGÍSTICA) 86

3.1.6 INTERACCIONES CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE - PROPIEDADES FARMACOLOGICAS. 87

3.2 ANALISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES EN LA APARCION DIFERIDA DE LOS SÍNTOMAS......90

3.2.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS 91

3.2.2 COMORBILIDADES EN EL INICIO DIFERIDO DE LOS SÍNTOMAS 93

3.2.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LOS FÁRMACOS ASOCIADOS A LOS DIFERENTES TIPOS DE DAÑO..... 94

3.2.4 COMEDICACIÓN Y SU INFLUENCIA EN EL TIPO DE DAÑO 96

3.2.5 ANÁLISIS MULTIVARIANTE (REGRESIÓN LOGÍSTICA) 97

INTERACCIONES CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE - PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS 99

3.3 ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES EN LA GRAVEDAD DE LAS REACCIONES HEPÁTICAS INDUCIDAS POR FÁRMACOS. 100

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS 100

COMORBILIDADES Y SU RELACIÓN CON LA GRAVEDAD DE LA LESION 103

PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LOS FÁRMACOS ASOCIADOS A LA DIFERENTE GRAVEDAD . 104

COMEDICACIÓN EN LA GRAVEDAD DEL DAÑO..... 106

ANÁLISIS MULTIVARIANTE (REGRESIÓN LOGÍSTICA) 106

INTERACCIONES CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE - PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS 107

DISCUSION

4. DISCUSION 108

TIPO DE DAÑO HEPÁTICO 108

INICIO DIFERIDO DEL DAÑO HEPÁTICO 118

GRAVEDAD DEL DAÑO HEPÁTICO 123

REFERENCIAS

REFERENCIAS..... 128

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Metabolismo del paracetamol y generación del metabolito toxico responsable del daño hepático intrínseco.	6
Figura 2	Escala de causalidad de CIOMS/RUCAM.	9
Figura 3	Escala de causalidad de María & Victorino.	10
Figura 4	Algoritmo para predecir el riesgo de desarrollar fallo hepático fulminante en pacientes de DILI.	16
Figura 5	Metabolismo hepático de Isoniazida por enzimas hepáticas no relacionadas con el citocromo P450.	31
Figura 6	Cadena de transporte de electrones del citocromo y mecanismo de acción del citocromo.	31
Figura 7	Principales reacciones químicas ocurridas en el interior del citocromo P450.	31
Figura 8	Metabolismo hepático de citalopram y tamoxifeno en los que intervienen diferentes isoenzimas de citocromo p 450.	36
Figura 9	Mecanismo de acción de la superóxido dismutasa y otras enzimas relacionadas con la fase II del metabolismo hepático de los fármacos.	38
Figura 10	Ecuación para calcular de manera experimental el logaritmo de P para cualquier sustancia.	43
Figura 11	Distribución de las unidades clínicas colaboradoras en el Spanish DILI registry.	53
Figura 12	Recogida de información y muestras biológicas por el Spanish DILI registry.	56
Figura 13	Ejemplo de cambios en el reconocimiento celular en función de la longitud de la cadena de fármaco.	69
Figura 14	R script para el modelo de interacciones entre propiedades farmacológicas y factores del huésped.	74
Figura 15	Distribución de los trastornos hematológicos entre los casos de daño colestásico y los casos de daño hepatocelular.	79
Figura 16	Distribución de los trastornos en el metabolismo de la bilirrubina entre los casos colestásicos y los casos hepatocelulares.	80
Figura 17	Distribución de los trastornos epiteliales entre los casos de daño colestásico y los casos de daño hepatocelular.	80

Figura 18	Distribución de la presentación de manifestaciones somáticas entre los casos de daño colestásico y los casos de daño hepatocelular.	80
Figura 19	Distribución de las principales comorbilidades de los pacientes según el tipo de daño hepático.	81
Figura 20	Distribución de la comedicación entre pacientes colestásicos y hepatocelulares.	85
Figura 21	Distribución de los casos hepatocelulares y colestásicos en función de la edad y el metabolismo hepático.	88
Figura 22	Distribución de los casos hepatocelulares y colestásicos en función de la edad y la circulación enterohepática.	88
Figura 23	Curva ROC para el modelo de regresión en el que se han incluido tres predictores independientes	97
Figura 24	Histograma de 1000 observaciones realizadas mediante técnicas de bootstrapping.	97
Figura 25	Distribución de los trastornos del metabolismo de la bilirrubina entre los casos de baja y alta gravedad.	101
Figura 26	Distribución de los trastornos epiteliales entre los casos de baja y alta gravedad.	102
Figura 27	Distribución de los trastornos hematológicos entre los casos de baja y alta gravedad.	102
Figura 28	Distribución de la comedicación en función del grupo de gravedad.	105

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales compuestos retirados del mercado español por hepatotoxicidad	26
Tabla 2	Principales compuestos no autorizados en el mercado español por hepatotoxicidad	27
Tabla 3	Características demográficas de la población en función del tipo de daño hepático	78
Tabla 4	Información clínica de las reacciones de hepatotoxicidad en función del tipo de daño.	78
Tabla 5	Propiedades fisicoquímicas de los fármacos.	83
Tabla 6	Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los productos imputados en función del daño hepático.	84
Tabla 7	Factores predictores del daño hepatocelular.	86
Tabla 8	Evaluación del cambio en el riesgo relativo (razón de moebius) en el desarrollo de daño hepatocelular, en función de la combinación de los principales factores predictores del daño hepatocelular.	87
Tabla 9	Comparación de parámetros demográficos, clínicos y de severidad gravedad en 204 pacientes, los cuales consumieron fármacos PDIF y 209 pacientes que consumieron fármacos nPDIF.	91
Tabla 10	Enfermedades en 204 pacientes que consumieron fármacos PDIF y 209 pacientes que consumieron fármacos nPDIF.	92
Tabla 11	Propiedades fisicoquímicas de los fármacos en relación al potencial de inducir un inicio diferido de los síntomas.	94
Tabla 12	Comedicación recibida en 204 pacientes que consumieron fármacos PDIF y 209 pacientes que consumieron fármacos nPDIF.	95
Tabla 13	Modelo predictor de la aparición de inicio diferido de la sintomatología basado en las propiedades del fármaco y factores del paciente.	96

Tabla 14	Modelo predictor de la aparición de inicio diferido de la sintomatología basado en propiedades farmacológicas y factores del paciente.	98
Tabla 15	Características demográficas de los pacientes DILI en función de la gravedad del daño	100
Tabla 16	Presentación clínica de los casos DILI en función de su gravedad.	100
Tabla 17	Propiedades fisicoquímicas de los fármacos en función de la gravedad.	103
Tabla 18	Propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los fármacos en función de la gravedad.	104

ABREVIATURAS

95% IC	Intervalo de confianza del 95%
ADR	Adverse drug reaction.
AC	Amoxicilina-clavulánico
ADNmt	ADN mitocondrial
AG	Alta gravedad (Criterio del estudio)
AGEMED	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
AINES	Antinflamatorios no esteroideos
ALT	Alanina aminotransferasa
AMA	Autoanticuerpos anti-mitocondriales
AMLA	Autoanticuerpos anti-musculo liso
ANA	Autoanticuerpos antinucleares
AUC	Área bajo la curva (<u>A</u> rea <u>U</u> nder <u>C</u> urve)
BDDCS	Biopharmaceutics drug disposition classification system
BG	Baja gravedad (Criterio del estudio)
BSEP	Bomba exportadora de sales biliares (Bile Salt Export Pump)
BT	Bilirrubina total
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Science
DI-AIH	Daño hepático toxico con manifestaciones de autoinmunidad
DILI	Daño hepático inducido por fármacos (Drug-induced liver injury)
DILIN	Red de estadounidense de hepatotoxicidad inducida por fármacos
FA	Fosfatasa alcalina
FHF	Fallo hepático Fulminante
GSH	Glutación
GST	Glutación-s-transferasa
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (Human leukocyte antigen)
IAM	Infarto agudo de miocardio
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IDF	Inicio diferido de los síntomas (Criterio del estudio)

IMC	Índice de masa corporal
LADME	Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
LOE	Lesiones ocupantes de espacio
LOGP	Coeficiente de partición
LTKB	Liver toxicity knowledge database
LSN	Límite superior de la normalidad
MRP	Multidrug resistance protein
MnSOD	Superóxido dismutasa de Manganeso
NAPQI	N-acetyl-p-benzoquinone imine
NAT	N-acetiltransferasa
NCTR	National Center for Toxicological Research
NRF2	Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
P-gp	P-glicoproteína 1
pH	Coeficiente de acidez
PMCA	Plasma membrane Ca ²⁺ atpase
R	Ratio (ALT*LSN/FA*LSN)
ROC	Receiver operating characteristic
ROS	Reactive oxygen species
RUCAM	Roussel Uclaf Causality Assessment Method
SIDF	Sin inicio diferido de los síntomas (Criterio del estudio)
t ½	Vida media del medicamento
UGT	Uridina difosfato glucuronosiltransferasa
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

FINANCIACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

El presente estudio ha sido desarrollado gracias a la financiación proveniente del “Instituto de Salud Carlos III”, cofinanciado por Fondo Europeo de Desarrollo Regional – FEDER “Una manera de hacer Europa” (número de contrato: PI15/01440) y de la ayuda proveniente del Plan Propio de la Universidad de Málaga.

COLABORACIÓN INTERNACIONAL

Como parte del proceso para la obtención de la Mención internacional se ha desarrollado colaboración internacional con los siguientes centros:

- University of Arkansas for medical Sciences (UAMS), Little Rock, Arkansas, EEUU.
- Central Arkansas Veterans Healthcare System (VA), Little Rock, Arkansas, EEUU.
- National Center for Toxicological Research (NCTR), Jefferson, Arkansas, EEUU.

INDICADORES DE CALIDAD

PUBLICACIONES

A. Gonzalez-Jimenez , K. McEuen., M Chen M, S Ayako, MI Lucena, C Stephens, RJ Andrade (2017). The influence of drug properties and host factors on delayed onset and their interactions on DILI. Clinical Pharmacology and Therapeutics (enviado)

PUBLICACIONES EN CONGRESOS

A Gonzalez-Jimenez, A. Suzuki, C Stephens, M Chen, I Medina-Caliz, M Robles-Diaz, E Montane, A Aldea, RJ Andrade, MI Lucena (2015). "The influence of drug physicochemical properties on delayed onset in hepatotoxicity: an analysis of the cohort included in the Spanish DILI registry". **36th congress of pharmacology** SEF, Valencia, Spain. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 117 (Suppl 2) 40-40

M. Robles-Diaz, I. M.-C., A. Ruiz, J. Sanabria, C. Stephens, A. González-Jimenez, A. Ortega-Alonso, B. Garcia-Munoz, M. Garcia-Cortes, M. Romero-Gomez, G. Pelaez, H. Hallal, G. Soriano, E. Roman, S. Blanco, A. Castiella, E.M. Zapata, J.M. Navarro, M. Jimenez, J.M. Moreno-Planas, A. Aldea, F. Bessone, N. Hernandez, M. Arrese, M.I. Lucena, R.J. Andrade. (2015). "Influence of metabolic risk factors in hepatotoxicity (DILI) phenotype and outcome". **The International Liver Congress™ 2015 EASL**. Amsterdam , Netherlands. Journal of Hepatology 62 (Suppl 2) S761–S762

Andres Gonzalez-Jimenez, A. Suzuki, C. Stephens, Miniun Chen, I. Medina-Caliz, Mercedes Robles Diaz., Martin Prieto, German Soriana, Eva Montane, A Aldea, Raul J. Andrade , M. I. Lucena (2015). "The influence of drug properties and host factors on delayed onset in hepatotoxicity: An analysis of the cohort included in the Spanish DILI Registry". **The Liver Meeting 2015® AASLD**. San Francisco, USA. Hepatology 62 (Suppl 1) 504A-505A

A. Gonzalez-Jimenez, M. C., K. McEuen, C. Stephens, I. Medina-Caliz, M. Robles-diaz, M. Slim, M.I. Lucena, A. Suzuki, and R. Andrade. (2017). "Influence of host characteristics and pharmacological properties on type of liver injury in hepatotoxicity". **The International Liver Congress™ 2017 EASL**. Vienna, Austria. Journal of Hepatology 66 (Suppl 1) S401-402

A. González-Jiménez, M. C., Kristin McEuen, Mercedes Robles-diaz, Inmaculada Medina-Caliz, Mahmoud Slim, Judith A. Sanabria, Camilla Stephens, Maria Isabel Lucena, Raul J. Andrade, Ayako Suzuki (2017). "Data mining for possible drug-host interplay in clinical phenotypes of drug-induced liver injury.". **Digestive disease week**, Chicago, USA. Gastroenterology 152 (Suppl 5) S1080-S1081

PREMIOS

Premio a la mejor comunicación para "The influence of drug physicochemical properties on delayed onset in hepatotoxicity: an analysis of the cohort included in the Spanish DILI registry". Presentado en el congreso **36th congress of pharmacology SEF, Valencia 2015**.

SUMMARY

INTRODUCTION

Drug-induced liver injury is an important concern in public health. In addition, it is one of the most common adverse events that cause lack of drug approval, drug withdrawals, and post-marketing regulatory decisions despite its low frequency in the general population. Nowadays, this adverse reaction is an important challenge during clinical phases in drug development. Hepatotoxicity is considered a multifactorial pathology dependent on host, drug and environmental aspects. This aspect combined with the wide range of clinical presentation associated with DILI, makes it difficult to characterize specific factors that play a role in DILI development. For this reason, the current study approach takes into consideration that both drug properties and host factors could modulate different features in DILI. Identifying specific parameters within these groups that could potentially have a modulatory role in DILI may help to understand the underlying mechanism(s) in DILI. In addition, the detection of such parameters could help prevent a fatal outcome for patients with this pathology. Based on previous observations, drug properties such as hepatic metabolism and lipophilicity may play an important role in delayed onset, liver injury pattern and DILI severity. Furthermore, these properties are likely to be modulated by host factors.

MATERIALS AND METHODS

A total of 870 DILI cases were evaluated, which were induced by a wide range of drugs and dietary supplements. In the present study, 701 cases were included, while 169 were excluded due to not meeting the study inclusion criteria. This cohort was used to evaluate host factors and pharmacological drug properties in search for those associated with the development of different features in DILI (type of liver injury, delayed onset and severity) using the same methodology for all three parts. Hence, only cases induced by conventional drugs were considered for this study. Host factor information was retrieved from

the Spanish DILI registry database. Drug property information was retrieved from the Liver Toxicity Knowledge Base (LTKB), a database developed by the National Center for Toxicological Research. Univariate analyses and nominal logistic regression were performed using the JMP (Cary, NC, USA) and R software to compare causative drug properties and host factors.

RESULT

Type of liver injury

Seven parameters were identified as predictors for different types of liver injury in DILI. The factors selected by the logistic regression as enhancers of the hepatocellular injury were as follows: age below 60 years (OR 2.06, confidence interval to 95 % (95%CI): 1.28-3.34, $p=0.0029$), previous allergic reactions to drugs (OR 2.69 [95% IC: 1.01-8.24], $p=0.0493$), culprit drug with enterohepatic circulation (OR 4.94 [95% IC: 2.34-11.45], $p=0.0001$), drugs with high hepatic metabolism, (OR 1.70 [95% IC: 1.02-2.84], $p=0.0417$), sp3/sp2 hybridization ratio (<50%). Protective parameters were: intake of concomitant medication for treatment of cardiac diseases (OR 0.47 [95% IC: 0.29-0.77], $p=0.0030$) and increased number of heterorings in the drug molecule (OR 0.68 [95% IC: 0.52-0.88], $p=0.0270$). The ROC curve showed an AUC of 0.75863. A value between 0.75-0.90 indicates that the model has a good discrimination capacity.

In addition to the individual host factors and drug properties identified as liver injury predictors, several interactions between these factors also seem to play a role in the modulation of type of liver injury. Drugs with enterohepatic circulation increased the risk of hepatocellular type of injury in DILI patients with previous allergic reactions to drugs. In contrast, drugs with high hepatic metabolism decreased the risk of hepatocellular damage in patients with previous allergic drug reactions. Elevated number of heterorings was found to play a protective role in cases with previous allergic drug reaction. In addition, hybridization ratio was found to have a contradictory effect and increased the risk of hepatocellular injury in patients with previous allergic reactions to drugs. Furthermore, age seems to play an important role in modulating type of liver injury. Low hepatic

metabolism (<50%) or lack of enterohepatic circulation increased the frequency of cholestatic cases to approximately 50% in older patients.

Delayed onset

Three variables were found to increase the likelihood of delayed onset: absence of associated diseases (OR 1.91 [95% IC: 1.08-3.39], $p=0.0245$), culprit drug daily dose $\geq 200\text{mg}$ (OR 2.89 [95% CI: 1.25-7.58], $p=0.0123$) and hepatic metabolism <50% (OR 23.98 [95% CI: 10.84-63.68], $p=0.0001$). The calculated R^2 for this model was 0.3034 and the area under the ROC curve 0.8459. The interaction study resulted in four pairs of potential interactions that seem to have significant impacts on delayed onset. Three host factors, age (cut-off 60 years), gender, and pre-existing cardiac diseases, were identified as significant effect modifiers for drugs with mitochondrial liability. Pre-existing cardiac diseases were also identified as a significant effect modifier for drugs with high Pauling electronegativity.

Severity

Only concomitant use of anti-infectious drugs was found as a predictor for high severity. Consumption of anti-infective agents prior to or at the time of the episode doubled the risk of progressing to a highly severe outcome (OR 2.00, IC: 1.35-3.47, $p=0.008$). Due to the fact that a single predictor (concomitant use of anti-infectives) was found to explain the risk of severity, no further analyses of host factor – drug property interactions were performed.

CONCLUSIONS

CONCLUSION 1: TYPES OF LIVER INJURY

- a. Within the host factors, age is the determining factor of the phenotypic expression of the damage. Hepatocellular damage predominates in young patients, whereas patients aged ≥ 60 years present a higher frequency of cholestatic damage. In addition, the history of cardiovascular disease would condition a greater susceptibility to the development of cholestatic damage.

- b. The main drug properties that modulate the expression of toxic liver damage are liposolubility, degree of binding protein, extent of hepatic metabolism and presence of enterohepatic circulation. Hepatocellular damage would be determined by drugs that have higher lipophilicity, high plasma protein binding and significant hepatic metabolism. Alternatively, cholestatic damage would be related to drugs more soluble in water, with poor protein binding and poor hepatic metabolism.

- c. Other physicochemical characteristics identified as potential modulators of the damage are the presence of rings with heteroatoms in the chemical structure, the presence of sulfur atoms and / or the hybridization rate of orbitals.

- d. The interaction between host factors and drug properties suggests that advanced age and consumption of drugs with poor hepatic metabolism increase the risk of cholestatic damage in susceptible individuals. Contrary to expectations, in young patients the risk of developing hepatocellular damage does not change depending on the rate of hepatic metabolism.

CONCLUSION 2: DELAYED INITIATION OF SYMPTOMS

- a) Drugs with potential to induce delayed onset have shorter half-life, lower hepatic metabolism and have a higher proportion excreted in parent form than drugs without delayed onset potential. These properties would be related to higher solubility, lower lipophilicity and lower protein binding.
- b) Three independent factors appear to influence the likelihood of delayed symptom onset: hepatic metabolism (drug), daily dose (host) and pre-existing diseases (host).
- c) Results derived from the interactions between host factors and pharmacological drug properties suggest that the interaction between mitochondrial liability and age, sex or underlying cardiac diseases modulates the risk of hepatotoxicity with delayed onset of symptoms. Pauling electronegativity combined with underlying cardiac diseases similarly affects the probability of delayed onset.

CONCLUSION 3: SEVERITY OF LIVER DAMAGE

- a) Drugs with high hepatic metabolism and a higher rate of metabolized drug excretion seem to contribute to the increase in severity. This observation could be related to the higher frequency of hepatocellular cases, which are associated with a greater severity of the damage.
- b) The presence of infectious diseases and / or the consumption of anti-infective comedication increase the risk of developing a more severe hepatic toxicity episode.

Finally, the identification of host factor-drug property interactions may provide insight into the underlying mechanisms responsible for the heterogeneity of clinical presentations in DILI. Furthermore the generated hypotheses in the current study should be further explored in independent DILI cohorts.

1.INTRODUCCION

El daño hepático inducido por fármacos conocido como hepatotoxicidad o DILI (derivado del inglés *drug-induced liver injury*) es un importante problema de salud pública. Debido a que supone una de las principales reacciones adversas a medicamentos (ADR en inglés), que conlleva la retirada de medicamentos del mercado(Onakpoya, Heneghan et al. 2016). En la actualidad, representa un auténtico desafío al proceso de desarrollo clínico de los medicamentos (Siramshetty, Nickel et al. 2016). A pesar de su importancia clínica, los casos DILI poseen una baja frecuencia en la población. Estudios previos han estimado una incidencia variable entre 3,4 por cada 100.000 habitantes/año (Andrade, Lucena et al. 2005) 8,1 por cada 100.000 (Sgro, Clinard et al. 2002) y 19,1 por cada 100.000 (Bjornsson, Bergmann et al. 2013).

A esta baja frecuencia de detección contribuyen tanto la limitada población expuesta, 9,8 de la población española en 2014 (INE 2014), como al paso inadvertido de la reacción. La reacción pasa inadvertida debido a que se produce una elevación del perfil hepático asintomática, o la sintomatología presentada mimetiza otra enfermedad hepática, quedando esta sintomatología no filiada. A esto contribuye el hecho de la falta de marcadores de hepatotoxicidad, siendo diagnosticada la patología mediante la exclusión exhaustiva del resto de causas.

Las manifestaciones clínicas en DILI oscilan desde elevaciones asintomáticas de las transaminasas hasta episodios de fallo hepático agudo, los cuales puede desembocar en fallo hepático fulminante (FHF). Los estudios previos señalan que la hepatotoxicidad idiosincrásica es causante del 11% de los fallos hepático en Estados Unidos. Además en un 20% de los pacientes, el daño se mantiene más de 6 meses después de la aparición de los síntomas (Reuben, Koch et al. 2010; Chalasani, Bonkovsky et al. 2015). Se ha estimado que la incidencia total de FHF atribuidos a fármacos y productos de herboristería y suplementos dietéticos es 1,61 por cada 1.000.000 de habitantes, mientras que la tasa de FHF por toxicidad intrínseca del paracetamol es igual a 1,02 eventos por cada 1.000.000 de personas/año (Goldberg, Forde et al. 2015).

1.1 MECANISMOS DE TOXICIDAD HEPATICA

Aunque la hepatotoxicidad es proceso complejo, se han diferenciado dos tipos de presentaciones clínicas.

La **toxicidad Intrínseca** es un tipo de toxicidad dosis dependiente, a dosis por debajo del umbral de fatalidad. Siendo la única hepatotoxicidad reproducible en modelos animales. Los principales representantes de este tipo de presentación son los compuestos paracetamol (acetaminofén) y ácido acetilsalicílico (aspirina).

Toxicidad idiosincrática es un tipo de toxicidad que se produce a dosis terapéuticas y no es reproducible en modelo animal. Aunque no se ha esclarecido el mecanismo subyacente a este tipo de presentación. Sin embargo, se ha postulado que es un mecanismo complejo en el cual intervienen tanto factores genéticos, factores relacionados con la naturaleza del fármaco y factores ambientales (Chen, Suzuki et al. 2015). Se cree que los factores individuales de cada paciente podrían condicionar la susceptibilidad al daño y modular la extensión del mismo. Entre los factores del paciente, los factores genéticos relacionados con proteínas que participan en el procesamiento de los fármacos, podrían jugar un papel muy relevante (metabolismo, detoxificación y transporte). Mostrando similitud con la toxicidad intrínseca. Otros factores genéticos relevantes se asociarían con los mecanismos inductores del daño celular y en su reparación (Kaplowitz 2005; Han, Dara et al. 2013). Un caso especial dentro de la toxicidad idiosincrática sería la **toxicidad autoinmune**, la cual no debe confundirse con la hepatitis autoinmune. Esta toxicidad aparece en respuesta al consumo de fármacos, mostrando auto-anticuerpos positivos (antinucleares, anti-músculo liso, anti-mitocondriales). Los principales productos farmacéuticos inductores de este tipo de daño son: nitrofurantoina y minociclina. Se cree que este tipo de toxicidad está especialmente condicionada por factores genéticos del paciente. Aunque el concepto DILI representa cualquier proceso de daño hepático inducido por fármacos, en el actual trabajo solo denominaremos DILI a la toxicidad idiosincrática.

1.1.1 TOXICIDAD INTRÍNSECA (DOSIS DEPENDIENTE)

Las hepatotoxinas responsables de este tipo de toxicidad, producen patologías hepáticas, siempre que se consumen a dosis consideradas tóxicas. Siendo estas dosis tóxicas superiores a las dosis terapéuticas. Paracetamol es el paradigma de los fármacos dentro de esta categoría. Así, el consumo de paracetamol a dosis inferiores a 4g por día se considera seguro. Aunque un reciente estudio en individuos sanos, mostró que en un 40% de los casos, se producían elevaciones de las transaminasas hasta 3 veces por encima de la normalidad, siendo estas alteraciones leve y no revistiendo peligro a la vida del paciente (Watkins, Kaplowitz et al. 2006). Por otro lado, el consumo a dosis superiores se considera peligroso, concretamente las dosis mayores a 10 g diario se han relacionado con necrosis hepática masiva (Makin, Wendon et al. 1995).

El mecanismo de desarrollo de esta toxicidad asociada a paracetamol fue elucidado en la década de los 80's. En la toxicidad de paracetamol, la fase II del metabolismo hepático es predominante. Aunque una pequeña fracción del fármaco es metabolizado por el citocromo CYP450. Cuando la cantidad del fármaco excede la capacidad de detoxificación de la fase II, se produce el incremento en la concentración de un intermediario tóxico el N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), debido principalmente a la actividad de una isoforma del citocromo 450 denominada CYP2E1. NAPQI anida de manera covalente a macromoléculas del interior celular, produciendo la disrupción de los procesos mitocondriales y las funciones nucleares generando estrés oxidativo (Jollow, Mitchell et al. 1973; Tujios and Fontana 2011). Estudios ulteriores confirmaron la presencia de dicho estrés oxidativo mediante técnicas inmunohistoquímicas, en las cuales midieron la presencia de residuos de nitro tirosina (Hinson, Michael et al. 2000). Estos residuos son formados por la reacción de los superóxidos y el óxido nítrico dando lugar a peroxinitrito, el cual produce la nitración de la tirosina. Estos procesos son bloqueados mediante la conjugación con glutatión-S-transferasa (GSH). NAPQI se une a la molécula de manera covalente, formando ácido mercaptopúrico. Este ácido es un producto soluble y es posteriormente eliminado por los riñones. Esto provoca la depleción de GSH activo en la célula y la acumulación del producto tóxico.

y como consecuencia el daño hepático. Algunos factores como la malnutrición o el consumo de alcohol pueden disminuir también la cantidad GSH provocando un incremento de la toxicidad (Zimmerman and Maddrey 1995). Mientras otros productos como la N-acetil cisteína pueden favorecer la producción de glutatión y por lo tanto poseen un efecto protector frente a la toxicidad debida a paracetamol (Schiodt, Atillasoy et al. 1999). La razón que subyace a que la toxicidad de paracetamol sea un proceso intrínseco, se debe a la adaptabilidad de la respuesta celular frente paracetamol en dosis normales. Así a dosis bajas se activa un mecanismo compensatorio, el cual es mediado por un factor de transcripción denominada NRF2 o NFE2L2 (Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2). En condiciones normales NRF2 permanece unido a una proteína supresora de su actividad, la cual contiene más de veinte dominios tiol a los que se une NAPQI. La activación del mecanismo compensatorio produce la liberación de NRF2 el cual se traslada al núcleo y provoca la síntesis de numerosas enzimas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo. Entre las enzimas sintetizadas por la acción de NRF2 se encuentra la enzima glutamato cisteína ligasa, la cual es una enzima limitante en la generación de GSH. Sin embargo, a medida que la dosis de paracetamol aumenta, este mecanismo queda desbordado, guiando a los hepatocitos a la muerte celular (Fig. 1).

En cultivos en vitro se ha observado dos procesos efectores de muerte celular. En el primero, el exceso de radicales superóxido favorece la permeabilidad de la membrana mitocondrial. El segundo efecto se desencadenaría mediante la activación de una cascada de señalización de muerte celular activada por JNK (Han, Dara et al. 2013), que produciría la activación sucesiva de varias MAP quinasas y que desembocaría en necrosis programada (Han, Dara et al. 2013). Otros estudios apuntan a un mecanismo alternativo. En este mecanismo la alteración de homeostasis del calcio citosólico activaría proteasas como calpaina, que degradarían proteínas estructurales de la célula (Jaeschke and Bajt 2006).

1.1.2 TOXICIDAD IDIOSINCRÁTICA (DOSIS “INDEPENDIENTE”)

La toxicidad intrínseca se relaciona con un número limitado de moléculas que se utilizan como medicamentos. Sin embargo, la toxicidad idiosincrásica se ha relacionado con un mayor número de moléculas. No obstante, estas reacciones no son consecuencia directa de la acción del fármaco per se, por ello la mayoría de los pacientes son tolerantes a las mismas. No todos los fármacos poseen el mismo potencial para desarrollar toxicidad idiosincrásica. Así los antiinflamatorios no esteroideos, los antibióticos y los anticonvulsivos son los agentes más relacionados con DILI, mientras que las hormonas, los antihipertensivos y los antiarrítmicos son los agentes menos frecuentes (Andrade, Lucena et al. 2005; Bessone, Hernandez et al. 2012; Chalasani, Bonkovsky et al. 2015).

Las reacciones idiosincrásicas ocurren solo en un pequeño número de los consumidores de dicha fármaco, lo cual hace que la relación beneficio-riesgo de estos compuestos sea aceptable. Por ejemplo, isoniazida es un fármaco con una relación clara entre su consumo y el desarrollo de hepatotoxicidad, presentando la mayor incidencia de daño hepático en países en vías de desarrollo. En el periodo inicial del tratamiento, entre el 15-20% de los individuos que reciben isoniazida, como profilaxis frente a la tuberculosis, desarrollan incrementos en las transaminasas. Estas elevaciones son transitorias produciéndose una estabilización o mejoría de la misma y menos entre el 0,05 y 2 % desarrollan un cuadro de hepatotoxicidad (Nolan, Goldberg et al. 1999; Fountain, Tolley et al. 2005). Un reciente estudio estimó que un 19% de los pacientes perteneciente a este subgrupo desarrolla fallo hepático agudo (Sabate, Ibanez et al. 2007). Aunque esta tasa ha disminuido a lo largo de los años, debido a la mejor adecuación entre los pacientes y las terapias. A pesar de esta reducción, el ratio de presentación de hepatotoxicidad es muy alto comparado a otros productos. No obstante su utilidad en la prevención de la tuberculosis y la falta de alternativas terapéuticas, la decanta como un fármaco muy beneficioso previniendo su retirada.

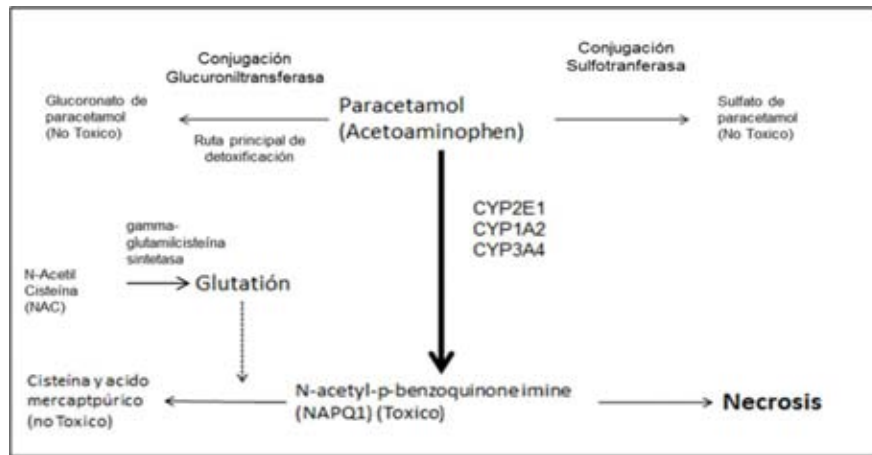


Figura 1. Metabolismo del paracetamol y generación del metabolito tóxico responsable del daño hepático intrínseco.

1.2 CARACTERIZACION DE LA LESION HEPATICA

La primera definición oficial de DILI apareció en 1989, cuando doce expertos en hepatología tanto americanos como europeos lo establecieron, durante un encuentro patrocinado por la farmacéutica Roussel Uclaf en Francia y auspiciado por “Council of International Organizations of Medical Scientists”, crearon la escala de causalidad CIOMS/RUCAM. En este primer encuentro se determinaron una serie de criterios bioquímicos para caracterizar la lesión hepática (Benichou 1990), que fueron revisados y modificados en 2011 (Aithal, Watkins et al. 2011). En esta última revisión, las elevaciones de las transaminasas deben cumplir uno de los siguientes criterios.

1. Alteración de la bioquímica hepática, presentando elevaciones de los valores de alanina aminotransferasa (ALT), cinco veces superiores a su límite superior de la normalidad (LSN).
2. Alteración de la bioquímica hepática, con elevaciones de los valores de fosfatasa alcalina (FA) dos veces por encima del LSN.

- Alteración de la bioquímica hepática, con elevaciones de los valores de ALT tres veces superiores al LSN, conjuntamente con la elevación de bilirrubina total (BT) superior a dos veces el LSN.

1.2.1 CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico de DILI es un proceso complejo, debido a su similitud a enfermedades agudas y crónicas del hígado. A lo anterior se suma la ausencia de biomarcadores diagnósticos que permitan confirmar el diagnóstico de DILI, por lo tanto, este es un diagnóstico por exclusión de otras patologías como infecciones virales, obstrucciones biliares, hepatitis alcohólica (Benichou 1990). Las principales evidencias para el establecimiento del diagnóstico son:

- Existencia de una relación temporal factible entre la exposición a la medicación y la aparición de síntomas del daño hepático. Encontrar esta relación puede ser un proceso arduo, debido a que los episodios DILI pueden aparecer hasta varias semanas después de finalizar el tratamiento, lo que se denomina en este trabajo como inicio diferido de los síntomas o “delayed onset”
- Existencia de una relación temporal factible, entre la retirada del fármaco y la disminución o desaparición de los signos o síntomas de la reacción. Sin embargo, en un pequeño porcentaje de la población la elevación persiste en el tiempo, considerándose crónica (Medina-Caliz, Robles-Diaz et al. 2016). En algunos casos, los síntomas pueden desaparecer cuando la terapia es continuada, esto proceso ha sido descrito en los fármacos antituberculosos y estatinas, siendo denominado un fenómeno de adaptación (Andrade, Lucena et al. 2005; Livertox 2015).
- La existencia de toxicidad hepática previamente documentada para el medicamento, así como su tipo de daño. No obstante, algunos fármacos no poseen un perfil específico de daño (“signature”), lo que dificulta su diagnóstico.

- La exclusión de manera razonable de otras causas alternativas que pudieran producir el daño hepático como hepatitis virales (A, B, C), enfermedades virales como la mononucleosis infecciosa, herpes, obstrucción de las vías biliares o la presencia de lesiones ocupantes de espacio (LOE).

En algunos pacientes, se producen elevaciones de las transaminasas muy leves. Estas elevaciones no llegan al umbral de hepatotoxicidad, por ello no son considerado importante desde el punto de vista clínico. Estas alteraciones fueron la razón para la rectificación de los criterios previos de DILI (Aithal, Watkins et al. 2011). Esto es debido a que un umbral bajo en la definición de DILI puede llevar a innecesarias investigaciones y en algunas ocasiones desembocar en la retirada inapropiada de productos con uso médico.

1.2.2 ESCALAS DIAGNOSTICAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA RELACIÓN DE CAUSALIDAD

Como se ha señalado previamente, el factor crítico en el diagnóstico de ADR es el establecimiento de una relación causal entre el fármaco sospechoso y el evento de toxicidad hepática. En la práctica clínica esto suele resultar difícil, debido al carácter ambiguo de las reacciones, a la ingesta simultánea de más de un producto farmacológico y a la falta de un elemento confirmatorio del diagnóstico.

Desde la primera aproximación a un método operacional para la identificación de ADR (Karch and Lasagna 1977) hasta el momento actual, se han desarrollado varios métodos de evaluación de causalidad, con drásticas diferencias de opinión en relación a su validez. La escala CIOMS/RUCAM, surgió del consenso de un grupo de expertos, los cuales definieron una serie de parámetros para el diagnóstico de hepatotoxicidad (Danan and Benichou 1993) y se ha definido como la más completa en estudios comparativos

(Lucena, Camargo et al. 2001), frente a otras escalas como la creada por María y Victorino (Maria and Victorino 1997)(Fig. 2 y 3).

Evaluación de causalidad de un fármaco en caso de daño hepático agudo. Escala de CIOMS*					
	TIPO HEPATOCELULAR		TIPO COLESTÁSICO O MIXTO		EVALUACIÓN
TIEMPO DESDE INICIO RA					
Incompatible	Reacción ocurre antes de la ingesta del fármaco, o más de 15 días después de finalizar (excepto para fármacos de metabolismo lento)		Reacción ocurre antes de la ingesta del fármaco, o más de 30 días después de finalizar (excepto para fármacos de metabolismo lento)		Sin relación
Desconocido	Cuando la información no está disponible para calcular el tiempo desde el inicio				Insuficiente Documentado
	Tratamiento inicial	Tratamiento subsiguiente	Tratamiento inicial	Tratamiento subsiguiente	PUNTUACIÓN
-Con inicio del tratamiento Sugestivo	5-90 días	1-15 días	5-90 días	1-90 días	+2
Compatible	<5 o >90 días	>15 días	<5 o >90 días	>90 días	+1
-Con final del tratamiento Compatible	<= 15 días	<= 15 días	<= 30 días	<= 30 días	+1
EVOLUCIÓN	Diferencia entre el pico de ALT (SGPT) y el Límite superior de valores normales		Diferencia entre el pico de FA (o TB) y el límite superior de valores normales		
Después de cesar la ingesta					
Altam sugestivo	Disminución >= 50% en 8 días		No aplicable		+3
Sugestivo	Disminución >= 50% en 30 días		Disminución >= 50% en 180 días		+2
Compatible	No aplicable		Disminución < 50% en 180 días		+1
Inconclusivo	No información o disminución >= 50% después del día 30		Persistencia o aumento o no información		0
En contra tipología del fármaco	Disminución <= 50% después del día 30 o incremento recurrente		No situación. No aplicable		-2
Si continua tomado el fármaco					
Inconclusivo	En todas las situaciones		En todas las situaciones		0
FACTORES DE RIESGO	Etanol		Etanol o embarazo		
Presencia					+1
Ausencia					0
Edad >= 55 años					+1
Edad < 55 años					0
TRATAMIENTO CONCOMITANTE					
No o no información o tratamiento concomitante con incompatibilidad desde inicio del tratamiento					0
Tratamiento concomitante compatible o sugestiva con el inicio de tratamiento					-1
Tratamiento concomitante conocido como hepatotóxico y con compatibilidad o sugestivo con el inicio del tratamiento					-2
Tratamiento concomitante con evidencia para este efecto (positivo "rechallenge" o test validado)					-3
BÚSQUEDA DE CAUSAS NO RELACIONADAS CON FÁRMACOS					
Grupo I (6 causas)			Todas las causas (grupo I y II) razonablemente descartadas		+2
Reciente infección viral con VHA (IgM antiVHA) o VHB (IgM anti VHB) o VHC (antiVHC y test no A noB); Obstrucción biliar (ultrasonografía); Alcoholismo (AST/ALT >= 2); Historia reciente de hipotensión aguda (particularmente si hay enfermedad cardíaca)			Las 6 causas del grupo I razonablemente descartadas		+1
Grupo II			4 ó 5 causas del grupo I razonablemente descartadas		0
Complicaciones de enfermedad subyacente; Clínica y/o biológico Contexto sugerente de infección por CMV, EBV o Herpes virus			Menos de 4 causas del grupo I razonablemente descartadas		-2
			Causas no farmacológicas altamente probable		-3
INFORMACIÓN PREVIA DE HEPATOTOXICIDAD DEL FÁRMACO					
Reacción identificada en la ficha técnica del producto					+2
Reacción publicada pero no identificada en la ficha técnica					+1
Reacción desconocida					0
RESPUESTA A LA READMINISTRACIÓN					
Positiva	Duplica ALT con el fármaco a solas		Duplica FA (o TB) con el fármaco a solas		+3
Compatible	Duplica ALT con los fármacos juntos		Duplica FA (o TB) con los fármacos juntos		+1
	Dados al mismo tiempo en la primera introducción		Dados al mismo tiempo en la primera introducción		
Negativa	Incremento de ALT pero menor que en las mismas condiciones para la primera administración		Incremento de FA (o TB) pero menor que en las mismas condiciones para la primera administración		-2
No dada o no interpretable	Otras situaciones		Otras situaciones		0
Total (Suma de las puntuaciones marcadas)					
La puntuación total puede ser clasificada en 5 categorías: TOTAL <= 0 excluido; 1-2 improbable; 3-5 posible; 6-8 probable; superior a 8 altamente probable.					
* Council for the International Organization of Medical Sciences.					

Figura 2. Escala de causalidad de CIOMS/RUCAM

Escala diagn3stica de hepatotoxicidad de Mar3a y Victorino. Puntuaci3n.	
1.RELACION TEMPORAL ENTRE LA INGESTA DEL F3RMACO Y EL INICIO DEL CUADRO CL3NICO	
Tiempo desde la ingesta hasta inicio de primera manifestaci3n cl3nica o de laboratorio: 4 d3as a 8 semanas (o menos de 4 d3as en reexposici3n)	3
Menos de 4 d3as o m3s de 8 semanas	1
Tiempo desde la retirada del f3rmaco hasta el inicio de manifestaci3n	
0 a 7 d3as	3
8 a 15 d3as	0
m3s de 15 d3as	-3
Tiempo desde la retirada del f3rmaco hasta la normalizaci3n de los valores de laboratorio (por debajo de dos veces el l3mite superior normal)	
Menos de 6 meses (patr3n mixto-colest3sico) 3 < 2 meses (hepatocelular)	3
M3s de 6 3 2 meses	0
2.EXCLUSI3N DE CAUSAS ALTERNATIVAS	
Hepatitis viral (HAV, HBV, HCV, CMV, EBV), enfermedad alcoh3lica, obstrucci3n biliar, Enfermedad hep3tica preexistente, otras (seg3n caso)	
Exclusi3n completa	3
Exclusi3n parcial	0
Causa alternativa posible detectada	-1
Causa alternativa probable detectada	-3
3.MANIFESTACIONES EXTRAHEPATICAS	
Rash, fiebre, artralgias, eosinofilia (>6%), citopenia.	
4 o m3s	3
2 3 3	2
1	1
Ninguna	0
4.REEXPOSICI3N INTENCIONADA O ACCIDENTAL AL F3RMACO	
Test de reexposici3n positivo	3
Test de reexposici3n negativo o ausente	0
5.CASOS DE REACCION ADVERSA HEP3TICA CON EL F3RMACO PUBLICADOS PREVIAMENTE	
SI	2
NO (comercializada en los 5 a3os previos)	0
NO (comercializada m3s de 5 a3os previos)	-3
Categor3as de probabilidad: Definida: > 17; Probable: 14-17; Posible: 10-13; Dudosa: 6-9; Excluida < 6	

Figura 3. Escala de causalidad de Mar3a & Victorino

1.2.3 TIPO DE DAÑO HEPÁTICO I. PERFIL BIOQUÍMICO

DILI se manifiesta en la mayoría de los pacientes, como un proceso relacionado con la muerte celular de los hepatocitos (daño hepatocelular) (Andrade, Lucena et al. 2005). Sin embargo, en una minoría de casos, los fármacos producen su toxicidad principalmente en los conductos biliares o en el canalículo causando colestasis (tipo colestásico) siendo el daño hepatocelular menor. En algunos casos estas líneas no están bien definidas y no se manifiesta un perfil único de daño, viéndose afectadas múltiples células y presentando características híbridas entre ambos tipos de daño (tipo mixto). La distinción entre los diferentes perfiles de daño se sustenta principalmente en la evaluación histológica de los tejidos, sin embargo esta técnica es muy invasiva, lo cual hace imposible su uso como técnica de rutina. Por ello la estimación indirecta del daño, a través de los valores bioquímicos, es el mecanismo principal para la determinación del daño (Aithal, Watkins et al. 2011). Un elemento importante a la hora de determinar el tipo de daño es el tiempo desde el inicio de los síntomas. Ya que en muchos casos el tipo de daño se cambia con el paso del tiempo entre los diferentes perfiles. Por ello la valoración del tipo de daño hepático debe realizarse al inicio de la reacción. Para su cálculo se usa el valor de ratio (R), el cual corresponde al cociente entre los valores de ALT normalizados frente a los valores de FA normalizada, usando para dicha normalización el LSN.

$$R = \frac{ALT/LSN}{FA/LSN}$$

Según el valor de R los casos de hepatotoxicidad son clasificados como:

- Hepatocelulares

El daño hepatocelular es definido como una elevación del coeficiente R mayor o igual a 5, o cuando cumpliendo criterios DILI, el denominador es igual o inferior a la unidad.

- **Colestásico**

El daño colestásico es definido como una elevación de este coeficiente igual o inferior a 2, o cuando cumpliendo criterios DILI, el numerador es igual o inferior a la unidad

- **Mixto**

El daño mixto es definido cuando el valor en el ratio de ALT y FA se encuentra comprendido entre 2 y 5, excluyendo ambos valores.

Las biopsias hepáticas son usadas como herramienta confirmadoras del perfil bioquímico, siempre que hayan sido obtenidas en los momentos iniciales de la lesión. Debido a su limitado número es imposible utilizarlas como herramienta clasificadora, pese a ofrecer una información más útil y valiosa, como la presencia de lesiones zonales, esteatosis microvesicular, colestasis y necrosis.

1.2.4 TIPO DE DAÑO HEPÁTICO II. PRESENTACIÓN CLÍNICA

Daño hepatocelular

El daño hepatocelular es el más común de los diferentes tipos de daño hepático inducido por fármacos, presentándose en el 60% de la población general (Andrade, Lucena et al. 2005). No obstante, según el grupo farmacológico inductor esto puede variar notablemente. Mientras que solo el 36 % en los casos imputados a amoxicilina-clavulánico (AC) son hepatocelulares, este valor alcanza el 90% de los casos debidos a remedios herbales. (Lucena, Andrade et al. 2006; Garcia-Cortes, Borraz et al. 2008). Este tipo de lesión se caracteriza por un perfil de elevaciones bioquímicas en las que predomina el incremento de ALT y/o aspartato aminotransferasa (AST).

Los hallazgos histológicos incluyen necrosis e infiltración celular. La necrosis puede ser zonal o difusa, cuando se da inflamación zonal suelen verse afectadas la zona 3 (centrolobular) o la zona 1 (periportal). Diferentes compuestos han manifestado preponderancia a desarrollar un tipo u otro de necrosis, así la necrosis en la zona 3 suele aparecer en el daño inducido por paracetamol (Heubi, Barbacci et al. 1998), mientras que la lesión por halotano suele presentar necrosis difusa (Benjamin, Goodman et al. 1985).

En reglas generales la mayoría de los medicamentos inductores de daño hepatocelular presentan una necrosis zonal (Kleiner, Chalasani et al. 2014). Indiferentemente de que el tipo de necrosis presentada sea zonal o no, ambas pueden desembocar en necrosis masiva.

Daño colestásico

La colestasis, en general, es definida como un problema en el tránsito de la bilis hasta alcanzar el duodeno, independientemente de la zona afectada. Existen dos vías diferenciadas de producción de la lesión. Por un lado pueden existir problemas en la secreción biliar de los hepatocitos o por otro lado puede generarse daños en los conductos independientemente de su tipo (septales o lobulillares) que produce la estasis de la bilis. En raras ocasiones los fármacos pueden causar también obstrucciones extrahepáticas de los conductos biliares induciendo colangitis esclerosante (Erlinger 1997). Aunque todas las colestasis suelen manifestar síntomas similares como la ictericia y el prurito, se suelen distinguir dos principales tipos de lesión colestásica. La **colestasis pura** la cual no presenta síntomas de hepatitis y que se ha relacionada con solo un pequeño grupo de fármacos como hormonas anticonceptivas, hormonas esteroideas o antagonistas de hormonas sexuales (Velayudham and Farrell 2003). La **colestasis con hepatitis** también denominada colestasis hepatocanalicular, en esta forma la colestasis se acompaña de inflamación portal y varios estadios de necrosis hepática, el fármaco ejemplo de este tipo de colestasis es la clorpromazina (Padda, Sanchez et al. 2011).

Daño mixto

Las formas de daño mixto en el daño hepático inducido por fármacos puede ser principalmente hepatocelular acompañado de algunas manifestaciones de colestasis o por el contrario puede ser un daño de tipo principalmente colestásico con fenómenos inflamatorios y muerte celular. Esta variabilidad, junto a la incidencia más baja dentro de los tres tipos de daño provoca que esta categoría sea la peor definida hasta el momento siendo un importante factor de confusión en el estudio de la hepatotoxicidad.

Síntomas de hipersensibilidad

Todos los tipos de daño previos pueden aparecer acompañados de síntomas relacionados con fenómenos de hipersensibilidad. En esta categoría se engloban los síntomas de fiebre, eosinofilia, linfopenia y rash. Esta hepatitis con hipersensibilidad puede confundirse con una enfermedad viral o bacteriana. Así la sintomatología puede emular a la mononucleosis infecciosa o a la faringitis estreptocócica. En raros casos, cuando el agente causal no es retirado, los síntomas pueden degenerar en una forma severa del síndrome de Stevens-Johnson. Los mecanismos responsables que vinculan los síntomas de hipersensibilidad y las reacciones hepatotóxicas permanecen en la oscuridad, pero se ha postulado la existencia de procesos de haptización mediante la unión de fármacos y proteínas del paciente (Ariza, Garzon et al. 2012).

1.2.5 GRAVEDAD DE LA LESIÓN INDUCIDA POR FÁRMACOS

Dentro del estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos, uno de los puntos que más interés suscita es poder predecir la evolución de los pacientes y adecuar las terapias para minimizar el riesgo. Hasta el momento no es posible predecir este riesgo, ya que las elevaciones de las enzimas hepáticas (ALT, AST, FA) no reflejan la gravedad de la lesión. Además ninguno de los modelos pronósticos validados hasta el momento para otras patologías (puntuación de Child-Pugh, Criterios del King's College para el trasplante hepático, MELD y sus modificaciones y UKELD) ha demostrado tener capacidad pronóstica en este tipo de lesión. Sin embargo, si existen algunas tentativas de escalas clasificatorias, así en 2011 se estableció, un sistema de clasificación del daño en función de sus valores bioquímicos y de evolución, que pretende clasificar a los pacientes en función de su mejor o peor pronóstico (Aithal, Watkins et al. 2011). En esta clasificación existen cuatro categorías:

- ❖ Leve: Casos que cumplen criterios DILI los cuales únicamente poseen elevación de las transaminasas y FA, en los BT sea $<2xLSN$.
- ❖ Moderada: Casos con criterios DILI en los cuales junto a la elevación de las transaminasas y FA se produce elevación de la BT igual o superior a dos veces el límite superior de la normalidad.
- ❖ Grave: Son aquellos casos que cumpliendo los criterios para casos moderados poseen además afectación de otros órganos, coagulopatía ($INR \geq 1,5$) o encefalopatía.
- ❖ Fatal: Aquellos pacientes con fallo hepático fulminante o trasplante hepático como consecuencia del episodio DILI.

Estas categorías pretenden clasificar el daño de la reacción hepática, para ello utilizan parámetros de evolución de la enfermedad Junto a ellos, se utilizan mecanismos predictores que intentan caracterizar el riesgo fallo hepático fulminante de manera temprana.

Otro de los primeros métodos predictores de fallo hepático fulminante que ha demostrado cierto grado de validez en hepatotoxicidad, fue desarrollado a partir de las observaciones de Hyman Zimmerman, en las cuales constato que el daño hepatocelular con altos niveles de bilirrubina indicaban una reacción seria y mayor probabilidad de desarrollar fallo hepático fulminante. Este método predictor es conocido como la ley de Hy (Hy's Law) (Reuben 2004). No obstante esta ley, posee dos importantes problemas, por un lado, descarta la gravedad de los casos colestásicos y mixtos, por el otro, sobrevalora el riesgo de muchos casos hepatocelulares debido a su baja especificidad, por lo que se han buscado otros métodos que superen estas dificultades. En esta línea un reciente estudio estableció un método de predicción a partir de variables bioquímicas con mayor especificidad pero menor sensibilidad, en este se establecían cuatro grupos de gravedad en función de dos diferentes variables. Dos de los grupos presentaban alto riesgo de fallo hepático fulminante. El primer grupo estaba conformado por pacientes que poseían AST por encima de $17,3xLSN$ y BT con valores mayores de $6,6xLSN$. El segundo grupo de riesgo eran los pacientes con valores de AST iguales o menores a $17,3xLSN$ y cociente AST/ALT superior a 1,5. (Robles-Diaz, Lucena et al. 2014) (Fig. 4).

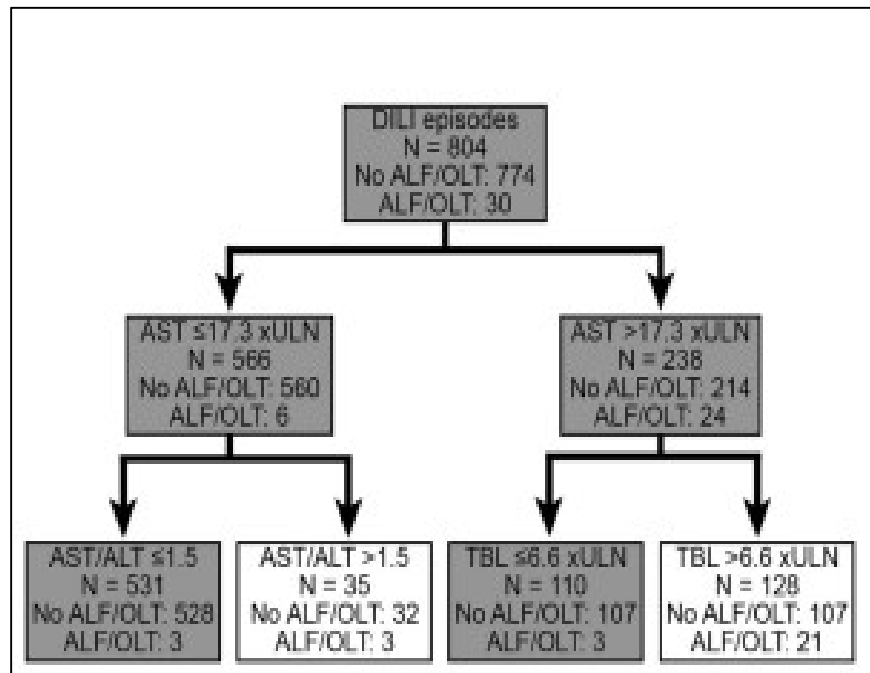


Figura 4. Algoritmo para predecir el riesgo de desarrollar fallo hepático fulminante en pacientes de DILI (Robles-Díaz, Lucena et al. 2014)

1.3 POTENCIAL TOXICO DE LOS FÁRMACOS EN DILI

La frecuencia de los fármacos vinculados a eventos de hepatotoxicidad ha cambiado a lo largo de los años y es diferente de unos países a otros, por ejemplo, nimesulida en la actualidad está prohibida en España, pero se ha mantenido su consumo en Latinoamérica. En los años 60, la causa más frecuente de ictericia por fármacos era la clorpromazina, sin embargo fue sustituida por el halotano entre los 70 y los 80, siendo actualmente los antiinfectivos (Bessone, Hernandez et al. 2016).

Este cambio en la toxicidad está condicionado por el relevo de los agentes terapéuticos en los mercados y las acciones reguladores de las agencias, que han retirado algunos productos o han sido relegados por otros con mejor relación beneficioso riesgo. En la tabla 1 y 2 se exponen los fármacos retirados en España por su potencial hepatotóxico y los fármacos no autorizados. Los principales productos relacionados con DILI en la actualidad son:

Antibacterianos

Penicilinas y cefalosporinas

Amoxicilina-clavulánico (AC): La hepatotoxicidad de AC es la lesión hepática inducida por fármacos más frecuente, reportado en la actualidad. En 1992 se diagnosticaba 1 caso por cada 100.000 pacientes/año (Larrey, Vial et al. 1992), en 1996 la incidencia era 10 por cada 100.000 pacientes/año (García Rodríguez, Stricker et al. 1996) y en los últimos años ese número ha aumentado hasta 43 por cada 100.000 pacientes/año (Bjornsson, Bergmann et al. 2013). En los estudios previos realizados, se ha observado que presenta principalmente lesión colestásica con signos de hipersensibilidad, la aparición de los síntomas se produce de 1 a 4 semanas después de iniciar el tratamiento (Lucena, Andrade et al. 2006). La mayoría de los pacientes sufre episodios con limitada gravedad que se recuperan de manera espontánea. Aunque se ha sugerido que la toxicidad de ambos compuestos es mayor que la de amoxicilina administrado de manera aislada, ya que existe una mayor incidencia de los casos por ambos compuestos. No obstante existen estudios que parecen mostrar igual riesgo para ambos tipos de administración (Maggini, Raschetti et al. 1999). Estudios genéticos parecen mostraron una predisposición genética al daño por este compuesto, relacionada con las moléculas HLA, en concreto con el haplotipo DRB1*1501-DRB5*0101-DQB1*0602 (Hautekeete, Horsmans et al. 1999; O'Donohue, Oien et al. 2000; Lucena, Molokhia et al. 2011).

Cefalosporinas: Las cefalosporinas se derivan de las penicilinas. La hepatotoxicidad de cefalosporinas es bastante inusual. Asociándose principalmente con fenómenos de ictericia (Eggleston and Belandres 1985; Bickford and Spencer 2005). La enfermedad se presenta como colestasis o hepatitis granulomatosa con una latencia de 1 a 4 semanas. La ceftriaxona se excreta predominantemente en la bilis y se han asociado con barro biliar y pseudolitiasis, debido a la precipitación de una sal de calcio con el fármaco (Shiffman, Keith et al. 1990).

Macrólidos

Eritromicina: La hepatotoxicidad de eritromicina es bien conocida desde hace décadas. Estos casos presentan hepatitis predominantemente con una incidencia de 3,6 casos por 100.000 pacientes (Derby, Jick et al. 1993). Tanto la presencia de ductopenia como la desaparición de las vías biliares han sido reportadas (Degott, Feldmann et al. 1992).

Nitrofurantoina: Nitrofurantoina ha mostrado una amplia gama de manifestaciones de hepatotoxicidad, además es uno de los fármacos que se relaciona usualmente con los fenómenos de hepatitis autoinmune (Castiella, Zapata et al. 2014). A pesar de ello, la nitrofurantoina muestra casos de hepatotoxicidad aguda que se asemejan a hepatitis autoinmune. Estos casos suelen ocurrir dentro de las 6 semanas de tratamiento, a menudo acompañado de fiebre, erupción y eosinofilia (Czaja 2011). Además la prolongada administración de nitrofurantoina, para las infecciones recurrentes, pueden conducir a hepatitis crónica con características serológicas e histológicas de hepatitis autoinmune (Stricker, Blok et al. 1988; Cetti, Venn et al. 2009).

Azitromicina: Azitromicina es un fármaco con similaridad estructural a eritromicina, que posee un amplio uso en adultos y en niños. Entre sus usos más frecuentes están el tratamiento de faringitis y otitis. Por ello la toxicidad de este fármaco ha sido relacionada principalmente con niños, siendo un 10% de los casos DILI diagnosticado en niños (Molleston, Fontana et al. 2011) y un 2% de los casos diagnosticados en adultos (Chalasan, Bonkovsky et al. 2015). La lesión hepática es principalmente fibrosis de tipo moderado y colestasis intrahepática.

Quinolonas

Trovafloxacino: Trovafloxacino muestra un alto potencial hepatotóxico. Han sido reportados hasta 2006, más de 150 casos de toxicidad hepática y 57 insuficiencia hepática aguda, que desembocaron en el fallecimiento del paciente. (Bjornsson and Olsson 2006). Este medicamento al igual que otras quinolonas está sometido a severas restricciones en su utilización en Estados Unidos y completamente retirado en Europa.

Sulfonamidas y trimetropin.

Se ha descrito una amplia gama de lesiones hepáticas debida a las sulfonamidas, incluyendo hepatitis granulomatosa, así como la posible progresión a enfermedades crónicas del hígado (Alberti-Flor, Hernandez et al. 1989). Este daño se suele manifestar frecuentemente con exantema, fiebre y eosinofilia, especialmente en pacientes coinfectados con el virus del VIH.

Cotrimoxazol: Cotrimoxazol es un fármaco reconocido por causar daño colestásico, que en raros casos degenera en insuficiencia hepática aguda. Cotrimoxazol también se ha asociado con la presentación de colestasis con fosfolipidosis (Munoz, Martinez-Hernandez et al. 1990).

Agentes antituberculosos

Los tratamientos antituberculosos en combinación son una de las causas más frecuentes de elevación de transaminasas, diferentes estudios han establecido que un 10-20% de los pacientes tratados con antituberculosos pueden desarrollar estas elevaciones. Sin embargo, estas elevaciones raramente superan el umbral de 300 U/L, a diferencia de lo que ocurre con los cuadros de hepatotoxicidad, en los cuales se alcanza valores muy superiores. El hecho de que se suministren en terapias combinadas dificulta el esclarecimiento de la importancia de cada fármaco en la reacción adversa.

Isoniazida: Isoniazida es uno de los compuestos que más frecuentemente causa hepatotoxicidad, usualmente se asocia con otros antituberculosos. Aproximadamente el diez por ciento de las personas tratadas desarrollan elevaciones de las transaminasas, que persisten en el tiempo. Estas elevaciones no desarrollan sintomatología o cuando la presentan remite espontáneamente, a pesar del uso continuado del medicamento, se supone que como consecuencia de la adaptación metabólica. La mayoría de los pacientes desarrollan lesión hepática hepatocelular aguda con necrosis focal e inflamación portal. Se han notificado algunos casos asociados con insuficiencia hepática (Scharer and Smith 1969; Salpeter 1993).

Rifampicina: Rifampicina raramente produce caso de toxicidad severa o de hepatitis siendo estas inferiores al 1% (Menzies, Long et al. 2008). No obstante, se han observado procesos de hiperbilirrubinemia secundaria tribuidos a una hemólisis inducida por el fármaco (Gordin, Cohn et al. 2004). Especialmente en pacientes con enfermedades hepáticas de base como cirrosis.

Pirazinamida: Este compuesto se considera que causa hepatotoxicidad dosis-dependiente, aunque los últimos estudios no han encontrado diferencias significativas en la frecuencia de hepatotoxicidad, pero si una tendencia a aumentar a dosis elevadas (Pasipanodya and Gumbo 2010). Sin embargo, debido a que normalmente se combina con isoniazida y rifampicina, ha sido difícil establecer su participación en el desarrollo de hepatotoxicidad. Sin embargo, los sujetos que recibieron regímenes con pirazinamida parecen estar en mayor riesgo de hepatotoxicidad y podrían sufrir una lesión hepática más grave (Durand, Pessayre et al. 1995; Singh, Arora et al. 1995).

Etambutol: Hay una gran discrepancia sobre el papel del etambutol en la toxicidad hepática, variando su consideración entre “sin efecto hepatotóxico” (Kumar, Kedarisetty et al. 2014) y “alta hepatotoxicidad” (Chen, Vijay et al. 2011). Debido a que la hepatotoxicidad asociada al etambutol está siempre relacionada con la ingesta de otros fármacos antituberculosos. La ausencia de los casos aislados sugiere la ausencia de toxicidad directa, aunque podría estimular la hepatotoxicidad de otros agentes antituberculosos.

Agentes antifúngicos

Los azoles son agentes antifúngicos cuya función es ser inhibidores potentes de CYP3A. Y que usualmente son inhibidores de otras isoenzimas CYP.

Ketoconazol: El tratamiento con ketoconazol induce la elevación del perfil bioquímico hepático, en un 10% de los pacientes tratados. Las reacciones adversas a ketoconazol son más frecuentes en las mujeres y en personas mayores de 40. La mayoría desarrollan lesión hepatocelular aguda con necrosis centrolobulillar, aunque la hepatitis colestásica también puede ocurrir (Chien, Yang et al. 1997).

Fluconazol: El Fluconazol al igual que el ketoconazol, puede causar leves anomalías bioquímicas durante el tratamiento, pero la lesión hepática significativa es poco habitual (Bjornsson and Davidsdottir 2009).

Antirretrovirales

Inhibidores de la proteasa.

Todos los inhibidores de la proteasa son metabolizados mayoritariamente por CYP3A4 (Horita and Doi 2014) y se han asociado con hepatotoxicidad. Los más conocidos son:

Ritonavir: Este fármaco consumido a dosis altas ha sido relacionado con la aparición de hepatotoxicidad grave. Este fármaco ha sido sometido a medidas reguladoras por varias agencias en 2006 y se han publicado avisos para los pacientes que tomaron tipranavir y ritonavir, particularmente para pacientes con coinfección por VHB o VHC (Becker 2004).

Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Ibuprofeno: Ibuprofeno es el segundo fármaco individual en frecuencia de DILI en España, que permanece actualmente en el mercado (Andrade, Lucena et al. 2005). En otros países su relación con hepatotoxicidad es por el contrario anecdótica, probablemente debido a diferencias en las pautas de prescripción del tratamiento. En los casos de toxicidad por Ibuprofeno, las reacciones son leves con aumento moderado de las aminotransferasas y sintomatología leve. Sin embargo, hay informes de daño hepático grave e incluso mortal (A. Gonzalez-Jimenez 2016). Además se ha asociado un caso con el síndrome de Stevens-Johnson (Javier Rodriguez-Gonzalez, Montero et al. 2002).

Nimesulida: Nimesulida ha sido retirado en varios países (España, Argentina, México) debido a su hepatotoxicidad. Además existe una recomendación de la Agencia europea del medicamento para abandonar su prescripción. Hay informes tanto de lesión hepática hepatocelular como colestásica, que suele aparecer dentro de las 15 semanas de administración del fármaco. (Andrade, Lucena et al. 2000).

Diclofenaco: Este compuesto ha sido relacionado con hepatotoxicidad, tanto en elevaciones leves de aminotransferasas como en casos de hepatotoxicidad grave, incluyendo algunos casos fatales. Generalmente la lesión se produce entre 3 y 6 meses después del comienzo del tratamiento. El patrón de la lesión es variopinto, con casos hepatocelulares, colestásicos y con manifestaciones similares a la hepatitis autoinmune (Scully, Clarke et al. 1993; Bessone 2010). Aunque en el Spanish DILI registry todos los casos reportados son hepatocelulares. (A. Gonzalez-Jimenez 2016)

Celecoxib: Varios ensayos controlados han identificado elevaciones leves de aminotransferasas. Además hay reportes de diferentes tipos de lesión tanto hepatocelular como colestásica. Se presenta principalmente en mujeres, hasta 4 semanas después de comenzar el medicamento (Rostom, Goldkind et al. 2005). Este medicamento junto con otros inhibidores de COX-2 ha sido sometido a fuertes medidas reguladoras tanto en España como en Estados Unidos desde 2005.

Nucleósidos inhibidores de transcriptasa inversa

Estos medicamentos se asocian con frecuencia a manifestaciones leves o asintomáticas de hepatotoxicidad, la lesión hepática significativa es rara. (Ogedegbe and Sulkowski 2003).

Nevirapina: Nevirapina se asocia con una alta tasa de hepatotoxicidad con características de hipersensibilidad y lesiones epiteliales a las pocas semanas de iniciar el tratamiento. Los factores de riesgo incluyen la coinfección de VHB y VHC asociadas a niveles de CD4 más altos (Sulkowski, Thomas et al. 2002).

Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA).

Captopril: Captopril es un fármaco cardiovascular reportado como desencadenante de daño hepático en España, aunque su hepatotoxicidad en otros países es anecdótica (Suzuki, Andrade et al. 2010). La mayoría de los IECA producen un tipo similar de hepatotoxicidad, la lesión hepática presenta ambos tipos de daño, hepatocelular o colestásico, habitualmente relacionado con síntomas de fiebre, mialgia y erupción cutánea (Hagley, Hulisz et al. 1993).

Metildopa: La metildopa se ha utilizado habitualmente como agente antihipertensivo, aunque presenta numerosos efectos adversos conocidos, incluyendo hepatotoxicidad. La lesión hepática se presenta típicamente a los pocos meses de iniciar el tratamiento, aunque algunos casos de hepatotoxicidad ocurren muchos después, incluso después de años de tratamiento continuo. Estos pacientes a menudo presentan autoanticuerpos detectables (ANA) (Kashkooli, Baraty et al. 2014) o una anemia hemolítica positiva de Coombs (Neuberger, Kenna et al. 1985).

Amiodarona: Este antiarrítmico es de uso extendido y suele conducir a aumentos leves del perfil bioquímico, en un 15-25% de los pacientes tratados. Algunos pacientes pueden desarrollar un patrón de lesión crónica con esteatosis hepática, fibrosis y cuerpos de Mallory, simulando una enfermedad hepática alcohólica. La mayoría de estos pacientes han recibido altas dosis diarias y desarrollaron una fosfolipidosis en los lisosomas hepáticos presumiblemente debido a la larga vida media y lipofilia prolongada del fármaco (Lewis, Ranard et al. 1989).

Anticonvulsivos

Al igual que ocurre con los fármacos antituberculosos estos fármacos son suministrados usualmente en combinación. Esto conlleva que la evaluación de causalidad sea particularmente difícil.

Carbamazepina: Usualmente se ha reportado a carbamazepina como causante de aumentos leves de las enzimas hepáticas, aunque existen reportes de varios niños con fallo hepático fulminante, relacionados con un fenómeno inmunológico con presencia de rash y fiebre (Hadzic, Portmann et al. 1990).

Ácido valproico: El ácido valproico es un anticonvulsivo usado en pacientes con trastorno bipolar y migraña. Las manifestaciones clínicas pueden incluir necrosis hepática severa y esteatosis microvesicular. La mayor frecuencia de daño hepático se produce dentro de los 6 meses de comenzar el consumo de los medicamentos (Zimmerman and Ishak 1982).

Antidepresivos

Muchos fármacos psicoactivos pueden causar hepatotoxicidad. Los antidepresivos tricíclicos pueden inducir lesión hepática colestásica e incluso colestasis prolongada, la lesión hepatocelular es menos frecuente.

Fluoxetina: Fluotexina es un inhibidor de la recaptación de serotonina. Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina son inhibidores selectivos de las isoenzimas CYP y pueden dar lugar a interacciones entre medicamentos. Hay algunos casos reportados de hepatitis por fluoxetina con inicio de los síntomas entre 5 días y 7 meses del comienzo del tratamiento. (Capella, Bruguera et al. 1999).

Agentes antidiabéticos

Tiazolidinedionas.

Estos agentes sensibilizadores de insulina mejoran la captación de glucosa periférica y ayudan a reducir los triglicéridos, En la actualidad todos las *tiazolidinedionas* tienen su uso restringido o han sido retiradas del mercado por diversas causas.

Rosiglitazona: En los ensayos clínicos este compuesto ha mostrado aumento de las tasas de aminotransferasa sérica pero esas elevaciones no son diferentes del placebo. No obstante, han aparecido informes posteriores de hepatotoxicidad. Una revisión identificó 11 casos de insuficiencia hepática atribuidos a este agente y 10 al compuesto pioglitazona. Estos se produjeron después de una mediana de 6 semanas de consumo. (Floyd JS 2009)

Hipolipemiantes

Fibratos: Estos compuestos están asociados con elevaciones de aminotransferasa leves, sin cambios morfológicos significativos. Sin embargo, un caso reportado mostró colestasis hepatocelular y necrosis focal, relacionada con una posible interacción con raloxifeno (Lucena, Andrade et al. 2006).

Estatinas: Estos inhibidores de HMC-Coenzima-A reductasa rara vez se asocia con hepatotoxicidad grave. En los ensayos clínicos, las estatinas se asocian con aumentos de la ALT sérica leves hasta en un 3% de los pacientes tratados. (Chalasani 2005). Además un estudio de 40 casos de hepatotoxicidad por estatinas, mostró que el 57% eran mujeres, la mayoría tenían entre cincuenta y sesenta años, presentando una lesión hepatocelular durante la presentación (Russo, Scobey et al. 2009).

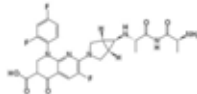
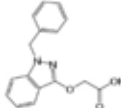
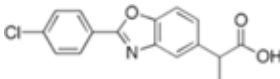
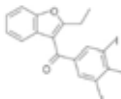
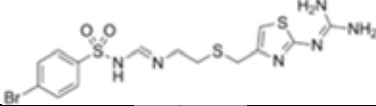
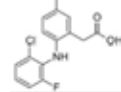
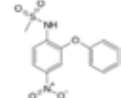
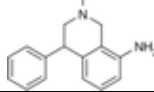
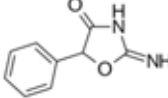
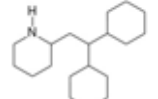
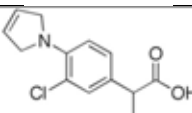
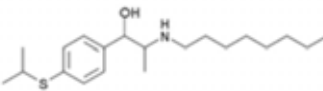
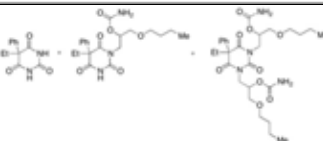
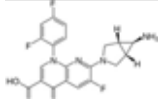
Otros hipolipemiantes

Ezetimiba: La ezetimiba inhibe la absorción intestinal de colesterol y se ha utilizado solo o en combinaciones con otros agentes. Se han reportado varios casos graves de hepatotoxicidad de ezetimiba combinado con simvastatina (Stolk, Becx et al. 2006; Tuteja, Pysopoulos et al. 2008).

Preparaciones a base de plantas y suplementos dietéticos

Muchos de los productos a base de hierbas son utilizados especialmente en tratamiento dietéticos y son considerados seguros, desde el punto de vista de los consumidores, debido al hecho de que son naturales. Sin embargo, al igual que los fármacos, los cuales son derivados de las plantas, estas poseen reacciones adversas. En "Spanish DILI registry" se han detectado numerosos casos de daño hepático por productos herbales, aunque ninguno de ellos ha desarrollado fallo hepático hasta el momento (Garcia-Cortes, Borraz et al. 2008). El tipo de lesión es preferentemente hepatocelular.

Tabla 1. Principales compuestos retirados del mercado español por hepatotoxicidad

Nombre del compuesto	Índice terapéutico	Estructura	Año de retirada
Alatrofloxacino mesilato	Antibiótico		2006
Bendazac	Antiinflamatorio		1993
Benoxaprofeno	Antiinflamatorio		1982
Benziodarona	Vasodilatador		1964
Ebrotidina	H2 antagonista		1998
Lumiracoxib*	Antiinflamatorio		2008
Nimesulida	Antiinflamatorio		2002
Nomifensina	Inhibidor recaptación norepinefrina		1986
Pemolina	Psicoestimulante		2005
Perhexilina	Tratamiento cardiaco		1985
Pirprofeno	Antiinflamatorio		1990
Suloctidil	Vasodilatador		1985
Tetrabamato	Mio-relajante		2002
Trovafloxacino	Antibiótico		2001

*Producto no retirado, pero sin comercialización autorizada.

Tabla 2. Principales compuestos **no autorizados** en el mercado español por hepatotoxicidad.

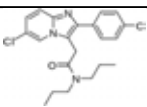
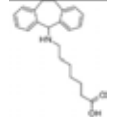

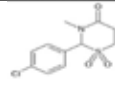
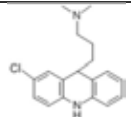
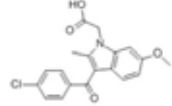
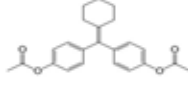
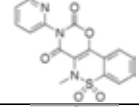
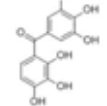
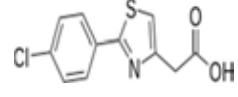
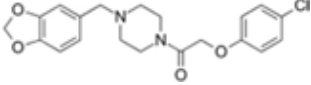
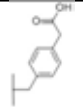
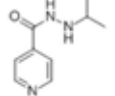
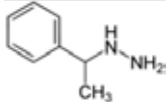
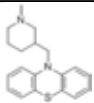
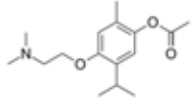
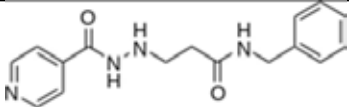
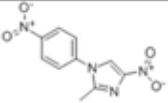
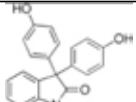
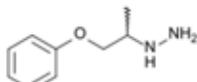
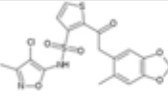
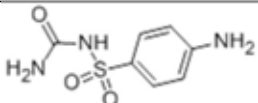
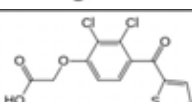
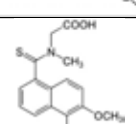
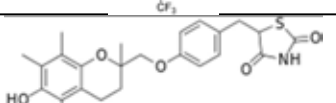
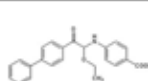
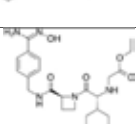
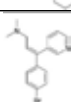
Nombre del compuesto	Índice terapéutico	Estructura
Alpidem	Ansiolítico	
Amineptina	Antidepresivo	
Benzarona	Anti gotoso	
Clormezanona	Ansiolítico	
Clomacran	Ansiolítico	
Clometacina	Antiinflamatorio	
Ciclofenilo	Modulador del receptor estrogénico	
Droxicam	Antiinflamatorio	
Exifona	Enf. De Parkinson	
Ácido Fenclozico	Analgésico	
Fipexida	Psicoestimulante	
Ibufenaco	Analgésico	
Iproniazida	Inhibidor no selectivo de la monoamino oxidasa	

Tabla 2 Continuacion.

Mebanzina	Inhibidor de la monoamino oxidasa	
Mepazina	Tranquilizante	
Moxisilita	Antagonista alfa adrenérgico	
Nialamida	Inhibidor de la monoamino oxidasa	
Nitrefazol	Tratamiento del alcoholismo	
Oxifenisatina	Laxante	
Fenopropazina	Inhibidor de la monoamino oxidasa	
Sitaxsentán	Tratamiento de la hipertensión arterial	
Sulfacarbamida	Antidiabético	
Ticrinafeno	Diurético	
Tolrestat	Inhibidor aldosa reductasa	
Troglitazona	Antidiabético	
Ácido Xenazoico	Antiviral	
Ximelagatran	Anticoagulante	
Zimelidina	Inhibidor de la recaptación de la serotonina	

1.4 METABOLISMO DE LOS FARMACOS EN EL HIGADO

Visión Global

El hígado juega un papel importante en el metabolismo y la biotransformación de gran parte de los fármacos, debido a su posición estratégica entre la vía enteral y la circulación sistémica, convirtiéndose en una ruta obligada para todos los compuestos absorbidos por el tracto digestivo. Los compuestos son metabolizados gracias al concurso de diversos sistemas enzimáticos, presentes en el hepatocito, para posteriormente ser eliminados por vía renal o biliar. Este proceso denominado biotransformación se divide para su estudio en tres fases:

Las reacciones de fase I, son reacciones principalmente de oxidación, hidrólisis y reducción. Su objetivo es la creación o modificación de grupos funcionales. Estos cambios tiene la función de incrementar la solubilidad del metabolito y facilitar su expulsión por la vía biliar o urinaria. El principal sistema enzimático de esta fase es el citocromo P-450 (CYP), una superfamilia de hemoproteínas las cuales incorporan moléculas de oxígeno a sustratos lipofílicos. Esta superfamilia posee especificidad de sustrato que reside en la región apoproteica. Los fármacos poseen especificidad por diferentes isoenzimas en función de su metabolismo. En este primer paso del metabolismo se pueden producir sustancias potencialmente tóxicas. Por ello a esta fase se la ha denominado también fase “toxificadora”.

Las reacciones de fase II, son reacciones de conjugación de metabolitos activos con sustratos endógenos tales como el ácido glucurónico, acético o sulfúrico, cuya misión es estabilizar los metabolitos activos generados por las proteínas de fase I. Es un proceso que se conoce como bioinactivación o fase “detoxificadora”. Los enzimas principales de esta fase son el glutatión-s-transferasa (GST) y N-acetiltransferasa (NAT). En esta fase raramente se produce metabolitos reactivos aunque existen excepciones como la glucuronidación del diclofenaco (Tang 2003).

La reacción de la fase III, están implicados los mecanismos de transportes de los productos de desecho a los conductos hepáticas, que son entonces expulsado del cuerpo. En esta ruta, las principales proteínas implicadas son transportadores de membrana como MRP-2 (multidrug resistant protein 2), MRP-4 (multidrug resistant protein 4) y P-gp (P-glicoproteína 1), cuya expresión o inhibición condicionaría las diferencias en la excreción de los fármacos y podrían ser factores importantes en el desarrollo de la hepatotoxicidad.

Aunque el hígado es el órgano principal encargado del metabolismo de los fármacos, una cantidad minoritaria de los fármacos no están sometidas a este metabolismo, ya que pueden ser excretados de manera directa sin metabolizar (Magnusson, Bergdahl et al. 1982) o por el contrario pueden ser metabolizadas por procesos extrahepáticas, así algunos fármacos son metabolizados por las bacterias intestinales o células de la membrana intestinal (Drasar, Renwick et al. 1972), o directamente en sus órganos dianas por diferentes isoenzimas relacionadas con las enzimas del metabolismo hepático (Pelkonen and Raunio 1997).

1.4.1 REACCIONES DE FASE I

El citocromo P450 es el eje principal de esta fase, aunque algunos fármacos pueden ser metabolizados principalmente por otras enzimas hepáticas, como ocurre con isoniazida (Fig. 5). El citocromo P450 funciona como una mono-oxigenasa que cataliza reacciones de inserción de un grupo hidroxilo en una proteína a partir de oxígeno molecular (O_2), siendo el otro oxígeno liberado como H_2O , gracias a la oxidación de moléculas $NADPH^+$. (Fig. 6). Gracias a su intervención se produce la hidroxilación de un sustrato que tiene consecuencia el aumento de solubilidad en agua y la producción de metabolitos secundarios, lo cual favorecería su excreción o reacciones posteriores de otras enzimas (Harayama, Kok et al. 1992).

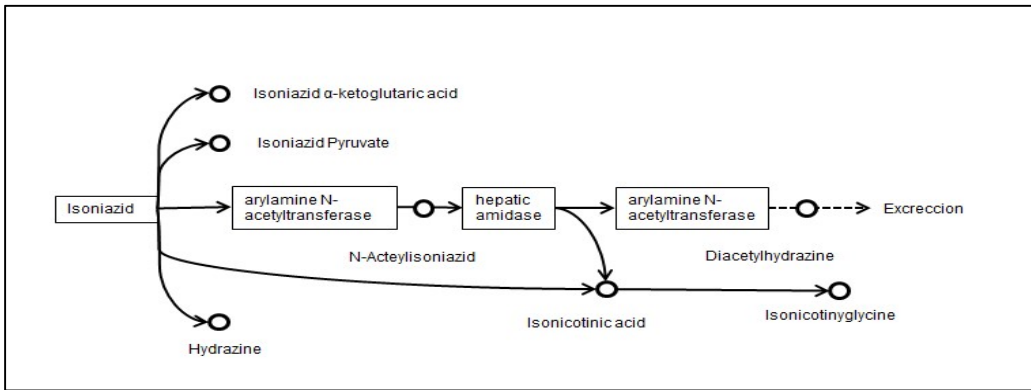


Figura 5. Metabolismo hepático de Isoniazida por enzimas hepáticas no relacionadas con el citocromo P450

Para realizar su función el CYP450 se asocia a distintas membranas intracelulares. EL fármaco se asocia a la molécula oxidada de CYP450 (Fe^{3+}), la cual después es reducida por la participación de $NADPH+H^+$ a CYP450 (Fe^{2+}) por la reductasa y el complejo fármaco-citocromo interactúa con el oxígeno molecular para formar un complejo terciario que puede disociarse dando lugar a un anión peróxido y regenerando la hemoproteínas férricas (Fig. 7).

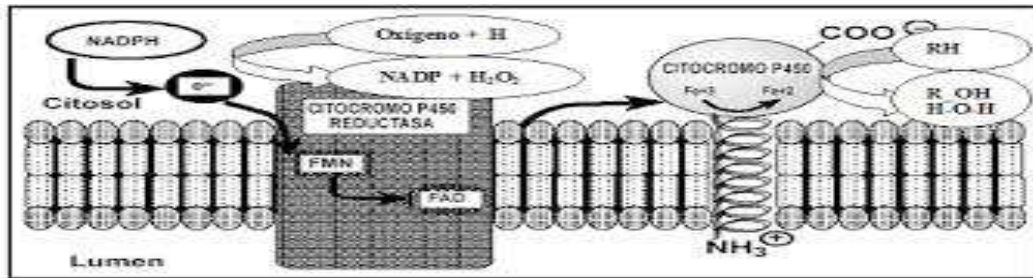


Figura 6. Cadena de transporte de electrones del citocromo y mecanismo de acción del citocromo. Fuente: (Orellana and Guajardo 2004).

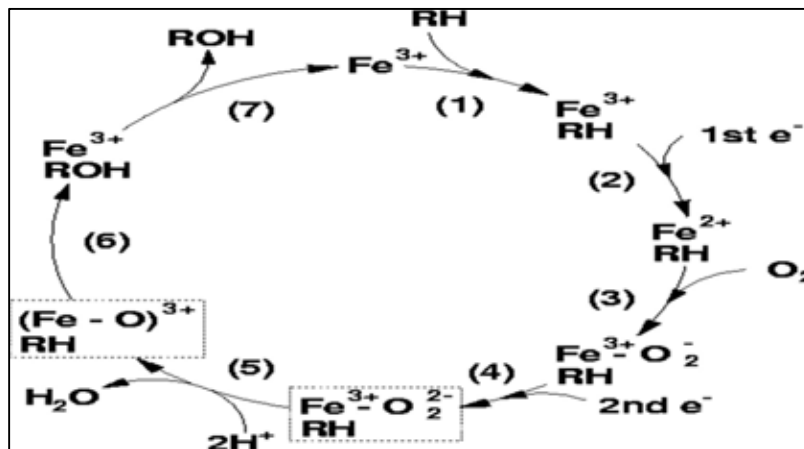


Figura 7. Principales reacciones químicas ocurridas en el interior del citocromo P450. Fuente: (Orellana and Guajardo 2004). Procesos: 1 Unión del sustrato a metabolizar; 2 Reducción; 3 unión del oxígeno molecular; 4 segunda reducción; 5 escisión del oxígeno; 6 formación del compuesto oxidado; 7 liberación del compuesto

En la actualidad se han desarrollado varias hipótesis para explicar la toxicidad de los procesos CYP450:

- 1) Elevación de la concentración del fármaco intracelular debido a la baja metabolización del mismo, causado por una disminución de la actividad del citocromo P450, por el propio fármaco o por otras moléculas externas entre las que se incluyen otros fármacos (interacciones farmacológicas).
- 2) Producción de metabolitos tóxicos debido al procesado del citocromo, que produciría una lesión directa de las células hepáticas interfiriendo en su normal función fisiológica y produciendo necrosis celular.
- 3) Producción de autoanticuerpos frente a metabolitos secundarios que se presentan en conjugación con proteínas diversas (haptización), lo que podría elicitar una respuesta de tipo inmunológico. Esta respuesta inmune puede estar dirigida al propio fármaco, a las proteínas transportadoras o al neoantígeno creado por el fármaco y la proteína.

Familia del citocromo P450

El citocromo P450 es una de las familias de moléculas más distribuidas en la vida formando parte de todas los linajes de vida orgánica, incluyendo los mamíferos, aves, peces, insectos, gusanos, plantas, hongos, procariotas. Además se encuentra en una gran variedad de órganos, glándulas y tejidos en mamíferos, destacando especialmente en riñones, cerebros, mucosa intestinal e hígado de mamíferos. Actualmente se han descrito 18 familias y 43 subfamilias en el genoma humano y se conocen más de 7.700 secuencias en otras especies. El citocromo está involucrado en el metabolismo de compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles (A y D) y en el metabolismo de medicamentos, carcinógenos, pesticidas y alcaloides (Pachkoria, Lucena et al. 2007). Cada subfamilia de citocromo se relaciona principalmente con un tipo de sustrato, aunque en el

procesado de los distintos fármacos pueden participar varios isoenzimas (Fig. 8).

En cada subfamilia existe un grupo de fármacos que pueden activar procesos de inhibición o activación. Las principales subfamilias CYP relacionados con el metabolismo farmacológico son CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4

Familia CYP1

Esta familia está constituida por los genes CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1. Los tres genes comparten las características de ser activados por hidrocarburos policíclicos (PAHs) y por el tabaco. Sin embargo existen diferencias en el grado y en la especificidad de esta activación. Durante en la metabolización de PAHs a compuestos intermedios pueden generar compuesto que se han relacionado con mutaciones en procesos neoplásicos (Shimada, Hayes et al. 1996).

Familia CYP2

La familia 2 del citocromo se localiza en el cromosoma 19 en la posición q13.2, esta familia es la más extensa, agrupando alrededor de trece subfamilias diferentes. Se la conocía originariamente como la familia inducida por Fenobarbital, sin embargo se ha demostrado que esta inducción solo se da en una subfracción de esta familia, específicamente en CYP2B, CYP2C3. Dentro de esta familia se encuentran las subfamilias con más relevancia en hígado.

Subfamilia 2A

Esta subfamilia se compone al menos de tres alelos diferentes CYP2A6, CYP2A7 y CYP2A13. Siendo el primero el más conocido ya que se expresa en el hígado y constituye un 4% del total. CYP2A6 es la principal enzima responsable de la oxidación de la nicotina y cotonina. También está implicado en el metabolismo de varios fármacos, carcinógenos, y una serie de alcaloides similares a la cumarina. CYP2A6 es la única enzima en el cuerpo humano que cataliza apreciablemente el 7-hidroxilación de la cumarina, por ello la formación del producto de esta reacción, 7-hidroxycumarina, se utiliza como una sonda para la actividad CYP2A6 (Siu and Tyndale 2008). En los hepatocitos humanos

CYP2A6 se induce por fenobarbital y rifampicina (Rodriguez-Antona, Jover et al. 2000) y es inhibida por levomepromazina, clorpromazina y tioridazina (Rifkind, Lee et al. 1995).

Subfamilia 2B

La única isoenzima de esta subfamilia es la CYP2B6 la cual interviene conjuntamente con la CYP2A6 en el metabolismo de la nicotina, sin embargo su presencia en el hígado es menor, siendo solo un 2% del total. Otros sustratos de esta enzima son efivarenc, nevirapina, tamoxifeno y ácido valproico.

Subfamilia 2C

La subfamilia 2C constituye un 18% del total de proteína CYP en el hígado humano y se caracteriza porque metaboliza aproximadamente el 20% de los fármacos comercializados (Lee, Goldstein et al. 2002). Esta subfamilia posee 4 isoformas CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19. Se han desarrollado numerosos estudios que el objeto de clarificar el papel de los polimorfismos de las isoformas CYP2C9 y CYP2C19 en el desarrollo de la hepatotoxicidad. Ya que algunos estudios postularon el riesgo entre los polimorfismos de estos genes con el riesgo incrementado en DILI, observado en casos reportados (Larrey and Pageaux 1997; Kirchheiner, Roots et al. 2005). Sin embargo los últimos estudios parecen haber desechado esta hipótesis (Pachkoria, Lucena et al. 2007).

Subfamilia 2D

La subfamilia aparece representada por la isoforma CYP2D6, esta fue la primera enzima del metabolismo en la que se relacionó un polimorfismo con una alteración en la expresión. El fenotipo de metabolizador lento de esta enzima está presente en alrededor del 6 % de los caucásicos (Ingelman-Sundberg, Oscarson et al. 1999). El CYP2D6 interviene en el metabolismo de una gran cantidad de principios activos entre los que se incluyen antihipertensivos como debrisoquina, antiarrítmicos como flecainida, beta

bloqueantes como metoprolol, propranolol, bufuralol, neurolépticos como el haloperidol y la tioridazina y algunos derivados opiáceos como la codeína. El CYP2D6 representa aproximadamente el 2% del total del contenido hepático, aunque también se expresa en duodeno y cerebro.

Subfamilia 2E

En la subfamilia CYP2E se encuentra una enzima que juega un papel muy importante en el metabolismo del etanol: CYP2E1. Esta enzima es inducible por el consumo crónico de alcohol y su actividad en el hígado esta incrementada en sujetos alcohólicos, esto explica los fenómenos de tolerancia al alcohol. Se han descrito varios polimorfismos que afectan a esta enzima. Uno de ellos presente en la región del extremo 5' del gen, se relacionó en 1994 con el desarrollo de enfermedades del hígado en que está presente el consumo de alcohol (Tsutsumi, Takada et al. 1994).

Familia CYP3

La familia CYP3 posee una única subfamilia CYP3A, que a su vez está compuesta por cuatro genes: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A13. Esta subfamilia es la forma predominante en el hígado representando el 30-40% del CYP total del hígado (Shimada, Yamazaki et al. 1994), aunque se observa una fuerte variación interindividual. Aunque CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 se caracterizan por metabolizar prácticamente el mismo sustrato, se expresan de manera diferencial entre los tejidos siendo CYP3A4 la principal en el hígado, este metaboliza alrededor de un 60% del total de los fármacos en el mercado.

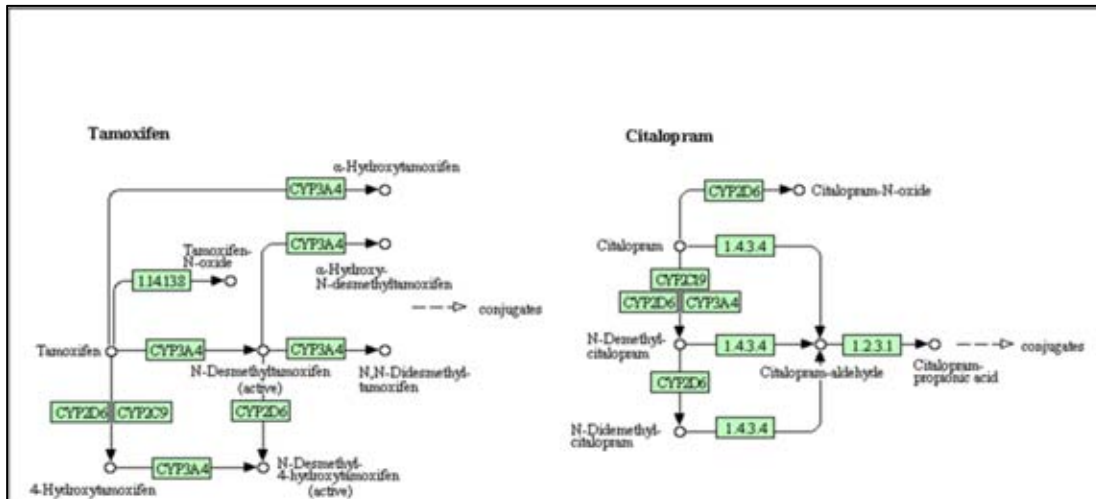


Figura 8. Metabolismo hepático de citalopram y tamoxifeno en los que intervienen diferentes isoenzimas de citocromo p 450. Fuente: KEGG Database. Abreviaciones: EC 1.14.13.8, dimethylaniline monooxygenase; EC 1.4.3.4, monoamine oxidase; EC 1.2.3.1, aldehyde oxidase

1.4.2 REACCIONES DE FASE II Y TRANSPORTADORES

En ocasiones la hepatotoxicidad idiosincrasia proviene de un fallo de los sistemas enzimáticos de detoxificación (reacciones de fase II) encargados de neutralizar los metabolitos reactivos. En esta fase se produce la conjugación de los metabolitos con moléculas endógenas pequeñas y polares como el ácido glucurónico, sulfato, acetato, glicina o metilo, las cuales pueden aumentar la solubilidad de los metabolitos, permitiendo que estos sean exportados a los sinusoides, desde los cuales son transportados al riñón o a la bilis para su excreción. Entre las enzimas que participan en esta fase se encuentran N-acetiltransferasa (NAT2), uridina difosfato glucuronosiltransferasa (UGT), Superóxido dismutasa y glutatión-s-transferasa, la cual conjuga el glutatión con acetato o ácido glucurónico (Corsini and Bortolini 2013).

Uridina difosfato glucuronosiltransferasa UGT

UGT es una superfamilia de enzimas que cataliza las reacciones glucuronidación, que ayudan a la eliminación de los fármacos y compuestos endógenos tales como bilirrubina y ácidos biliares (Miners, McKinnon et al. 2002). Hay muchas isoformas de UGT, que son codificadas por 19 genes que se clasifican en dos subfamilias, UGT1A y UGT2. El primero consiste en nueve genes activos como UGT1A1, UGT1A3 y UGT1A6, mientras que el último se

subdivide en UGT2A y UGT2B. UGT1A1 juega un papel clave en el metabolismo de la bilirrubina y las mutaciones encontradas en el gen UGT1A1 son responsables del síndrome de Gilbert y un factor de riesgo para la hiperbilirrubinemia. Los fármacos que se metabolizan por UGT1A1 (por ejemplo, irinotecan, estradiol, y buprenorfina) o inhiben su función (por ejemplo, indinavir y ketoconazol) aumentan su potencial hepatotóxico en pacientes con un genotipo UGT1A1 mutante. Además, los polimorfismos de determinadas combinaciones de polimorfismo UGT1A1, UGT1A3, UGT1A7 se han visto relacionados en la hiperbilirrubinemia por atazanavir e indinavir (Lankisch, Moebius et al. 2006; Lankisch, Behrens et al. 2009). Otra isoforma polimórfica UGT, UGTB7, se ha asociado con la lesión hepática inducida por diclofenaco a través de una mayor actividad de glucuronidación. (Daly, Aithal et al. 2007).

N-acetiltransferasa NAT2

El proceso de la N-acetilación está controlado por un par de alelos conocidos como NAT1 y NAT2. Los polimorfismo de NAT2 son los responsables de los cambios en la velocidad de acetilación en los humanos que se califican como acetiladores rápidos intermedios o lentos, el fenotipo de acetiladores lentos están constituidos por pacientes con dos variantes con polimorfismos, mientras que los fenotipos intermedio y rápido se caracterizan por tener uno o los dos alelos salvajes, respectivamente (Hein, Doll et al. 2000). Un meta-análisis 26 estudios de casos y controles, mostró que el genotipo acetilador lento NAT2 era un factor de riesgo de hepatotoxicidad debida a antituberculosos. (OR 3,10, [Intervalo de confianza del 95% de la población 2,47 a 3,88]; $p < 5,10$), pero esta asociación era diferente entre grupos étnicos, así los resultados significativos se obtenían en los asiáticos del este, brasileños y de Oriente Medio, pero no en los caucásicos (Du, Chen et al. 2013)

Glutación S transferasa GST

Glutación S transferasa es una de las enzimas más importantes de la fase II para la detoxificación de diferentes metabolitos tóxicos derivados de medicamentos ya que elicita su conjugación con el glutatión. En humanos las

dos isoenzimas más relevantes son GSTT1 y GSTM, estas enzimas han sido bien estudiadas en relación a la aparición de DILI. Así un meta-análisis de 13 estudios mostró que los individuos con genotipos nulos of GSTM1 tienen un mayor riesgo de DILI por antituberculosos en asiáticos del este (OR 1,59; [95% IC: 1,3 a 1,93]), pero no en brasileños, indios o personas de raza caucásica (Li, Long et al. 2013), además el genotipo nulo GSTM1 también se ha demostrado que es un factor de riesgo para la hepatotoxicidad inducida por carbamazepina (Ueda, Ishitsu et al. 2007). Por su parte el genotipo doble nulo GSTT1-GSTM1 nulo se ha asociado con DILI inducido por troglitazona, tacrina y AINES (Lucena, Andrade et al. 2008; Chalasani and Bjornsson 2010).

Superóxido dismutasa de Manganeso (MnSOD)

La superóxido dismutasa de Manganeso (MnSOD) también tiene un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo celular (Fig. 9). Ciertos polimorfismos han sido detectado como posibles factores de la susceptibilidad a DILI por antituberculosos, además en pacientes homocigóticos para el polimorfismo como Val16Ala se ha observado un aumento en el desarrollo de colestasis (OR 5 2,3; [95% CI: 1,4-3,8]; P=0,0058). Se ha propuesto que estas variantes pueden resultar en un aumento de los niveles de MnSOD y por lo tanto la acumulación de peróxido de hidrógeno, siendo un posible mecanismo de susceptibilidad a DILI (Lucena, Garcia-Martin et al. 2010).

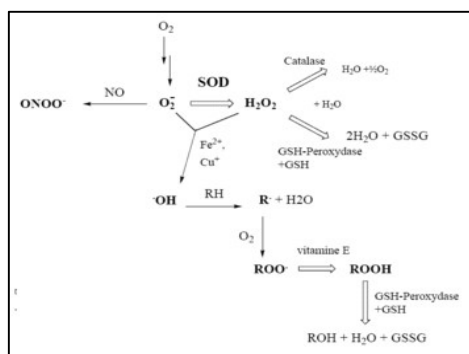


Figura 9. Mecanismo de acción de la superóxido dismutasa y otras enzimas relacionadas con la fase II del metabolismo hepático de los fármacos.

REACCIONES DE FASE III

Una vez en el hepatocito, los fármacos son transportados a la membrana del canalículo biliar o a sus lugares metabólicos. Para ello, pueden utilizar procesos de difusión pasiva o proteínas transportadoras intracelulares. No obstante la membrana canalicular constituye una fracción pequeña de la superficie celular (10-15%) lo cual implica que los procesos de transporte son los sistemas más eficaces en estos procesos (Kaplowitz 2005). Son varias las proteínas transportadoras encargadas de mediar dicho proceso. En la actualidad, una de las principales familias implicadas al canalículo biliar es el complejo de transportadores dependientes de ATP, que comprende a la P-glicoproteína, BSEP (bile salt export pump) y MRP2.

BSEP

Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado a partir de colesterol y secretados en el conducto biliar por un proceso activo a través del canalículo biliar (Setchell, Rodrigues et al. 1997). La disminución de la secreción de ácidos biliares está relacionada con la disminución del transportador de sales a través del canalículo biliar conocido como BSEP. En ausencia de secreción de ácidos biliares, ocurre la activación de mecanismos compensatorios. Recientes estudios han observado que polimorfismo específicos en esta proteína como es la sustitución en la posición 1331 de una citosina por una timina, se relacionan con el aumento de daño hepatocelular cuando se consumen fármacos con anillos aromáticos (Ulzurrun, Stephens et al. 2013).

MRP2

Es una proteína encargada del transporte de endobióticos (bilirrubina y conjugados) y fármacos aniónicos o conjugados de las mismas como: grepafloxacina, diclofenaco, pravastatina o metotrexato (Ayrton and Morgan 2001). La ausencia de esta proteína, así como mutaciones que reducen su función son las inductoras del síndrome de Dubin-Johnson en humanos, este síndrome se debe a la disfunción hereditaria de un gen autosómica recesivo, la enfermedad se caracteriza por un hiperbilirrubinemia conjugada unida a una pigmentación excesiva.

P-glicoproteína 1

La P-glicoproteína 1 (glicoproteína de permeabilidad, abreviada como P-gp o Pgp), también conocida como MDR1 (multidrug resistance protein 1) es una proteína muy importante en la membrana celular que expulsa gran cantidad de sustancias fuera de la célula. P-gp es uno de los transportadores relacionados con la excreción biliar de los fármacos catiónicos bipolares y se expresa en la superficie luminal de los enterocitos y en la membrana canalicular de los hepatocitos. Es responsable de disminuir la acumulación del fármaco en células resistentes a múltiples fármacos, y a menudo interviene en el desarrollo de resistencia a los fármacos contra el cáncer. Esta proteína también funciona como un transportador en la barrera hematoencefálica.

1.5 PROPIEDADES DE LOS FÁRMACOS

Un fármaco es una molécula bioactiva en su forma nativa o tras su metabolización, la cual en virtud de su estructura y configuración química, puede interactuar con macromoléculas proteicas, especialmente con receptores, localizados en la membrana, el citoplasma o núcleo de una célula, dando lugar a una acción y un efecto evidenciable. Por ello su estructura determina especialmente su capacidad de acción y su toxicidad. Además esta estructura es el elemento condicionante que define las numerosas propiedades que presentan los fármacos como hidrofilia, peso atómico y otros. Las propiedades fisicoquímicas de los fármacos se aglutinan de manera habitual en dos categorías las propiedades farmacodinámicas que miden los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos y de sus mecanismos de acción, la relación entre la concentración del fármaco y el efecto de éste sobre un organismo. Por otro lado, las propiedades farmacocinéticas estudian los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo.

Dosis diaria

Como hemos visto previamente en los fármacos con toxicidad intrínseca la dosis es el elemento primordial que determina la toxicidad hepática, no

obstante aunque en la idiosincrásica la dosis no es desencadenante de la reacción. Un estudio realizado por Lammert mostró que el 77% de los casos provenientes del registro sueco de hepatotoxicidad, poseían dosis diarias superior a los 50mg (Lammert, Einarsson et al. 2008). Esto fue confirmado posteriormente en el registro de toxicidad de Islandia en el cual el 88% de los casos se relacionaron con dosis ≥ 50 mg (Bjornsson, Bergmann et al. 2013). Recientes estudios han establecido un incremento del riesgo de toxicidad, para los fármacos comercializados en estados unidos, estableciendo un mayor riesgo de toxicidad para fármacos consumidos a dosis superiores a los 100 mg y con una alta lipofilia ($\text{LogP} \geq 3$) (Chen, Borlak et al. 2013).

1.5.1 PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

En esta categoría se engloban usualmente las propiedades más interesantes en el estudio de la hepatotoxicidad, ya que explican los fenómenos que sucede con un fármaco desde el momento en el que es administrado, hasta su total eliminación del cuerpo. Las propiedades farmacocinéticas se suelen dividir en 5 fases que se denominan con el acrónimo LADME, que recoge las fases de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Solubilidad

En química se considera la solubilidad de una sustancia, a la cantidad de dicha sustancia que se disolverá en una cantidad dada de disolvente, siendo el disolvente generalmente agua. La solubilidad acuosa es una característica esencial, ya que la solubilidad juega un papel importante desde el punto de vista farmacéutico. Este papel se demostró en 1995 por Amidon (Amidon, Lennernas et al. 1995) que estableció la correlación entre la solubilidad del fármaco y la permeabilidad Intestinal con la absorción del fármaco en el intestino. En este trabajo el criterio de alta solubilidad se estableció, en si la mayor dosis comercializada era soluble en 250 ml o menos de agua sobre el rango de pH 1-7,5 a 37 °. La buena correlación de este modelo ha hecho que este criterio haya sido utilizado para la elaboración de diferentes sistemas de

clasificación biofarmacéuticos, como el sistema de clasificación de Benet en 2011 en el que se evaluaron un total de 900 fármacos diferentes (Benet, Broccatelli et al. 2011) denominado Sistema de clasificación biofarmacéutica de disponibilidad de fármacos (BDDCS). Sin embargo, debe hacerse hincapié en que la solubilidad acuosa, no es necesariamente una medida adecuada de solubilidad intestinal. De hecho, la solubilidad intestinal no sólo depende de la solubilidad acuosa del fármaco ya que se ve afectada por múltiples factores intraluminales, incluyendo el pH (que alteran la ionización del fármaco) y la presencia de micelas mixtas conformadas por ácidos biliares, fosfolípidos y productos de la digestión de los lípidos (Dressman, Vertzoni et al. 2007).

Sistema de clasificación biofarmacéutica de la disponibilidad de fármacos (BDDCS)

En 1995 Wu y Benet establecieron este sistema de clasificación que catalogaba los fármacos en cuatro categorías en función de su solubilidad y su tasa de metabolismo hepático. En esta clasificación las categorías 1 y 3 se caracterizan por medicamentos con alta solubilidad según lo explicado en el punto anterior y las categorías 2 y 4 con baja solubilidad. Por otro lado, los fármacos también son clasificados en función de su metabolismo hepático, de acuerdo a esto se estableció que si el 70% o más de la dosis del fármaco es metabolizada fueran clasificadas como sustancias de alto metabolismo, clase 1 y 2.

Ellos establecieron este punto de corte justificando que había relativamente pocos medicamentos donde el grado de metabolismo estaba entre 30% y 70% y que la mayoría de los fármacos sufren un alto metabolismo o por el contrario son escasamente metabolizados (Wu and Benet 2005).

Lipofilia

La lipofilia o hidrofobicidad es una de las propiedades más interesantes de los fármacos, ya que determina su proceso de absorción, distribución, metabolismo y excreción. Usualmente para ser absorbidos debe pasar a través de las bicapas lipídicas en el epitelio intestinal (Roberts 2010). El fármaco debe ser suficiente hidrofóbico para atravesar la bicapa lipídica, sin embargo una alta hidrofobicidad resultaría en su retención en la propia bicapa. Por el contrario para su eliminación por el riñón necesitan ser suficientemente hidrofílicas para disolverse con los productos de excreción. Esta dualidad es lo que condiciona una gran variedad de las modificaciones que acontecen a los fármacos en su paso por el organismo. Para la medida de la lipofilia se utiliza el coeficiente de reparto o LogP que es el cociente entre las concentraciones de una sustancia en una disolución, con dos disolventes en equilibrio uno apolar como el octanol y uno acuoso (Fig. 10).

$$\text{Log } P \frac{\text{Non-polar Solvent}}{\text{Water}} = \text{Log } P \left(\frac{[\text{Solute}]_{\text{Non-polar}}}{[\text{Solute}]_{\text{Water}}} \right)$$

Figura 10. Ecuación para calcular de manera experimental el logaritmo de P para cualquier sustancia.

Estudios anteriores han analizado el impacto de la lipofilia en DILI, se ha observado que los medicamentos orales a dosis diarias altas (≥ 100 mg) y con un coeficiente de $\log P \geq 3$ se asocian significativamente con DILI grave (Chen, Borlak et al. 2013). En este estudio se demostró que ambos factores podrían predecir de forma individual hepatotoxicidad, pero que su combinación (regla del dos), poseía mayor capacidad predictora. Las hipótesis para este comportamiento sería que una mayor tasa de lipofilia podría aumentar el riesgo DILI, ya que facilitaría la absorción del fármaco a partir de sangre en hepatocitos y produciría una mayor cantidad de metabolitos reactivos, que posteriormente interaccionarían con las membranas mitocondriales y de transporte hepatocanalicular (Kaplowitz 2013; Chen, Suzuki et al. 2015).

Vida media del medicamento ($t_{1/2}$)

La vida media de un fármaco se define como el período de tiempo requerido para que la concentración o cantidad de fármaco en el cuerpo se reduzca a la mitad. Por lo general, la vida media de un fármaco se mide en relación a la cantidad de molécula del fármaco en el plasma. Por ello la vida media plasmática de un medicamento depende de la rapidez con que el fármaco es eliminado del plasma. Estos procesos de eliminación pueden ser por eliminación directa del organismo mediante la excreción, por translocación a otros compartimentos orgánicos diferentes del plasma o por destrucción directa en la sangre. Experimentalmente, la vida media se determina mediante la administración de una dosis única, generalmente por vía intravenosa, y la medición posteriormente en intervalos regulares de la concentración del fármaco en el plasma.

Tasa de unión a proteínas séricas

Una vez el fármaco penetra en el torrente sanguíneo, este es distribuido por el organismo para realizar su función. Los fármacos en sangre habitualmente alternan entre la forma libre y unido a proteínas plasmáticas (albumina o lipoproteínas). En la fracción libre reside la función farmacológica del fármaco y es la que puede sufrir fenómenos de metabolización o excreción. Debido a ello la unión a proteínas influye en la vida media de eliminación del fármaco, actuando como depósito o reserva del fármaco el cual es liberado lentamente como fracción libre.

Circulación enterohepática

Los ácidos biliares son detergentes fisiológicos que generan el flujo de bilis, facilitan la absorción intestinal y el transporte de lípidos, nutrientes, vitaminas y medicamentos. Estos medicamentos acompañan a los ácidos biliares en su recorrido en el cuerpo. La circulación enterohepática de los ácidos biliares sirve como una importante ruta fisiológica no sólo para el reciclaje de los ácidos

biliares y absorción de nutrientes, sino también para la regulación del metabolismo de los lípidos en todo el cuerpo (Chiang 2009).

Como parte del metabolismo de muchos fármacos y ácidos biliares, las enzimas hepáticas añaden glicina o taurina a través de un enlace amina. Así estos ácidos biliares conjugados y medicamentos son secretadas a la bilis y se almacena en la vesícula biliar. Después de cada comida, la contracción de la vesícula provoca el vaciado de los ácidos biliares y otras moléculas en el tracto intestinal. Al pasar a través del tracto intestinal, algunas bacterias entéricas degradan el enlace amida y permiten que algunos fármacos sean reabsorbidos en el intestino superior o se reabsorben en el íleon con la bilis. Estos compuestos son transportados a través del enterocito a la circulación de la sangre portal y vuelven a los hepatocitos.

Formación de metabolitos reactivos

Se entiende por metabolito reactivo a aquellas moléculas con reactividad electrofílica que pueden unirse covalentemente a proteínas, para formar adustos, los cuales podrían desencadenar reacciones autoinmunes o ejercer toxicidad directa (Pessayre, Fromenty et al. 2012; Faulkner, Meng et al. 2014). La mayoría de estas moléculas parecen derivarse de los procesos de fase I. Aunque el metabolito reactivo más conocido es NAPQI, responsable de la toxicidad intrínseca, existen numerosos indicios de que los metabolitos reactivos jugarían también un importante papel en la toxicidad idiosincrásica (Knowles, Uetrecht et al. 2000). Sin embargo, en la actualidad no existe una correlación clara entre el potencial para formar metabolitos reactivos en las condiciones experimentales y de la incidencia real de la hepatotoxicidad en los seres humanos (Park, Lavery et al. 2011). Así, Obach y colaboradores (Obach, Kalgutkar et al. 2008) midieron la formación de metabolitos reactivos in vitro y se encontró que el metabolismo dependiente de la unión covalente con microsomas de hígado no puede distinguir fármacos hepatotóxicos y no

hepatotóxicos. Dentro de una clase determinada de medicamento, estructuras químicas específicas pueden hacer que el compuesto claramente hepatotóxicos. Por ejemplo, ebrotidina, un medicamento antiulceroso farmacológicamente relacionado a la famotidina, lleva un anillo bromobenceno que se somete a la activación metabólica a epóxidos reactivos (Andrade, Lucena et al. 1999). Del mismo modo, temafloxacina y trovafloxacino comparten una cadena lateral difluoruro único que no ocurre en otras quinolonas con mucho menos hepatotoxicidad (Lucena, Andrade et al. 2000).

Daño mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos unidos a membrana cuyas funciones más prominentes son producir la energía de la célula, a través de la respiración, y regular el metabolismo celular. Algunos medicamentos pueden alterar estas funciones a través de diferentes vías metabólicas y/o dañar a alguno de los componentes mitocondriales. Estos fármacos se consideran poseen daño o riesgo mitocondrial.

Entre los procesos alterados de estos fármacos se incluyen (1) alteraciones en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, y en los procesos de la fosforilación oxidativa (OXPHOS); (2) agotar el genoma mitocondrial mediante la inhibición de la maquinaria de síntesis del ADN mitocondrial (ADNmt) o de la polimerasa y la inducción de daño oxidativo al ADNmt; (3) incrementar la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que induce la liberación de proteínas pro-apoptóticas mitocondriales en el citoplasma. Además, el bloqueo o desacoplamiento, inducido por fármacos, tiene como resultado la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno y la peroxidación lipídica (Boelsterli and Lim 2007; Porceddu, Buron et al. 2012). Por último, hay que subrayar que la toxicidad mitocondrial inducida por fármacos también puede involucrar los tejidos extrahepáticos, como los músculos, el corazón, el páncreas, las neuronas, o de riñón, provocando de este modo miopatía, rabdomiólisis, pancreatitis, neuropatía periférica, o disfunción renal que han

sido reportados en estudios previos (Dykens and Will 2007; Pessayre, Mansouri et al. 2010).

Excreción

Se entiende por excreción de un fármaco a los procesos por los cuales los fármacos son eliminados del organismo, bien inalterados o en forma nativa (no metabolizados) o bien modificados como metabolitos a través de distintas vías. En la excreción renal los fármacos son excretados por filtración glomerular y por secreción tubular activa siguiendo los mismos pasos y mecanismos de los productos del metabolismo intermedio. En otras ocasiones los fármacos son eliminados en la bilis con la que llegan hasta el intestino. Allí se unen a la fracción no absorbida del fármaco y se eliminan con las heces o bien pueden sufrir un nuevo proceso de absorción y ser eliminados finalmente por el riñón. Las otras vías tienen poca transcendencia, salvo para fármacos muy concretos, como la vía respiratoria los gases anestésicos como el halotano o el óxido nitroso.

1.6 FACTORES DEL HUÉSPED

Tanto La naturaleza del DILI, como el hecho de que esta reacción adversa ocurra solo en un reducido grupo de pacientes, del total de pacientes expuestos a fármacos con potencial hepatotóxico, parece indicar un importante condicionamiento del daño a determinados factores dependientes del paciente o huésped. Los factores del huésped que contribuyen a la susceptibilidad individual no se han investigado de manera sistemática. Sin embargo, estudios previos se han identificado alguno de los agentes que podrían contribuir a esta modulación del daño. En esta sección, proporciono una visión general de los factores del huésped que influyen en los componentes mecánicos principales de DILI.

Edad

El factor que ha sido más vinculado con el fenómeno DILI es la edad del paciente, así el envejecimiento es conocido por influir en la farmacocinética de

fármacos debido a la disminución de la función renal y el metabolismo hepático del citocromo, además las reacciones de conjugación parecen reducirse en pacientes mayores (Mitchell and Hilmer 2010). Todo ello parece jugar a favor de la aparición de DILI en la edad avanzada. Sin embargo este concepto no se ve reflejado en los datos de grandes registros nacionales de hepatotoxicidad. De esta manera, en Spanish DILI registry un 46% de los pacientes DILI tenían 60 o más años de edad y en la red de estadounidense de hepatotoxicidad inducida por fármacos (DILIN) únicamente el 18,5% de los pacientes DILI tenían 65 años o más (Chalasan, Fontana et al. 2008; Lucena, Andrade et al. 2009).

Aparentemente, el tipo de lesión hepática se manifiesta de manera diferente con la edad, entre los pacientes más jóvenes suele predominar el daño hepatocelular mientras que en paciente de edad avanzada es más frecuente la lesión colestásica o mixta (Andrade, Lucena et al. 2005). Aunque el tipo de fármaco puede ser un condicionante añadido, se ha observado como algunos fármacos poseen mayor incidencia o gravedad en determinados grupos de edad.

En 1987 se estudió que el riesgo de mortalidad de la hepatotoxicidad inducida por ácido valproico es mayor en los niños por debajo de la edad de dos años y escasa en niños superiores a los 10 años (Dreifuss, Santilli et al. 1987). Por su parte, la hepatotoxicidad inducida por isoniazida parece ser más frecuente en pacientes mayores. Un estudio retrospectivo en 3377 adultos que recibieron tratamiento con isoniazida demostró que la incidencia DILI era el doble en pacientes 35-49 años y casi cinco veces más en pacientes mayores de 50 años en comparación con los pacientes de 25-34 años (Fountain, Tolley et al. 2005).

Genero

EL género, las hormonas sexuales, el embarazo y las hormonas del crecimiento también influyen en los niveles de enzimas que metabolizan los fármacos (Waxman and Holloway 2009). Se ha observado que la CYP3A4, importante en el metabolismo de muchos fármacos como eritromicina o lidocaína posee hasta un 24% más de actividad en mujeres que en

hombres(Hunt, Westerkam et al. 1992). Por su parte los hombres tienen una mayor tasa de depuración de paracetamol porque poseen una mayor tasa de glucuronidación hepática.

Estilo de vida

El estilo de vida y la alimentación son factores que pueden modificar el procesado de los fármacos en el organismo, no solo mediante cambios en la absorción que sufren algunos fármacos como azitromicina que se absorben hasta un 50% menos al ser consumidos con alimentos sino porque también pueden modificar el proceso de eliminación de los fármacos en el organismo (Singlas 1995). El alcohol y las dietas ricas en grasa son inductores bien conocidos de CYP2E1 y CYP4A. Este aumento de CYP2E1 inducido por alcohol se ha asociado con un mayor riesgo de lesión hepática inducida por paracetamol, ya que durante su metabolismo se produciría mayor cantidad de metabolito reactivo NAPQI(Seeff, Cuccherini et al. 1986). Por su parte la desnutrición resultaría en una disminución de la eliminación de xenobióticos y llevaría a la lenta eliminación de los fármacos del organismo con el consecuente aumento de los niveles plasmáticos del mismo.

Comedicación

La comedición también conocida como medicación concomitante. Es el uso de varios fármacos que, prescritos de manera independiente pueden ser inocuos, utilizados de manera conjunta pueden interferir unos con otros en relación al potencial hepatotóxico a través del metabolismo o del sistema de transporte hepático mediante inhibición o competición por el sustrato. Un estudio poblacional de casos-control demostró que la combinación de dos o más fármacos con potencial hepatotóxico aumentaba el riesgo de hepatotoxicidad por un factor de 6 (de Abajo, Montero et al. 2004). Por su parte, se ha observado que la pirazinamida incrementa el efecto tóxico de isoniazida (Durand, Pessayre et al. 1995) y el uso habitual de fármacos anticonvulsivantes aumenta el riesgo de hepatotoxicidad por valproico (Schmid, Freudemann et al. 2013) .El uso de fármacos estimulantes del sistema

nervioso simpático parece incrementar la fatalidad en los casos de toxicidad inducida por paracetamol.(Suzuki, Yuen et al. 2009).

Enfermedades subyacentes crónicas

La presencia de determinadas enfermedades asociadas puede aumentar el riesgo de DILI por algunos medicamentos. Por ejemplo, los pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son más susceptibles al efecto tóxico del timetroprin-sulfametoxazol y las sulfonamidas (van der Ven, Koopmans et al. 1991). De igual modo, los pacientes con artritis reumatoide presentan un riesgo mayor de toxicidad hepática por ácido acetilsalicílico y están más predispuestos a la hepatotoxicidad con salazopirina los aquejados de enfermedad inflamatoria intestinal (Teoh, Leclercq et al. 2003). También parecen ser es un factor de riesgo de DILI, el metotrexato en la hepatopatía alcohólica, el tratamiento con antirretrovirales y antituberculosos en pacientes VIH coinfectados con los virus de hepatitis B y/o C, la administración de rifampicina como tratamiento del prurito en la cirrosis biliar primaria y el ibuprofeno en los pacientes con hepatitis crónica C (Andrade, Lucena et al. 2002).

Conviene tener en cuenta que un episodio de hepatotoxicidad será de mayor gravedad en un paciente con enfermedad hepática de base, fundamentalmente cuando existe una disminución de la reserva funcional hepática (Schenker, Martin et al. 1999).

Variabilidad individual

Existe una gran variabilidad interindividual en la expresión y actividad de enzimas metabolizadoras de fármacos o transportadores , como se ha detallado en el metabolismo hepático, esta variabilidad natural unida a factores como la edad, el género, la nutrición, el alcohol y la comedicación crea un complejo árbol de interacción para cada individuo. Se estima que los polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan fármacos para influir en el resultado clínico en el 15-25% de todas las terapias (Ingelman-Sundberg and Rodriguez-Antona 2005). Algunas de las diferencias observadas en

medicamentos contra la tuberculosis se han atribuido a las variantes de genes que metabolizan fármacos que codifican para NAT2, GSTM1 y GSTT1 (Roy, Chowdhury et al. 2001). Por lo tanto, los polimorfismos de las enzimas y transportadores que metabolizan los fármacos podrían ser uno de los principales contribuyentes al riesgo de desarrollar DILI en un individuo (Urban, Daly et al. 2014).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El actual estudio pretende valorar la influencia de las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y los factores del huésped en DILI. La hipótesis de este estudio es que las propiedades farmacológicas jugarían un papel importante en DILI. Así determinadas propiedades como el metabolismo hepático y la liposolubilidad de los fármacos condicionarían la manifestación temprana o tardía de los síntomas, así como en el tipo de daño y la gravedad del mismo. Estas propiedades serían moduladas por las características del huésped, justificando la amplia variabilidad en la aparición de la hepatotoxicidad.

OBJETIVOS

1. Analizar las características diferenciales en el tipo de daño hepático. Estudiar la relación de las propiedades farmacológicas de los fármacos, los factores del huésped y su interacción en el tipo de daño.
 - a. Determinar las diferencias en variables clínicas, demográficas y bioquímicas en los episodios DILI en función del tipo de daño.
 - b. Analizar la presentación de síntomas y la evolución de los pacientes en función del tipo de daño hepático.
 - c. Determinar las propiedades fisicoquímicas de los fármacos responsables y las propiedades de los fármacos concomitantes relacionados con la aparición de DILI.
 - d. Determinar la influencia de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos responsables, que podrían condicionar la aparición de un tipo específico de daño hepático.
 - e. Analizar las interacciones entre los factores del huésped y las propiedades farmacológicas, que condicionarían el tipo de daño.

2. Estudiar la posible influencia de las propiedades farmacológicas, los factores del huésped y su interacción en el inicio diferido de los síntomas.
 - a. Determinar las diferencias en variables clínicas, demográficas y bioquímicas en los episodios DILI en función del inicio diferido o no diferido de los síntomas.
 - b. Determinar los factores del huésped (edad, sexo, estado de salud) que podrían determinar el inicio diferido de los síntomas.
 - c. Determinar las propiedades fisicoquímicas de los fármacos que condicionan el inicio diferido de los síntomas.
 - d. Establecer la posible interacción entre las propiedades fisicoquímicas y los factores del huésped, en el inicio diferido de los síntomas.

3. Analizar las propiedades farmacológicas, los factores del huésped y su interacción en la gravedad de la lesión hepatotóxica.
 - a. Determinar las propiedades fisicoquímicas de los fármacos que condicionan la gravedad del daño hepatotóxico.
 - b. Determinar los factores del huésped que podrían determinar la gravedad del daño.
 - c. Establecer la interacción existente entre las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y los factores del huésped. Además de su papel en la modulación de la gravedad del daño.
 - d. Valorar el papel de la comedicación en la gravedad del daño.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de tipo ambispectivo con el objetivo de analizar la relación de las propiedades farmacológicas y las características de los pacientes en la presentación clínica de DILI. El estudio se realizó sobre una amplia cohorte pacientes pertenecientes a diferentes centros del ámbito sanitario nacional, los cuales colaboran con el Spanish DILI Registry, que comenzó su andadura en 1994. Dicho Registro fue creado por el Dr. Raúl Andrade de la unidad de Hepatología del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Málaga y la Dra. María Isabel Lucena del Servicio de Farmacología Clínica de este mismo hospital. A dicho registro son remitidos casos de lesión hepática por fármacos y suplementos dietéticos desde diferentes unidades de Hepatología y Farmacología de hospitales de todo el territorio nacional, creando así una red colaborativa multicéntrica compuesta por más de 50 hospitales de varias provincias españolas (Fig. 11).



Figura 11. Distribución de las unidades clínicas colaboradoras en el Spanish DILI registry. Los puntos azules indican las provincias en las cuales existen al menos una unidad clínica colaboradora.

2.2 TAMAÑO MUESTRAL

Para este estudio fueron evaluados todos los pacientes incluidos en el Spanish DILI registry, desde su fundación en 1994 hasta Julio de 2014. En total se disponía de 870 casos de toxicidad hepática, atribuidos a un amplio abanico de fármacos y suplementos dietéticos. Debido a la baja incidencia de DILI esta población supone un muestreo altamente representativo de la población expuesta, al desarrollo de esta patología.

2.3 METODOLOGÍA DEL SPANISH DILI REGISTRY.

Después de la detección de un posible caso de toxicidad hepática asociada a fármacos, se somete al paciente a una encuesta detallada, realizada por el médico responsable que atendió su caso. Esta información queda plasmada en una historia detallada del caso. Los principales puntos de interés en esta historia son: los antecedentes de enfermedades hepáticas o del tracto biliar, enfermedades de tipo metabólico o enfermedades de alta incidencia (diabetes, hipertensión). Se detalla también la información relacionada con transfusiones de hemoderivados o cirugía en los seis meses previos al comienzo de la lesión hepática. En esta historia se consulta de manera expresa información sobre la existencia de hábitos tóxicos como consumo de tabaco, consumo de alcohol, adicción a drogas, consumo de medicamentos sin prescripción médica (automedicación) y trabajo con productos tóxicos y/o potencialmente peligrosos.

Tras la recogida de esta historia, si persiste la sospecha de hepatotoxicidad se rellena un protocolo estandarizado, diseñado por el Spanish DILI registry. Posteriormente, el caso es sometido a evaluación para su diagnóstico. Si es confirmado el diagnóstico, de reacción inducida por fármacos, se comienza el proceso de incorporación a dicho registro (Fig. 12). Este proceso de evolución es realizado consecutivamente por tres expertos. Durante la evaluación, se observa principalmente la secuencia cronológica existente entre la administración del fármaco y la aparición de la reacción adversa.

La adecuación de la reacción adversa al posible fármaco responsable. La exclusión de cualquier posible causa alternativa como origen del cuadro clínico. La evolución del episodio, entendiéndose como la mejoría o no tras el cese de la administración del fármaco, la reaparición de la lesión tras la reexposición (en aquellos casos que ocurriera reexposición accidental) y/o la aparición de una segunda reacción.

Este protocolo consiste en una serie de cuestiones sobre la reacción adversa que permite esquematizar la información de la reacción de manera sencilla en los siguientes apartados:

- a) Datos demográficos y antropométricos entre los que se incluyen edad, sexo, talla, peso, Índice de masa corporal (IMC).
- b) Relación temporal entre el comienzo de la toma del fármaco y el inicio de la lesión hepática.
- c) Relación temporal entre la suspensión del fármaco y la mejoría o resolución de la disfunción hepática.
- d) Descripción de la sintomatología presentada durante los días previos o coexistentes con la detección de valores elevados en el perfil hepático.
- e) Presencia de signos clínicos que sugieran un mecanismo inmunológico (presencia de rash, eosinofilia, linfopenia y fiebre).
- f) Relación de los productos farmacológicos tomados previamente y durante el episodio, indicando su fecha de inicio y fecha de finalización.
- g) Datos relevantes de la historia clínica, haciendo hincapié en la presencia de enfermedades o patologías previas a la reacción de la lesión hepática.
- h) Información relevante de las pruebas de imagen para descartar la presencia de anomalías o patologías hepáticas diferentes de DILI.

- i) Variables analíticas tanto previas, como durante la primera analítica con alteraciones (episodio índice) y posteriormente a la misma, hasta la resolución.
- j) Serología y bioquímica específica para excluir causas alternativas como la hepatitis viral, enfermedades autoinmunes, alteraciones metabólicas y/o hepáticas.
- k) Presencia de otros factores de riesgo y anotaciones de la reacción.



Figura 12. Recogida de información y muestras biológicas por el Spanish DILI registry.

2.4 SELECCIÓN DE LOS CASOS

Spanish DILI registry.

Criterios de inclusión: individuos que cumplieran los criterios clínicos establecidos en su momento, así los primeros casos del registro debían seguir los criterios publicados por Benichou y posterior se adoptaron los criterios de Aithal (Benichou 1990; Aithal, Watkins et al. 2011) y cuya evaluación de causalidad al fármaco(s) haya sido estimada favorable. La imputabilidad de un fármaco en la producción de un daño hepático se evaluó aplicando la escala CIOMS (Aithal 2015) (Fig. 2). Dicha escala contiene una serie de ítems que son puntuados según la información recogida del episodio. La puntuación total se categoriza en excluido, improbable, posible, probable y altamente probable.

Criterios de exclusión Se excluyeron de su entrada en el registro aquellos pacientes que cumpliendo los criterios de inclusión presentaban

1. Alguna enfermedad hepáticas concomitantes o subyacente de tipo vírico, alcohólico, metabólico o autoinmune no despertada por fármacos. Que pudiera ser considerada responsable de la elevación del perfil hepático.
2. Otra enfermedad hepática que se sospechara como responsable de la elevación del perfil hepático (tiroides, infección por HIV, hepatitis crónica B o C, enfermedad de Wilson)

Criterios de exclusión específicos del estudio: Debido a la naturaleza de este estudio se excluyeron aquellos casos afectados por alguno de los siguientes criterios.

1. Daño hepático atribuido a suplementos dietéticos o productos herbales.
2. Los casos de daño hepático producidos por medicamentos ilegales (Cocaína, éxtasis)
3. Los casos atribuidos a fármacos de tipo biológico, considerando estos los que poseen componentes biológicos, tales como enzimas, anticuerpos o proteínas híbridas (ej. Infiximad anticuerpo monoclonal quimérico de humano y ratón, o la enzima Asparraginasa.). No se incluyen en este apartado las hormonas.
4. Las reexposiciones accidentales al mismo principio activo que produzcan una nueva elevación del perfil hepático en pacientes que las hayan sufrido anteriormente.
5. Aquellos casos en que la atribución de la lesión hepática estaba atribuida a dos fármacos diferentes, siendo indistinguibles el fármaco responsable de la reacción.
6. Los casos de daño hepático debido a sobredosis (Paracetamol).

Criterios de edad

Este estudio no presento restricciones en función de la edad. Aunque puede existir un sesgo previo en la entrada de pacientes al registro, debido a que las unidades pediátricas no participan en el Spanish DILI registry. Siendo la mayoría de los casos remitido por unidades clínicas de farmacología o hepatología. En el actual estudio, solo 15 pacientes tenían menos de 18 años. La edad de la población estuvo comprendida entre 10 y 90 años.

2.5 PARÁMETROS DEL ESTUDIO

2.5.1 PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS

En 2011 se procedió a la revisión de los criterios bioquímicos para definir DILI (Aithal, Watkins et al. 2011). Esta revisión tenía por objeto excluir del criterio de DILI, aquellos casos cuyas elevaciones eran tan leves que no poseían relevancia clínica. Los criterios bioquímicos fueron los siguientes:

- $ALT \geq 5 \times LSN$.
- $FA \geq 2 \times LSN$.
- $ALT \geq 3 \times LSN$ conjuntamente con $BT ALT \geq 2 \times LSN$

Cuando la lesión hepática cumple los anteriores criterios, la lesión hepática se clasifica en función del cociente entre la ALT y la FA.

- **Daño hepatocelular:** Elevación de la ratio $R \geq 5$
- **Daño colestásico:** Elevación de la ratio $R \leq 2$
- **Daño mixto:** Elevación de la ratio R comprendida entre 2 y 5.

Inicio diferido del daño: Uno de los problemas que dificulta la evaluación de la toxicidad es el momento de inicio de los síntomas. Así en la hepatotoxicidad, los primeros síntomas de la enfermedad pueden aparecer desde pocas horas después del comienzo del tratamiento, hasta semanas después del cese del mismo. En este estudio, denominamos como inicio diferido a la aparición de los primeros síntomas al menos 24 horas después de la última toma del medicamento imputado.

La **gravedad** de la lesión hepática ha sido definida en cuatro categorías leves, moderadas, severas y fatal/trasplantado. La clasificación se basa en la criterios bioquímicos, la aparición de encefalopatía, ascitis o disminución de la actividad de protrombina por debajo del 50%, manifestación de signos de insuficiencia hepática, muerte o necesidad de trasplante hepático según criterios internacionales (Aithal, Watkins et al. 2011).

Se evaluó la presencia de los autoanticuerpos positivos: antinuclear (ANA), anti-músculo liso (AMLA) y anti-mitocondriales (AMA). Los casos que presentaron positividad en estos autoanticuerpos, así como otras características **inmunoalérgicas**, fueron evaluados por un grupo de expertos. Para descartar la posibilidad de que objetivo de esta evaluación fue determinar si la reacción correspondía a un episodio de hepatitis autoinmune despertada por fármacos (DI-AIH) o un episodio de DILI con características de autoinmunidad pero sin necesidad de tratamiento autoinmune (Liu and Kaplowitz 2002; Castiella, Zapata et al. 2014).

2.5.2 SINTOMATOLOGÍA

Para la evaluación de la sintomatología en los casos DILI. Los síntomas fueron analizadas tanto de manera independiente como agrupadas en 7 categorías de síntomas. Los síntomas fueron agrupados de la siguiente manera.

- El Síndrome Constitucional está integrado por la tríada sintomática de **astenia, anorexia y pérdida de peso involuntaria** (Suarez-Ortega, Puente-Fernandez et al. 2013). La astenia es un síntoma caracterizado por una sensación generalizada de cansancio, fatiga, debilidad física y psíquica independientemente de otros síntomas o signos asociados a su etiología. La anorexia describe la inapetencia o falta de apetito. Aunque existen diferentes denominaciones para el síndrome constitucional (síndrome general, síndrome de afectación general, síndrome caquéctico, síndrome caquexia-anorexia, síndrome caquexia-anorexia-astenia, etc.), en este estudio la denominamos SC para evitar confusiones.

- Alteraciones del metabolismo de bilirrubina: Bajo el término de trastornos del metabolismo de bilirrubina agruparemos los síntomas de ictericia, coluria y acolia. La bilirrubina es un pigmento biliar de color amarillo anaranjado que resulta de la degradación de la hemoglobina de los glóbulos rojos. Estos pigmentos se almacenan en la vesícula biliar formando parte de la bilis. Sin embargo, cuando estos compuestos aumentan en sangre dan lugar a una coloración amarilla de la piel denominada **ictericia** cutánea. En situaciones normales la bilirrubina se almacena en la vesícula biliar y es posteriormente excretada hacia el duodeno, coloreando las heces. Sin embargo, la falta de estos pigmentos produce la decoloración de las heces conocida como hipocolia o la ausencia total de color denominada **acolia**. En algunos casos la bilirrubina conjugada puede eliminarse de manera activa por el riñón dando lugar a la aparición de una coloración oscura de la orina denominada **coluria**.
- La agrupación de trastornos epiteliales o eflorescencia está constituida por aquellos síntomas cuya manifestación se da en las células epiteliales. Bajo este término englobaremos rash o exantema cutáneo, prurito y síndrome de Stevens-Johnson. El rash supone una inflamación o enrojecimiento de la piel que implica un cambio en su color o textura. El termino prurito refiere a un hormigueo en la piel o irritación que acarrea deseo de rascar la zona afectada. El síndrome de Stevens Johnson es una manifestación mayor de un eritema multiforme mayor, consistente en una reacción de hipersensibilización que afecta la piel y las membranas mucosas. Adicionalmente, pueden quedar implicados algunos otros órganos.
- Trastornos nefríticos, en esta categoría agrupamos tanto una serie de síntomas indicativos de problemas renales como edema, oliguria, poliuria, así como una variable intermedia indicativa de problemas renales, la disminución del filtrado glomerular.

- Alteración de los procesos digestivos, bajo esta categoría agrupamos los síntomas relacionados con el tracto digestivo. Se agruparon los síntomas de dispepsia, náuseas, vómitos, distensión abdominal y dolor abdominal difuso. La indigestión o dispepsia es una sensación vaga de malestar o incomodidad en la parte superior del abdomen o el vientre durante o después de comer. Esto puede caracterizarse por una sensación de calor, ardor o dolor en el área entre el ombligo y la parte inferior del esternón, así como una sensación de llenura que es molesta y ocurre poco después de comenzar la comida o cuando ésta ha terminado.
- Las alteraciones del hemograma fueron valoradas según los siguientes criterios. **Leucopenia** la disminución del número de leucocitos en la sangre, por debajo de $4 \times 10^3/\text{mm}^2$. **Linfopenia** cuando la población de linfocitos era inferior al 20% o menor a $1,5 \times 10^3/\text{mm}^2$. **Plaquetopenia o trombocitopenia** cuando los niveles de plaquetas eran inferiores a $100 \times 10^3/\text{mm}^2$. **Linfocitosis** el aumento de la población de linfocitos por encima del 40% o un conteo superior a $4,5 \times 10^3/\text{mm}^2$. **Eosinofilia** cuando el incremento de los eosinófilos está por encima del 4% del total de leucocitos o un conteo superior a $500/\text{mm}^2$.

2.5.3 ENFERMEDADES SUBYACENTES

Para el análisis de enfermedades subyacentes, se estudiaron tanto las enfermedades de manera aislada como agrupadas. Se crearon un total de 18 categorías en función del compartimento principal afectado. Dentro de cada categoría se agruparon las siguientes enfermedades.

Las **enfermedades cutáneas**: Abscesos cutáneos, absceso pilonidal, dermatitis atópica, eritema, melanoma, psoriasis, urticaria o vitiligo,

Las **enfermedades cardíacas**: Arritmias, bloqueo áurico-ventricular, endocarditis, fibrilación auricular, infarto agudo de miocardio (IAM), síndrome de Wolf-Parkinson-White y taquicardia.

Las **enfermedades del sistema nervioso**: accidentes isquémicos transitorios, convulsiones, demencia, epilepsia, enfermedad de alzhéimer, enfermedad de párkinson, malformación artero-venosa craneal, meningioma, neuralgias, temblores, paraparesia y traumatismo craneoencefálico.

Las **enfermedades gastrointestinales**: Cáncer de colon o gástrico, colitis linfocítica, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, esofagitis, fistula perianal, gastritis, hemorragia digestiva alta, herniorrafia inguinal, pancreatitis, pólipo del colon, reflujo gastroesofágico y síndrome de colon irritable.

Las **enfermedades genitourinarias**: Cáncer de próstata o vejiga, cólicos nefríticos, duplicidad uretral, hipertrofia prostática benigna y pielonefritis.

Las **enfermedades ginecológicas**: Amenorrea, endometriosis, fibroadenoma de mama, mastopatía fibroquistica, mioma uterino, pólipo de endometrio, trastornos menstruales y tumor de la mama.

Entre las **enfermedades hepáticas**: cálculos en el conducto biliar, cirrosis biliar primaria, cirrosis hepática, colestasis del embarazo, degeneración grasa del hígado, enfermedad hepática alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, hepatitis autoinmune y síndrome de Gilbert.

Las **enfermedades infecciosas**: Brucelosis, candidiasis, infección por VIH, parasitosis, sífilis, toxoplasmosis cerebral y tuberculosis pulmonar o extrapulmonar

Las **enfermedades musculoesqueléticas**: Bursitis calcánea bilateral, cervicalgia, dupuytren, hernia discal, lumbago, osteoartritis primaria generalizada, osteoporosis, tendinitis y sarcoma de partes blandas

Las **enfermedades oftalmológicas**: Cataratas, conjuntivitis, dacriocistitis, desprendimiento de retina, glaucoma, xeroftalmia, retinopatía diabética y uveítis.

Enfermedades respiratorias, torácicas y mediastínicas: Asma, bronquitis, disnea, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, hemoptisis, enfisema pulmonar, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, neumonía, síndrome de apnea obstructiva del sueño.

Las **enfermedades vasculares o circulatorias**: aneurisma, enfermedad vascular periférica, enfermedad de Raynaud, hipertensión esencial, insuficiencia venosa, síndrome postrombótico, trombosis venosa profunda.

Trastornos autoinmunes o reumatológicos: arteritis, conectivopatía, enfermedad de Still, esclerodermia, espondilitis anquilosante, lupus, miastenia gravis, otras artritis reumatoideas seropositivas, poliartritis y síndrome de Sjögren.

Trastornos hematológicos, inmunes y del sistema linfático: Anemia perniciosa, enfermedad de von Willebrand, inmunodeficiencia común variable, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgking, trombocitopenia, sarcoidosis, síndrome mielodisplásico.

Trastornos metabólicos: déficit de alfa-1 antitripsina, desnutrición proteico-calórica, dislipemia mixta, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperuricemia, enfermedad tofacea, obesidad, pérdida anormal de peso, trastornos del metabolismo del hierro.

Trastornos orales y de la cavidad oral: amigdalitis aguda, angioedema hereditario, carcinoma del área oral,, infección maxilar, rinosinusitis, pólipo cuerdas vocales, síndrome vertiginoso.

Trastornos endocrinos: Bocio, diabetes mellitus, enfermedad de Graves-Basedow, hipertiroidismo e hipotiroidismo.

Trastornos psiquiátricos: Alcoholismo, bulimia nerviosa, esquizofrenia, trastorno adaptativo, trastorno bipolar y trastornos depresivos.

2.5.4 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

La información farmacológica provenía de la base de datos LTKB (liver toxicity knowledge database). La cual es una base de datos con información farmacológica creada por el NTCR (National toxicological center research) en Arkansas. En la cual recogen tanto información fisicoquímica como farmacocinética y farmacodinámicas.

La estructura química de los fármacos es responsable de sus funciones y sus propiedades. En función de su interacción con el organismo, las propiedades farmacológicas se agrupan en dos categorías. Las farmacocinéticas o como son modificados los fármacos por el organismo y las farmacodinámicas que explican como el fármaco modifica el organismo. En el presente estudio se dedica un especial énfasis a las propiedades farmacocinéticas. La información de las propiedades farmacológicas fue obtenida de la base de datos LTKB para los fármacos comercializados en los Estados Unidos. Además esta información fue suplementada con una extensa búsqueda bibliográfica, incluyendo fichas técnicas de la agencia española del medicamento (AGEMED), así como material bibliográfico especializado (Burch 2008), búsqueda en base de datos de toxicidad LiverTox, Toxnet y en artículos publicados en revistas científicas. Las propiedades analizadas en este estudio fueron:

Propiedades fisicoquímicas:

El **número de anillos** presentes en una molécula determina tanto el volumen de la molécula como su conformación tridimensional. Existe dos tipos de anillos los **anillos aromáticos** con estructura similar a fenilo, en los cuales se produce la alternancia de dobles enlaces y enlaces simples. **Anillos simples** en los cuales todos átomos del anillo están unidos por enlaces simples, el resto de electrones en el anillo se une a sustituyentes externos. El **índice de anillos** se calculo dividiendo los anillos aromáticos, entre los anillos simples, oscilando el índice entre 0 y 1. Además los anillos pueden estar separados en diferentes partes de la molécula o agruparse y compartir al menos un par de átomos con otro anillos, en esta circunstancia se considera que el anillo esta **fusionado**.

Dentro de la estructura de anillos simples orgánicos, todos los sustituyentes son átomos de carbono e hidrogeno. En algunas moléculas los carbonos son remplazados por átomos de otra naturaleza formando **heteroátomos**. Estudiaremos especialmente compuestos con azufre y elementos halógenos. Aquellos anillos que incluyen heteroátomos en su estructura son comúnmente denominados heteroanillos.

Las moléculas orgánicas están constituidas principalmente por carbono, hidrogeno y oxígeno. Sin embargo en algunas moléculas, especialmente en los fármacos, aparecen otros átomos en su estructura. La presencia de átomos **de azufre**, puede alterar la reactividad de la molécula, ya que la existencia de este átomo puede desembocar en el establecimiento de un puente disulfuro con otras moléculas. Los átomos **halógenos** son moléculas con un alto valor de electronegatividad lo cual las habilita para oxidar con facilitar otros compuestos.

La electronegativa es la tendencia de los átomos para atraer electrones u oxidar otros compuestos. Utilizando la escala de electronegatividad diseñada por Linus Pauling, la más comúnmente utilizada, establecimos el valor global de electronegativa de las moléculas. En este estudio, se estableció como **alta electronegatividad** cuando la suma de electronegatividad fuera superior o igual inferior a 81.5.

El **volumen de McGowan** es una medida del volumen espacial que ocupa cada uno de los átomos de la molécula. Este índice es ampliamente utilizado en la investigación bioquímica, ya que interviene en diferentes propiedades como los mecanismos de transporte, que ocurren en la absorción intestinal o el paso de la barrera hematoencefálica.

La **superficie topológica polar** de una molécula es definida como la suma de la superficie de todos los átomos polares de la molécula, principalmente oxígeno y nitrógeno. Esta propiedad es importante en medicina ya que determina la permeabilidad de las moléculas a través de la membrana celular.

Los orbitales de una molécula determinan en gran medida la geometría de la misma. Existen orbitales bien definidos como los orbitales s, p ó d. Sin embargo, algunas veces estos orbitales se hibridan, creando orbitales híbridos que permiten nuevas geometrías de enlace. Esto condiciona la estructura espacial de la molécula y los impedimentos de unión de algunos elementos.. Existen tres tipos de orbitales híbridos: los sp (los cuales establece 2 orbitales en ángulo de 180°), los orbitales sp² (en los cuales se estable tres enlaces en un plano con un ángulo de 120° entre cada uno de ellos) y los orbitales sp³ (dando lugar a una estructura tetraédrica). Estos orbitales no son completamente estables y pueden inter-convertirse entre ellos bajo determinadas circunstancias. Como hemos señalado previamente, los átomos de carbono poseen orbitales sp³. los cuales generan enlaces simples. En algunos enlaces se pueden hibridar esos orbitales a sp², produciendo los dobles enlaces, los cuales poseen diferentes propiedades en la molécula. La **tasa de hibridación** sp³ a sp², indica el porcentaje de enlaces sp³ que se han convertido en sp² en una determinada molécula.

Durante los procesos de unión, todas las moléculas sufren diferentes alteraciones de su energía libre, debido al establecimiento y disolución de los enlaces débiles existentes en la molécula. Por ello mediante el uso de la escala de **energía libre de Platts** pretendemos determinar valores de energía libre en los fármacos. Estos valores energía libre indican el potencial de unión con otras moléculas.

La **distancia topológica molecular** es una medida matemática de la estructura de la molécula, basada en la teoría de grafos. Esta permite analizar la estructura de la molécula desde un punto de vista matemático. Los índices de distancia topológica molecular son utilizados en investigación para la detección de moléculas con similares propiedades y para la búsqueda de nuevas moléculas. Existiendo diferentes índices para calcularlo (Balaban, Beteringhe et al. 2007; Hosoya 2007). Para su cálculo en el actual estudio se utilizó el software PaDEL.

Propiedades farmacocinéticas

Solubilidad es la capacidad del fármaco para ser disuelto en agua, Se clasifican los fármacos en alta solubilidad si la mayor dosis comercializada del fármaco puede ser disuelta en 250 mL de agua en un rango de pH entre 1–7,5 a 37°C.

Clasificación BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) esta clasificación agrupa a los fármacos según su solubilidad y su metabolismo hepático creando cuatro categorías (Wu and Benet 2005). En esta clasificación, el criterio de alta solubilidad corresponde al presentado en el apartado anterior. El criterio de metabolismo hepático significativo corresponde a aquellos fármacos con un $\geq 70\%$ de metabolismo hepático, siendo el resto de fármacos no significativo.

- clase 1 (alta solubilidad y metabolismo hepático significativo)
- clase 2 (baja solubilidad y metabolismo hepático significativo)
- clase 3 (alta solubilidad y metabolismo hepático no significativo)
- clase 4 (baja solubilidad y metabolismo hepático no significativo.)

La **lipofilia** es definida como el coeficiente de partición octanol-agua (LogP). La lipofilia es una de las propiedades más importantes en la farmacocinética. Ya que puede determinar tanto la capacidad de los compuestos de atravesar las membranas como su permanencia en diferentes tejidos de los compuestos.

La **lipoafinidad** es un criterio basado en gran medida en la lipofilia molecular. Sin embargo, LogP no se correlaciona bien con el paso de moléculas a través de membrana celulares, especialmente en la barrera hematoencefálica, por ello se utilizó este parámetro que permite evaluar la facilidad con que la molécula puede atravesar la membrana lipídica (Liu, Sun et al. 2001).

Metabolismo hepático fue definido como significativo cuando el porcentaje de compuesto metabolizado en el hígado supere el 50% y no significativo cuando este porcentaje sea menor. Se utilizó dicho valor de corte ya que la clasificación BDDC infra estima el metabolismo de los fármacos cuando este no alcanza valores superiores al 70%,

Algunos fármacos se transforman en **metabolitos reactivos** durante las diferentes etapas de su metabolismo. Estos metabolitos reactivos son especies químicas que pueden interaccionar con diferentes componentes celulares y distorsionar las funciones celulares (Stepan, Walker et al. 2011). Por ejemplo troglitazona contiene un anillo similar a una fracción de la proteína E. Esta estructura juega un papel muy importante en su función. Sin embargo esta estructura puede ser transformada en una o-quinona, la cual posee una alta actividad electrofílica, esta como otras o-quinonas puede producir un cambio en el potencial redox de la célula, disminuyendo la proporción GSH/GSSG e incrementando el ratio $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ y desembocando en la muerte celular. (Bolton, Trush et al. 2000; Yokoi 2010)

Los fármacos fueron clasificados de su tasa **circulación enterohepática**, para evaluar la influencia de una vida media prolongada. Ya que una mayor tasa de **circulación enterohepática** se relacionaría con una mayor exposición en el hígado.

La **longitud de la cadena** y la **longitud de la cadena alifática** son marcadores del tamaño de la molécula, siendo esta segunda solo constituida por los átomos básicos de las moléculas orgánicas: carbono, oxígeno e hidrogeno. Las cadenas guardan relación con los fenómenos de reconocimiento celular y su permeabilidad celular (Fig. 13)

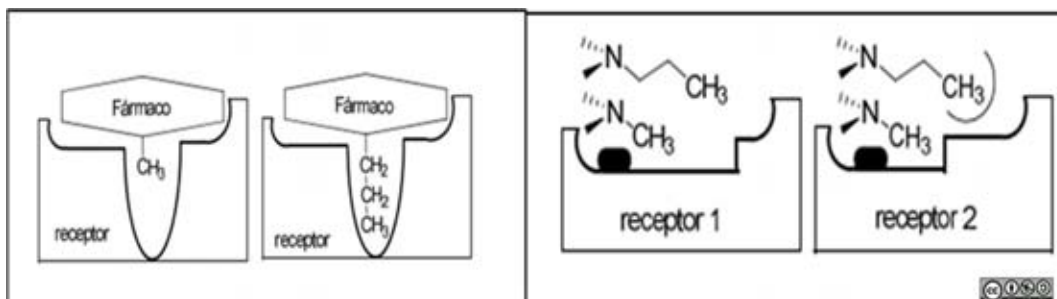


Figura 13. Ejemplo de cambios en el reconocimiento celular en función de la longitud de la cadena de fármaco: Fuente Daniel Collado Martín. Diseño y síntesis de compuestos biorgánicos activos. Departamento de Química Orgánica. Universidad de Málaga.

Propiedades farmacodinámicas

BSEP es un transportador relacionado con la exportación de sales biliares al canalículo biliar. Diferentes fármacos pueden inhibir este transportador bloqueando su función. Para analizar esta inhibición, definimos la variable **IC₅₀**. Este parámetro nos indica la dosis necesaria de cada fármaco para inhibir el 50% de BSEP. Debido a la amplia dispersión de este parámetro, utilizamos la aproximación logarítmica del mismo (**Log IC₅₀ BSEP**). A partir de este parámetro definimos los fármacos **inhibidores de BSEP** como aquellos que tenían una IC₅₀ menor que 300 μ M (Dawson, Stahl et al. 2012).

2.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Durante la inclusión en el Spanish DILI registry los pacientes fueron informados de los objetivos del registro y del estudio, solicitándoseles su consentimiento por escrito. Procediendo posteriormente a una entrevista con su médico y a su inclusión final en el estudio. Los pacientes que no dieron su consentimiento de manera expresa no fueron incluidos en el registro.

En todas las fases del registro se respetó lo establecido por la Ley de Protección de Datos (Ley Orgánica 15/1999, de 13 diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal). Se mantuvo la confidencialidad de todos los datos de carácter personal, los cuales quedaron anonimizados en la base de datos central, protegida por una contraseña conocida únicamente por el personal autorizado destinado al registro.

Para el actual estudio se solicitó la aprobación del estudio al comité ético de investigación clínica por parte del centro coordinador, el hospital universitario Virgen de la Victoria de Málaga.

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este estudio se estableció un umbral de $p=0,05$, como determinante de la significación estadística en los siguientes test. El resto de valores fue considerado no significativo. En el análisis estadístico de la información del estudio se utilizaron las siguientes herramientas estadísticas.

Técnicas de Estadística Descriptiva: Técnicas y herramientas empleadas para la descripción, el análisis y la representación de grupos de datos. Su propósito es tener una visión más precisa y global de las observaciones. Las herramientas que utiliza son la distribución de frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas; Estadísticos de tendencias central, dispersión y posición para las variables cuantitativas.

Técnicas de Estadística Inferencial: Herramientas fundamentada en el cálculo de probabilidades para extraer conclusiones sobre la aleatoriedad de un mecanismo a partir de sus manifestaciones, es decir, permite obtener información aplicable a toda la población a partir de una muestra de la misma mediante la estimación y el contraste de hipótesis. Los datos se analizaron usando las tablas de contingencia y diferentes test en función del tipo de variable que analizamos. Utilizando las pruebas siguientes.

Prueba de Chi-cuadrado se basa en la comparación de las frecuencias observadas frente a las frecuencias esperadas, si ambas variables son independientes entre si. Cuando el valor calculado es superior al tabulado para el nivel de significación establecido, se concluye que existe una diferencia observable entre las variables, es decir, que la probabilidad de obtener este resultado por azar es menor que la significación que para estos estudios queda fijada 0,05. Concluimos por tanto que se rechaza la hipótesis nula y asumimos la hipótesis de que las diferencias observadas en nuestra muestra son significativas a un nivel de confianza superior al 95 %.

Test T-Student es usado para el estudio de dos o más de dos muestras de variables cuantitativas y cualitativas. Cuando la hipótesis nula es cierta se obtiene que el estadístico posee una distribución t de Student. Se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal pero el tamaño muestral es demasiado pequeño como para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación típica en lugar del valor real.

ANOVA o Análisis de la varianza es una colección de colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está condicionada por diferentes variables explicativas. Es una de las pruebas estadísticas más robustas, sin embargo, para su uso las muestras deben cumplir condiciones de normalidad y homocedasticidad. Para validar estas condiciones se usaron el test de Kolmogorov- Smirnov y la prueba de Levene respectivamente. Esta prueba permite dirimir si alguna de las variables explicativas posee diferencias significativas en su varianza.

Test no paramétrico de **Mann-Withney o Kruskal Wallis** es una de las pruebas más usadas en estadística no paramétrica es un método para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Intuitivamente, es idéntico al ANOVA con los datos reemplazados por categorías. Al ser pruebas no paramétricas, no asumen normalidad en los datos, en oposición al tradicional ANOVA. Sí se asume, bajo la hipótesis nula, que los datos vienen de la misma distribución. La diferencia entre ambas pruebas es que la prueba de Mann-Whitney se establece solo para dos variables y la prueba de Kruskal Wallis para tres o más variables.

Aquellas variables que presentaban diferencias significativas entre las variables analizadas fueron analizadas para la elaboración de un modelo de regresión logística. La regresión logística es un tipo de análisis de regresión utilizado para predecir el resultado de una variable categórica en función de las variables independientes o predictoras. La regresión logística nos proporciona una ecuación que permite modelar la probabilidad de que ocurra determinado evento en función de los valores de las variables predictoras. Además nos

permite evaluar el riesgo relativo o el aumento del riesgo en proporción al aumento de cada una de las variables predictivas (Odds ratio, OR).

$$Y = \alpha + \beta x$$

Ecuación obtenida de la regresión lineal: Donde α y β son los coeficientes de regresión. El coeficiente α representa el punto en el que la línea corta el eje vertical o de ordenadas (valor de y para $x=0$). El coeficiente β representa la pendiente de la recta.

El modelo de regresión logística fue evaluado posteriormente mediante el test Hosmer-Lemeshow y el uso de curvas ROC. El Test de Hosmer-Lemeshow es un test de bondad de ajuste de los datos en el modelo. En este test se evalúa la distancia entre lo observado en la realidad y lo esperado bajo el modelo. En otras palabras, comprueba si el modelo propuesto puede explicar lo que se observa. O si por el contrario la población se comporta de manera diferente.

La curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor) es una representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad, según varía el umbral de discriminación. El punto óptimo del modelo se calcula usando el punto de inserción de la curva ROC con la línea de discriminación. Por otro lado el área bajo la curva (AUC) es un parámetro para evaluar la bondad del modelo, que tomará valores entre 1 (prueba perfecta) y 0,5 (prueba inútil). AUC se interpreta habitualmente como la probabilidad de que ante un par de individuos, uno enfermo y el otro sano, la prueba los clasifique correctamente (Hanley and McNeil 1982). Por ejemplo 0.75 equivaldría a un 75% de probabilidades de clasificarlos correctamente.

Las **interacciones** entre factores del huésped y propiedades farmacológicas fueron evaluadas de manera preliminar mediante un análisis de “**topic modeling**” basado en “Latent Dirichlet allocation” para ello se utilizó el paquete `mallet` mediante el lenguaje de programación R. Este análisis, cumplía la función de primer screening, informándonos de la existencia o no de potenciales interacciones. Posteriormente fueron analizados mediante aproximaciones de 2 y 3 vías. Al detectarse un gran número de potenciales interacciones, se procedió a evaluar todas las posibles interacciones fármaco-huésped mediante regresión nominal logística, mediante el siguiente script en R (Fig. 14).

En la elaboración de estos modelos se incluyeron cada uno de los parámetros de la interacción de manera individual y la interacción de ambos (additive assumption). Posteriormente cada una de las posibles interacciones fue validada de manera individual, para eliminar los falsos positivos debido a diferencias poblacionales. Las interacciones resultantes de este proceso fueron consideradas interacciones potenciales. Estas interacciones potenciales fueron validadas, junto con el resto de predictores independientes, en los modelos de regresión correspondientes para dar un modelo global utilizando el software estadístico JMP 10 by SAS.

```
#####
#Clear environment, set working directory, install/load packages
#####

rm(list = ls()) #Clear environment

#setwd("C:/Users/.../")

needInstall = FALSE

if(needInstall == TRUE){
  install.packages("reshape2")
  install.packages("plyr")
}

rm(needInstall)
install.packages(ggplot2)
#Load packages
library(reshape2)
library(plyr)

library(aod)
library(ggplot2)
library(Rcpp)
#####
# PREPARE DATA, SET CORE VARIABLES HERE:
#####

#Load data
#mydata <- read.csv("C:/", stringsAsFactors=TRUE)
mydata <- read.csv("C:/", na.strings="")

colnames(mydata) #see where HF end and DP begin and var names

#These variables will be in every equation
core_vars <- sort(c("HF_Underlyingdiseases", "DG_DD200mg", "DG_NO_metabolizada"))

#remove rownames?
mydata <- mydata[-1]

sum(complete.cases(mydata))

#CHANGE HF TO COLUMN # WHERE HOST FACTORS BEGIN AND END
HF <- c[1:62]
host_factors <- sort(colnames(mydata[HF]))

#CHANGE HF TO COLUMN # WHERE DRUG PROPERTIES BEGIN AND END
DP <- c[63:(ncol(mydata)-5)]
drug_properties <- sort(colnames(mydata[DP]))

#Rename endpoint to make code more generic (REPLACE DILI)
names(mydata)[names(mydata)=="Delayed"] <- "y"

#remove variables that contain all the same value
#i <- apply(mydata, 2, function(x) all(duplicated(na.omit(x))[-1L]))
#mydata <- mydata[-which[i]==TRUE]]
#host_factors <- host_factors[-which[host_factors %in% names[i]==TRUE]]]
#drug_properties <- drug_properties[-which[drug_properties %in% names[i]==TRUE]]]

#Check that there are two levels for y variable and fix if not
#for three levels change 2 to 3
if(length(levels(mydata$y))>2){mydata$y <- droplevels(mydata$y)}
```

Figura 14. R script para el modelo de interacciones entre propiedades farmacológicas y factores del huésped

```
#####
#
#####

combo_names <- t(expand.grid(host_factors, drug_properties))
combo_names <- unname(combo_names)

names_est <- paste("V", 1:200, "_est", sep="")#names for coefficient estimates
names_pv <- paste("V", 1:200, "_pv", sep="")#names for p-value estimate
names_OR <- paste("V", 1:200, "_OR", sep="")#names for Odd's ratio
var_names <- paste("V", 1:200, sep="")#key

for(i in 1:ncol(combo_names)){

  #Logistic regression
  form <- as.formula(paste("y ~", paste(core_vars, collapse = " + "), "+",
    paste(combo_names[,i], collapse = " * ")))

  eq <- glm(form, data=mydata, family=binomial, na.action=na.exclude)

  coeff<-(summary(eq)$coefficients[1:(nrow(summary(eq)$coefficients)],c(1,4)])

  if(i%%25==0){
    print(paste("Calculating: ", i, "%", ncol(combo_names), " ", combo_names[1,i], "**", combo_names[2,i], sep=""))
  }

  chisq_pvalue <- with(eq, pchisq(null.deviance - deviance, df.null - df.residual, lower.tail=FALSE)) #chi sq p_value for overall model significance

  temp <- data.frame(x=c(eq$aic, chisq_pvalue, as.vector(coeff)), #coefficients and pvalues
    exp(na.omit(coef(eq))), #odds ratios
    row.names=c("AIC", "chisq_pvalue",
      "Intercept_est", names_est[1:(nrow(coeff)-1)], #names for coefficient estimates
      "Intercept_p-value", names_pv[1:(nrow(coeff)-1)], #names for p-value estimate
      "Intercept_OR", names_OR[1:(nrow(coeff)-1)])) #names for Odd's ratio

  key <- c(row.names(coeff)[2:nrow(coeff)])
  names(key) <- c(var_names[1:(nrow(coeff)-1)])

  temp <- data.frame(t(key), t(temp), stringsAsFactors = FALSE)

  if(i==1){
    results <- temp
  }else{
    results <- rbind.fill(results, temp)
  }
}

results <- results[sort(colnames(results))] # order results columns alphabetically
results <- results[order(results$chisq_pvalue, results$AIC)] #order rows so that smallest chi sq value, AIC is at the top
results$AIC <- round(results$AIC, digits=2)

View(results)

Write to file. Change filename/path
write.csv(results, "C:/")
```

Figura 14 b. Continuación del R script para el modelo de interacciones entre propiedades farmacológicas y factores del huésped.

3. RESULTADOS

Durante los primeros veinte años de funcionamiento del Spanish DILI registry, se han evaluado un importante número de casos de sospecha de hepatotoxicidad, tanto inducida por fármacos como por productos dietéticos. Tras un exhaustivo análisis, a fecha de agosto de 2014, un total de 870 casos habían cumplido los requisitos para ser incluidos en el Spanish DILI registry. Para la realización de los tres estudios aquí presentados, se excluyeron 169 casos de hepatotoxicidad asociadas a fármacos debidos a que no cumplían los requerimientos de este estudio.

3.1 ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES EN EL TIPO DE DAÑO HEPÁTICO.

El tipo de daño hepático es definido como hepatocelular, colestásico o mixto, basado en el perfil bioquímico de la lesión. Esta categorización es importante, ya que podría ayudar al diagnóstico y es un indicativo de la posible evolución de la reacción. (Fontana, Seeff et al. 2010). A pesar de que algunos fármacos se han relacionado típicamente con un tipo de daño hepático, se desconoce qué factores del fármaco o del paciente son los inductores de este perfil. Aunque estudios previos han apuntado el papel de algunos de ellos como la edad (Lucena, Andrade et al. 2009).

Para el estudio del análisis de las propiedades farmacológicas, los factores del huésped y su interacción en el desarrollo de DILI, se seleccionaron 701 casos correspondientes a 692 pacientes, de los cuales 9 sufrieron un segundo episodio de DILI debido a un fármaco diferente del responsable del primer episodio.

3.1.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

Los casos se clasificaron en función de su perfil daño, para la comparación del tipo de daño solo se analizaron los casos hepatocelulares y colestásicos. Los casos mixtos no fueron incluidos en el estudio comparativo. Los casos mixtos presenta características híbridas entre los diferentes tipos de daño, en muchos de ellos debido a la conjunción de una detección tardía y la evaluación de los casos a lo largo del tiempo. Por ello se consideró que era un grupo heterogéneo y no fueron incluidos en esta parte del estudio. Tras esta selección, se obtuvieron 437 casos de tipo hepatocelular y 126 casos con daño colestásico. Las características demográficas mostraron diferencias tanto en edad como en género de los pacientes según el tipo de daño, siendo menor la edad media de los pacientes con el daño hepatocelular (52 vs 62 años, $p < 0,0001$) y predominando el sexo femenino en el mismo grupo (53% vs 43%, $p = 0,0479$) (Tabla 3). Estos resultados fueron similares a los observados en un estudio previo de nuestro grupo (Lucena, Andrade et al. 2009). El IMC fue similar en ambos grupos.

Las características clínicas de la lesión fueron diferentes en ambos perfiles de daño hepática. Se observó que los casos hepatocelulares tenían mayor duración del tratamiento y del tiempo de aparición de la reacción (38 vs 16 días, $p = 0,0004$) y (30 vs 20 días, $p = 0,0010$), respectivamente. Además se observó que la dosis del fármaco inductor del daño eran menores en los casos hepatocelulares frente a los colestásicos (300 vs 600 mg, $p < 0,0001$). Los pacientes que presentaban daño hepatocelular exhibían una menor tasa de presentación de trastornos en el hemograma (45% vs 66%, $p = 0,0003$), principalmente justificado en un menor número de pacientes con linfopenia (17% vs 32%, $p = 0,0055$) y/o eosinofilia (19% vs 30%, $p = 0,0207$) (tabla 4). También se observó una menor frecuencia de los casos con plaquetopenia, aunque esta disminución no fue significativa. (4% vs 9%, $p = 0,0813$). En relación con la presencia de autoinmunidad, no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de daño.

Tabla 3. Características demográficas de la población en función del tipo de daño hepático

	Hepatocelular (n=437)	Colestásico (n=126)	<i>p</i>
Características demográficas			
Edad, media (rango)	52 (16-90)	62 (11-88)	<0,0001
Mujeres, n %	231 (53%)	54 (43%)	0,0479
IMC kg/m ²	26 (17-41)	26 (17-38)	0,7290

Los porcentajes han sido calculados en función del número de casos con información en cada parámetros. Abreviaciones: IMC, índice de masa corporal. * La distribución de pacientes que poseen datos en esta categoría es 62% hepatocelulares y 65% colestásicos.

Tabla 4. Información clínica de las reacciones de hepatotoxicidad en función del tipo de daño.

Parámetros clínicos y demográficos	Hepatocelular (n=437)	Colestásico (n=126)	<i>p</i>
Duración de la terapia, mediana d (rango)	38 (1-2313)	16 (1-1826)	0,0004
Tiempo de aparición, mediana d (rango)	30 (1-2313)	20 (1-1828)	0,0010
Dosis diaria mediana, mg (rango)	300 (0,04-6000)	600 (0.15-6000)	0,0001
Ictericia, n (%)	272 (62)	94 (75)	0,0342
Rash, n (%)	22 (5)	9 (7)	0,6457
Eosinofilia, n (%)*	77 (19)	36 (30)	0,0207
Linfopenia, n (%)*	64 (14)	34 (27)	0,0055
Autoanticuerpos positivos, n (%)	95 (22)	19 (15)	0,1922
Antinucleares (ANA)	57 (18)	15 (17)	
Anti-muscular liso (AMLA)	35 (12)	8 (10)	
Anti-mitocondriales (AMA)	10 (3)	-	
Historial de alergias previas	49 (11)	5 (4)	0,0393
Presencia enfermedades subyacentes, n (%)	328 (76)	100 (81)	0,3069

Los porcentajes han sido calculados en función del número de casos con información en cada parámetros.* La distribución de pacientes que poseen datos de linfopenia son 81% hepatocelulares frente al 84% colestásicos y la distribución de pacientes que poseen datos en autoanticuerpos son 78% hepatocelulares y 79% colestásicos.

La sintomatología presento diferencias según el tipo de daño. Los pacientes hepatocelulares presentaban menos alteraciones del metabolismo de la bilirrubina (66% vs 80%, $p=0,0067$), principalmente relacionado con una menor incidencia de ictericia (62% vs 75%, $p=0,0060$) y una menor presencia de acolia (9% vs 20%, $p=0,0031$). También presentaron menor número de trastornos epiteliales (16% vs 32%, $p=0,0003$) justificados casi exclusivamente por la baja frecuencia de prurito (15% vs 31%, $p=0,0008$). Por el contrario los casos hepatocelulares mostraron una mayor frecuencia de manifestaciones somáticas en su sintomatología (36% vs 19%, $p=0,0023$) justificada en su totalidad por una mayor presentación de astenia por los pacientes hepatocelulares (33% vs 16%, $p=0,0012$). (Fig. 15-18)

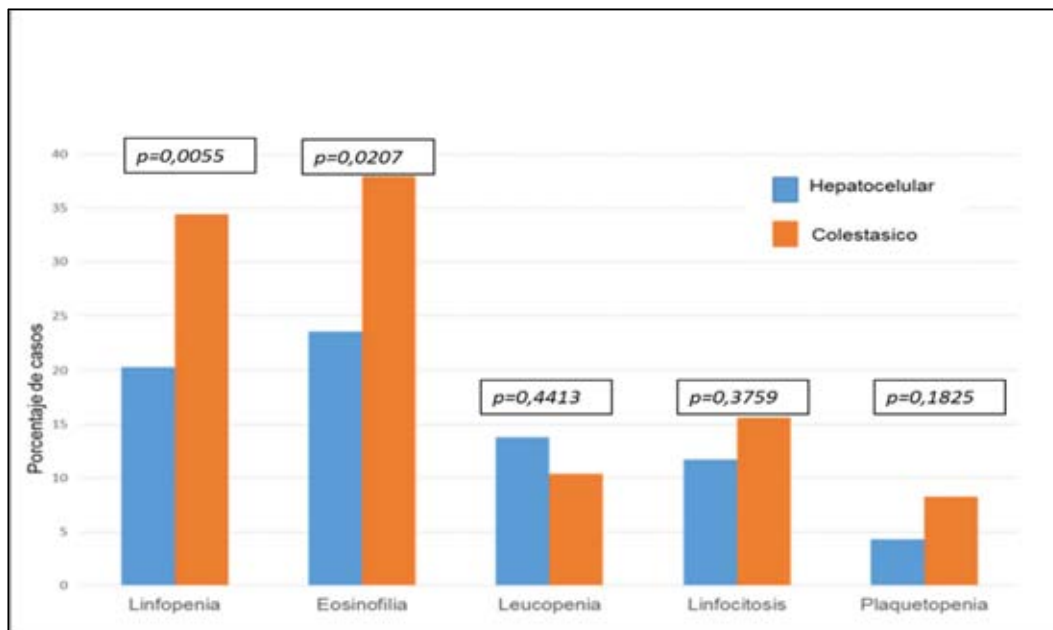


Figura 15. Distribución de los trastornos hematológicos entre los casos de daño colestásico y los casos de daño hepatocelular.

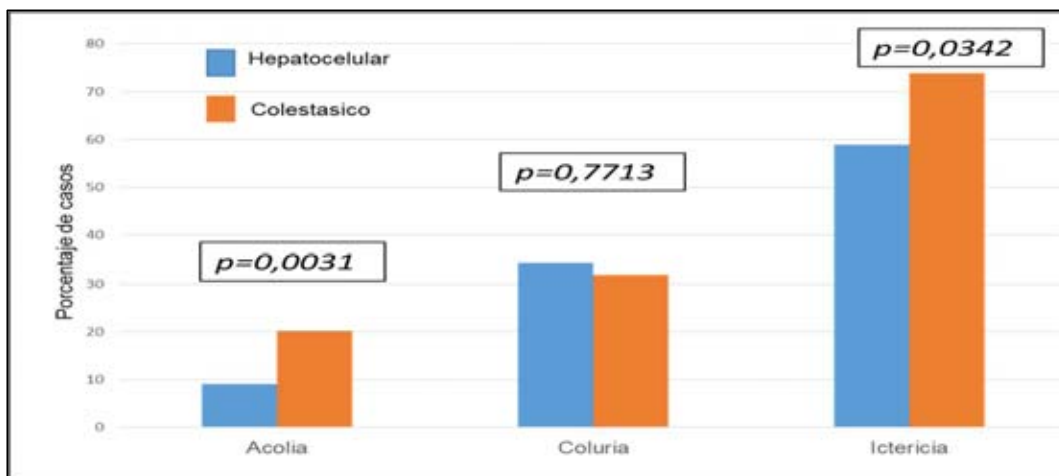


Figura 16. Distribución de los trastornos en el metabolismo de la bilirrubina entre los casos colestásicos y los casos hepatocelulares.

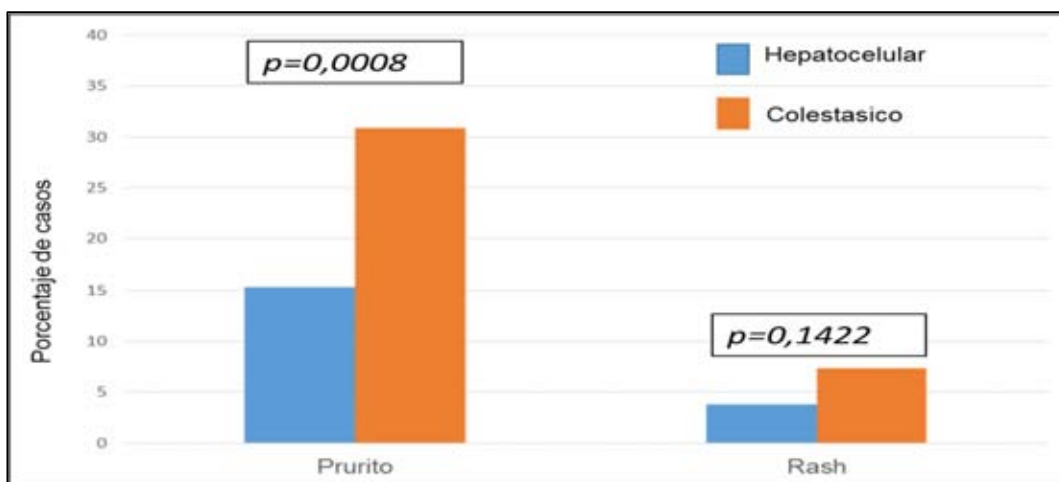


Figura 17. Distribución de los trastornos epiteliales entre los casos de daño colestásico y los casos de daño hepatocelular.

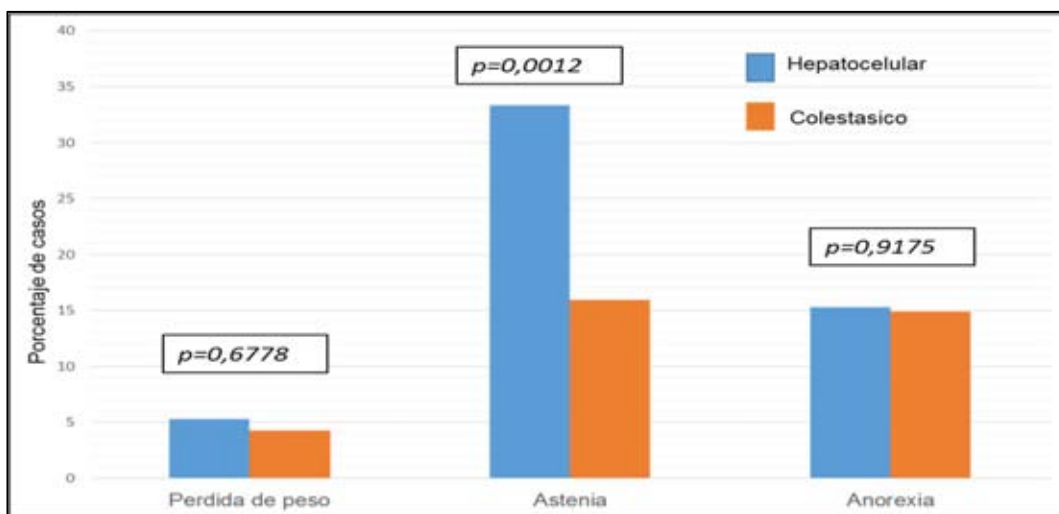


Figura 18. Distribución de la presentación de manifestaciones somáticas entre los casos de daño colestásico y los casos de daño hepatocelular.

3.1.2 COMORBILIDADES SEGUN EL TIPO DE DAÑO HEPÁTICO

En este subanálisis, se intentó determinar si la presencia de comorbilidades y otros antecedentes clínicos estaban vinculados a alguno de los perfiles de daño. Ambos grupos de pacientes mostraron similar incidencia de enfermedades subyacentes. Al analizar estas enfermedades, se observó que los casos hepatocelulares presentaban menor frecuencia de comorbilidades cardiacas, (8% vs 18%, $p=0,0049$). En esta misma línea, se comprobó que existían una menor presencia de enfermedades vasculares (16% vs 32%, $p=0,0002$), así como una mayor frecuencia hipertensión previa (17% vs 29%, $p=0,0036$) (Fig. 19). Solo las enfermedades autoinmunes presentaron mayor frecuencia en los casos hepatocelulares. No obstante, estas diferencias no fueron significativas estadísticamente (7,2% vs 2,4%, $p=0.0809$).

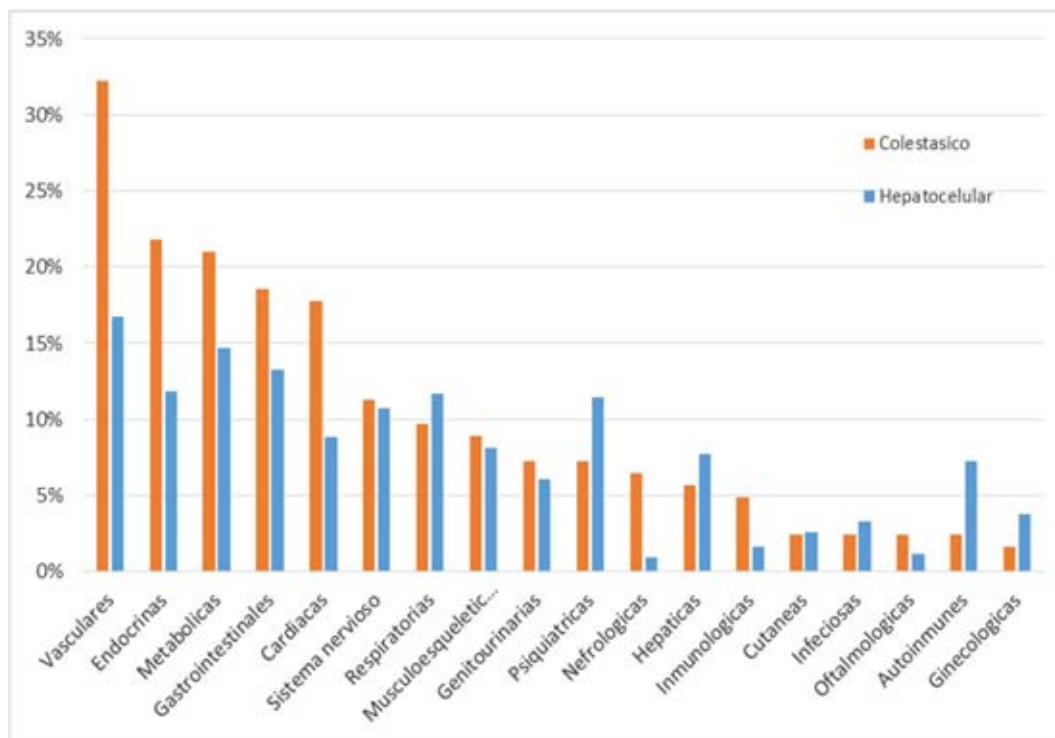


Figura 19. Distribución de las principales comorbilidades de los pacientes según el tipo de daño hepático.

3.1.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS ASOCIADOS AL TIPO DE DAÑO.

Se analizaron las propiedades de los fármacos, las cuales pueden agruparse en tres categorías: Físicoquímicas, farmacodinámicas y farmacocinéticas. Un total de 143 fármacos diferentes fueron imputados como responsables de la reacción en los casos de daño hepatocelular. Por su parte, 55 fármacos fueron imputados como inductores de un daño colestásico.

Propiedades físicoquímicas

Los casos hepatocelulares mostraron una menor presencia de fármacos con átomos de azufre (40% vs 75%, $p < 0,0001$), por el contrario presentaban un mayor proporción de fármacos con átomos halógenos (36% vs 25%, $p = 0,0190$). Unido a lo anterior se observó menor cantidad de anillos con heteroátomos en los casos hepatocelulares (1,21 vs. 1,69, $p < 0,0001$). Aunque la cantidad de anillos totales y aromáticos no presentaron diferencias significativas de manera individual, su índice mostró diferencias significativas, indicando que en los casos hepatocelulares había una mayor tasa de anillos aromáticos frente al total de anillos de la molécula (0,44 vs 0,35, $p = 0,0067$). De esta manera se calculó que la mitad de los anillos en los fármacos hepatocelulares eran aromáticos, mientras que en los casos colestásico solo un tercio lo eran. (Tabla 5)

Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas

Mostraron que aquellos fármacos inductores de los casos hepatocelulares presentaban: un tiempo de vida media mayor (4,5 vs 2,0 h, $p = 0,0012$), un índice de lipofilia mas alto calculado mediante logP (1,9 vs -0,3, $p < 0,0001$) y poseían una mayor afinidad por las proteínas plasmáticas (84 vs 22% col, $p < 0,0001$). Se observó que las mayores diferencias se correlación con el metabolismo, así los fármacos de los casos hepatocelulares presentaban de manera mayoritaria un metabolismo hepático significativo (73% vs 46%, $p < 0,0001$), una alta tasa de circulación enterohepática (32% vs 11%, $p < 0,0001$) y una baja tasa de excreción en forma inalterada, alrededor del 23% de los fármacos se excretaron sin metabolizar en el grupo de los casos hepatocelulares y un 49% en los casos colestásicos ($p < 0,0001$). (Tabla 6)

Al clasificar los fármacos según los criterios BDDCS, se observó que exista una importante incremento de los fármacos de categoría 1 y 2 (que agrupan a los fármacos de muy alto metabolismo hepático ($\geq 70\%$), tanto con alta como con baja solubilidad) en los casos hepatocelulares, a expensas principalmente de fármacos de la categoría 3 (bajo metabolismo y alta solubilidad), que eran mayoritarios en los casos colestásicos ($p < 0,0001$). No se encontraron diferencias en la producción de metabolitos reactivos o en el riesgo de daño mitocondrial entre ambos grupos. (Tabla 6).

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los fármacos.

Propiedades farmacológicas (fisicoquímicas)	Hepatocelular (n=437)	Colestásico (n=126)	<i>p</i>
Masa molecular, mediana D	337	365	0,1998
Numero de anillos, media	2,51	2,79	0,0224
Numero de anillos aromáticos, media	1,10	0,90	0,0654
Índice anillos arom/totales, media	0,44	0,35	0,0067
Anillos con heteroátomos, media	1,21	1,69	0,0001
Anillos fusionados, media	0,98	1,03	0,0013
Presencia de átomos de azufre, n (%)	150 (40)	77 (65)	0,0001
Presencia de átomos halógenos, n (%)	137 (36)	29 (25)	0,0190
Electronegatividad atómica alta (Escala Pauling), media	0,99	0,99	0,8383
Índice de distancia topológica molecular, media (rango)	6139 (90-65429)	6572 (138-57600)	0,8967
Volumen McGowan, media (rango)	2,46	2,52	0,3400
Energía libre (escala de Platts), media	2,36	2,58	0,0067
Superficie topológica polar, media (rango)	99 (1-321)	115 (3-287)	0,0078
Tasa de hibridación de orbitales, media	0,36	0,42	0,0010
Longitud media de cadena, media de numero de átomos	5,47	5,10	0,3397
Longitud media de cadena alifática, media de numero de átomos	1,90	1,92	0,9401
Lipoafinidad, media	4,10	2,09	0,0001

Los porcentajes han sido calculados en función del número de casos con información en cada parámetro.

Tabla 6. Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los productos imputados en función del daño hepático.

Propiedades farmacológicas	Hepatocelular (n=437)	Colestásico (n=126)	<i>p</i>
Farmacocinéticas			
Vida media de eliminación, mediana h	4,5 (0,2-504)	2,0 (0,2-75)	0,0012
Lipofilia (LogP), mediana (rango)	1,90 ((-6)-8,3)	-0,30 ((-2,5)-7,14)	0,0001
Tasa de unión a proteínas, mediana	84	22	0,0001
Metabolismo hepático ≥ 50%, n (%)	295 (73)	56 (47)	0,0001
Tasa de excreción con baja tasa de metabolización, n (%)	89 (23)	59 (49)	0,0001
Circulación enterohepática, n (%)	117 (31)	13 (11)	0,0001
Formación de metabolitos reactivos, n (%)	258 (66)	85 (71)	0,4135
Riesgo de daño mitocondrial, n (%)	290 (76)	95 (80)	0,2920
Clasificación sistema BDDC			
• 1	167 (41)	30 (25)	
• 2	134 (33)	24 (20)	0,0001
• 3	88 (22)	57 (47)	
• 4	16 (4)	9 (7)	
Farmacodinámicas			
BSEP IC ₅₀ , mediana μM	581	608	0,5314
Inhibidor de BSEP, n (%)	162 (43)	41 (35)	0,1129

Los porcentajes han sido calculados en función del número de casos con información en cada parámetro. Abreviaciones: μM, micromolar.

3.1.4 COMEDICACIÓN Y SU INFLUENCIA EN EL TIPO DE DAÑO

Del total de pacientes que consumían comedicación, se observó que comedicación para el tratamiento de afecciones cardíacas y para el tratamiento de la sangre, tenían una representación más significativa en el grupo de los colestásicos ($p=0,0002$ y $p=0,0006$, respectivamente). Por el contrario la comedicación para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas presentaba una mayor frecuencia en los casos hepatocelulares ($p=0,0309$). (Fig. 20).

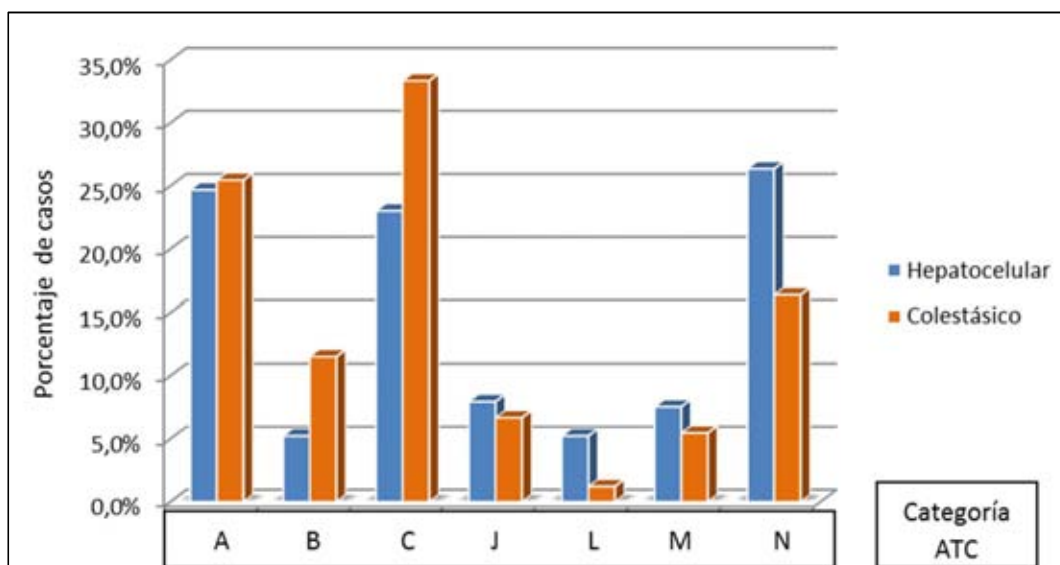


Figura 20. Distribución de la comedificación entre pacientes colestásicos y hepatocelulares, Categorías ATC: A=Trastornos alimentarios y metabólicos, B= Sangre y órganos formadores de sangre, C= Sistema cardiovascular, J=Antiinfecciosos, L= Antineoplásicos, M= musculo esqueléticos, N= Tratamientos sistema nervioso.

3.1.5 ANÁLISIS MULTIVARIANTE (REGRESIÓN LOGÍSTICA)

Posteriormente al análisis univariante de los parámetros clínicos, demográficos, farmacológicos y en las comorbilidades, se realizó un análisis multivariante de todos los factores predictores, que se manifestaban de manera previa a la aparición del daño. Con el objetivo de encontrar que factores condicionaban la aparición específica de un tipo de daño, se realizó una regresión logística.

Los factores que fueron calificados como elementos predictores del daño hepatocelular fueron **potenciadores del daño hepatocelular**: la edad inferior a 60 años (OR 2,06 [95% IC: 1,28-3,34], $p=0,0029$), el haber desarrollado cuadros alérgicos previos a fármacos (OR 2,69 [95% IC: 1,01-8,24], $p=0,0493$), el fármaco responsable del episodio tuviera descrita circulación enterohepática (OR 4,94 [95% IC: 2,34-11,45], $p<0,0001$), el fármaco tuviera alta metabolización hepática (OR 1,70 [95% IC: 1,02-2,84], $p=0,0417$), poseyera una alta tasa de hibridación de orbitales sp^3 a sp^2 (<50%). Entre los elementos **protectores frente al daño hepatocelular** aparecieron: el consumo de comedificación para el tratamiento de afecciones cardiacas (OR 0,47 [95% IC: 0,29-0,77], $p=0,0030$) y el número de anillos con heteroátomos en la molécula, siendo valores más altos asociados con daño colestásico (OR 0,68 [95% IC: 0,52-0,88], $p=0,0270$). (Tabla 7)

Tabla 7. Factores predictores del daño hepatocelular.

Predictores	<i>p</i>	OR	IC 95
Paciente			
Edad <60 años	0,0029	2,06	(1,28-3,34)
Antecedentes alérgicos a fármacos	0,0493	2,61	(1,01-8,24)
Comedicación			
Tratamiento enfermedades cardíacas	0,0030	0,47	(0,29-0,77)
Medicación responsable			
Alto metabolismo hepático (>=50%)	0,0417	1,70	(1,02-2,84)
Circulación enterohepática	0,0001	4,94	(2,34-11,45)
Baja tasa de hibridación (<50%)	0,0285	2,04	(1,08-3,87)
Numero de anillos con heteroátomos	0,0270	0,68	(0,52-0,88)

Posteriormente al análisis se evaluaron los resultados mediante el test Hosmer-Lemeshow, el cual mostró que no existían diferencias entre el modelo predicho y los valores observados, siendo por tanto el modelo válido. Posteriormente se calculó la curva ROC, para testear la calidad del modelo predictivo frente a los valores reales.

3.1.6 INTERACCIONES CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE - PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.

En esta parte del estudio, se evaluó como los factores del paciente podrían modular el efecto de las propiedades farmacológicas sobre el tipo de daño hepático. Así se analizó la interacción entre los predictores encontrados en la regresión logística.

Los antecedentes alérgicos a fármacos mostraron diferentes efectos moduladores de las propiedades farmacológicas. Así se observó que la circulación enterohepática tenía mayor riesgo de daño hepatocelular en pacientes con antecedentes alérgicos. Por el contrario, el metabolismo hepático se relacionaba de manera inversa con antecedentes alérgicos, poseyendo mayor riesgo de daño hepatocelular los pacientes con alto metabolismo hepático y sin reacciones antecedentes alérgicos.

Los anillos con heteroátomos mostraron un mayor rol protector en los casos con reacciones antecedentes alérgicos. Por último, el radio de hibridación mostró un efecto contradictorio, siendo un factor de riesgo en los casos con antecedentes alérgicos y siendo protector en los casos sin antecedentes alérgicos. Estas diferencias podrían ser indicativas de un mecanismo subyacente en los pacientes con antecedentes alérgicos, el cual alteraría su predisposición al daño hepático, aunque también podrían ser debidos a un artefacto matemático por la reducida población con reacciones alérgicas previas, siendo el grupo que presentaba antecedentes alérgicos menos del 10% de la población total.

Por otro lado, los grupos de pacientes con ≥ 60 y < 60 años presentaron diferencias importantes en la interacción, aunque solo con respecto a dos propiedades farmacológicas el metabolismo hepático y la circulación enterohepática. Sin embargo a diferencia de lo que se observó con los antecedentes alérgicos, estas poblaciones poseían similar número de pacientes, siendo cercanas ambas al 50% de la población global. Estos datos sugieren que la edad actuaría de modulador del daño hepático, esta modulación modificaría el efecto inductor de daño hepatocelular que poseen tanto la circulación enterohepática como el metabolismo hepático. En otras palabras, los pacientes jóvenes poseen mecanismo que amortiguan el efecto inductor de las propiedades farmacológicas. Sin embargo en pacientes mayores se perderían los mecanismos moduladores lo cual permitirá un mayor efecto de las propiedades fisicoquímicas en la expresión del daño. (Tabla 8, Fig. 21,22)

Tabla 8. Evaluación del cambio en el riesgo relativo (razón de moebius) en el desarrollo de daño hepatocelular, en función de la combinación de los principales factores predictores del daño hepatocelular.

	Antecedentes alérgicos (53)	Sin antecedentes alérgicos (502)	Edad ≥ 60 años (250)	Edad < 60 años (304)
Metabolismo hepático	2,91	5,25	4,39	1,85
Circulación enterohepática	3,91	1,16	4,99	2,33
Tasa de hibridación	1,02	0,12	0,54	0,16
Numero de anillos con heteroátomos	0,14	0,53	0,66	0,56

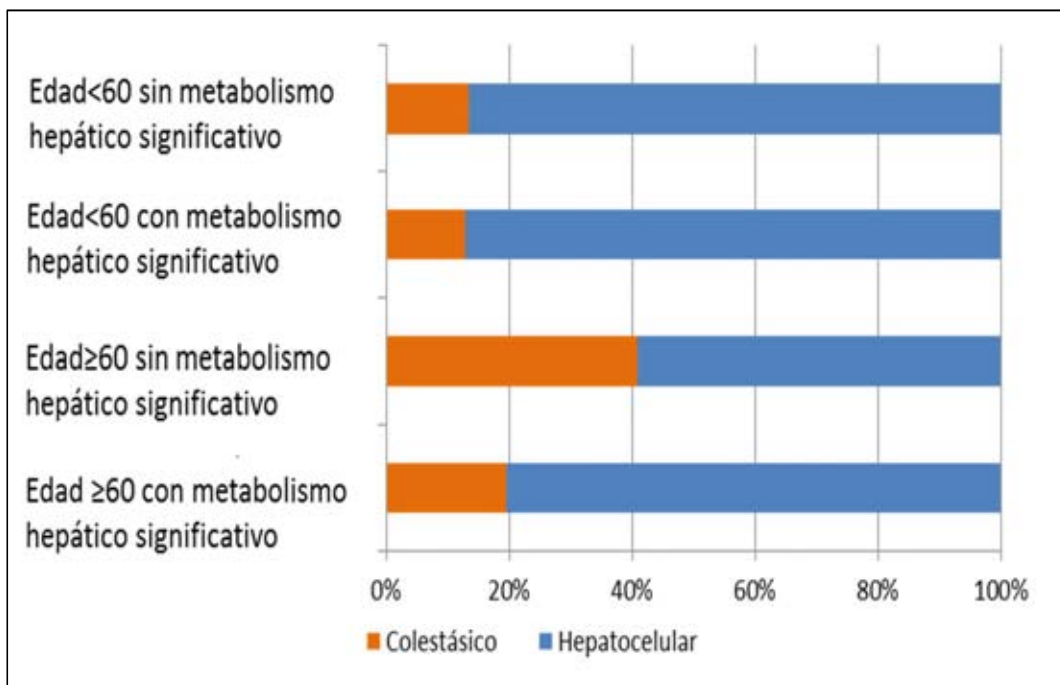


Figura 21. Distribución de los casos hepatocelulares y colestásicos en función de la edad y el metabolismo hepático.

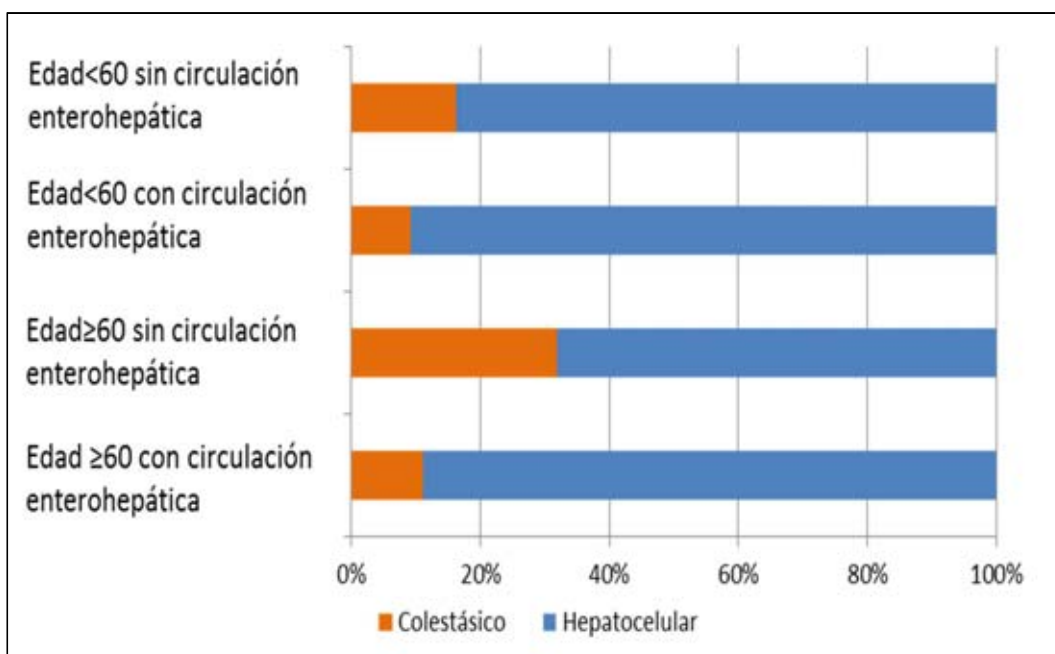


Figura 22. Distribución de los casos hepatocelulares y colestásicos en función de la edad y la circulación enterohepática.

3.2 ANALISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES EN LA APARICION DIFERIDA DE LOS SÍNTOMAS

La mayoría de los pacientes afectados de daño hepático inducido por fármacos, desarrollan su sintomatología, mientras permanecen en tratamiento con el fármaco responsable de la reacción. Sin embargo existe una minoría de pacientes, en los cuales las manifestaciones de DILI aparecen después de la finalización del tratamiento. La razón que subyace a este retraso en la aparición de la sintomatología permanece en la oscuridad, incrementando la confusión que rodea a esta patología, entorpeciendo el establecimiento de una relación entre la reacción adversa y el fármaco.

Para identificar el potencial para inducir inicio diferido de los síntomas (IDF) de los fármacos. Se seleccionaron aquellos fármacos que poseían al menos tres casos DILI en el Spanish DILI registry, independientemente del momento de inicio. Un total de 10 fármacos fueron identificados como potenciales inductores de IDF (PIDF) y 32 fármacos fueron identificados como fármacos sin potencial para inducir IDF (nPIDF). Los fármacos con PIDF fueron consumidos en 204 casos de los presentes en el Spanish DILI registry, mientras que los fármacos con nPIDF habían sido consumidos en un total de 209 casos DILI. De los 204 inducidos por fármacos PIDF, 95 (46%) presentaron IDF con una latencia entre 2 y 52 días después de finalizar el tratamiento.

3.2.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

Las características demográficas de los pacientes fueron evaluadas para elucidar su rol en el inicio diferido de los síntomas. Tres grupos fueron comparados: los casos con IDF y sin IDF que consumieron medicación con PIDF y los casos que consumieron fármacos nPIDF.

Las características del huésped fueron analizadas en aquellas pacientes que consumieron fármacos PIDF (204 casos). Los casos IDF en este grupo presentaron una mayor dosis diaria (2004 vs 1018 mg, $p=0,0082$), mayor frecuencia de ictericia (82 vs 70%, $p=0,0251$) y una menor prevalencia de enfermedades subyacentes (53 vs 67%, $p=0,0393$). Los casos IDF también manifestaron una mayor tendencia de eosinofilia al inicio del episodio (38 vs 24%, $p=0,0615$). Estas diferencias se mantuvieron cuando se incluyeron en la comparación, aquellos casos DILI inducidos por fármacos nPIDF (209 casos).

Además se observó que estos casos inducidos por nPIDF poseían una duración más prolongada del tratamiento (40 vs 8 vs 9 mediana días; $p=0,0002$) y del tiempo de inicio de la reacción (49 vs 19 vs 7 mediana días; $p=0,0001$) en comparación con el resto de los casos. En la primera comparación realizada entre los grupos consumidores de fármacos PIDF no se encontraron diferencias significativas en el perfil de daño hepático ($p=0,8004$), sin embargo se encontró esta significación en la comparación realizada entre los tres grupos ($p=0,0001$). No obstante, esta diferencia parece deberse al peso de los casos inducidos por AC, los cuales desarrollaban mayoritariamente daño colestásico y mixto. No se encontraron otras diferencias en parámetros demográficos o clínicos (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de parámetros demográficos, clínicos y de gravedad en 204 pacientes, los cuales consumieron fármacos PIDF y 209 pacientes que consumieron fármacos nPIDF.

Factores del paciente	PIDF		nPIDF	p
	Inicio diferido (95)	No Inicio diferido (109)	No Inicio diferido (209)	
Demográficos				
Edad, media (rango)	57 (11-88)	58 (16-90)	57 (14-88)	0.7012
Mujeres, n (%)	45 (47)	56 (52)	106 (49)	0.4779
Clínicos				
Duración de la terapia, mediana d (rango)	8 (1-43)	9 (1-1826)	40 (1-1827)	0.0002 ^a
Tiempo de aparición, mediana d (rango)	19 (6-73)	7 (1-1826)	49 (1-1827)	0.0001 ^b
Dosis diaria, media mg (rango)	2004 (20-5625)	1681 (20-4250)	371 (1-6000)	0.0001 ^c
Ictericia, n (%)	79 (82)	76 (70)	142 (66)	0.0089 ^d
Eosinofilia, n (%)	36 (38)	26 (24)	45 (20)	0.0122 ^e
Autoanticuerpos +, n (%)	16 (17)	24 (22)	45 (21)	0.3185
Antinucleares (ANA)	5 (12)	60 (18)	9 (11)	
Anti-musculo liso (AMLA)	1 (3)	38 (12)	5 (7)	
Anti-mitocondriales (AMA)	0	7 (2)	4 (5)	
Presencia enfermedades subyacentes, n (%)	50 (53)	69 (64)	194 (85)	0.0001 ^f
Perfil de daño, n (%)				
Hepatocelular	40 (43)	46 (44)	145 (68)	0.0001 ^g
Colestasico	26 (28)	32 (31)	36 (17)	
Mixto	27 (29)	26 (25)	31 (15)	
Severity, n (%)				0.3178
Mild	17 (18)	28 (26)	65 (32)	
Moderate	71 (75)	69 (65)	111 (55)	
Severe	5 (5)	4 (4)	17 (8)	
Fatal/Transplant	2 (2)	5 (5)	10 (5)	

- A. La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas en el tiempo de inicio entre el grupo que consumida fármacos nPIDF y ambos grupos con medicacion PIDF.
- B. La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas en la duración del tratamiento entre el grupo que consumía fármacos nPIDF y ambos grupos con medicaicon PIDF.
- C. La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas en las dosis diarias entre los tres grupos.
- D. La prueba de Chi-cuadrado mostro diferencias significativas en la frecuencia de ictericia en el grupo de IDF frente al resto.
- E. La prueba de Chi cuadrado mostró diferencias significativas en la frecuencia de eosinofilia en el grupo IDF frente a otros dos grupos.
- F. La prueba del Chi cuadrado mostró diferencias significativas entre los tres grupos de población.
- G. La prueba Chi-cuadrado mostro diferencias significativas entre los tres grupos de población.
- H. La prueba Chi-cuadrado mostró diferencias significativas entre los tres grupos de población.

3.2.2 COMORBILIDADES EN EL INICIO DIFERIDO DE LOS SÍNTOMAS

Las comorbilidades mostraron diferencias significativas entre los tres grupos analizados, así los pacientes que desarrollaron IDF padecían con menor frecuencia comorbilidades, seguido por los pacientes sin IDF y siendo los pacientes que habían consumido fármacos nPDIF los que presentaban mayor tasa de comorbilidades (53% vs 64% vs 85%; $p=0001$)(Tabla 9). Ninguna comorbilidad destacó en este estudio debido a su limitado número de casos(Tabla 10).

Tabla 10. Enfermedades en 204 pacientes, los cuales consumieron fármacos PDIF y 209 pacientes que consumieron fármacos nPDIF.

Enfermedades	PIDF		nPDIF		
	Inicio diferido (95)	No Inicio diferido (109)	No Inicio diferido (209)	Inicio diferido (95)	
Autoinmunes	2 (2)	2 (2)	15 (7)		0,0395 ^a
Cardíacas	6 (6)	10 (9)	30 (14)		0,0857
Cutáneas	1 (1)	3 (3)	6 (3)		0,6095
Endocrinas	13 (14)	17 (16)	30 (15)		0,9251
Gastrointestinales	8 (8)	15 (14)	28 (14)		0,4088
Genitourinarias	5 (5)	3 (3)	21 (10)		0,0390 ^b
Ginecológicas	2 (2)	2 (2)	6 (3)		0,8241
Inmunológicas	3 (3)	-	5 (3)		0,2091
Infeciosas	2 (2)	-	4 (2)		0,3320
Nefroticas	1 (1)	2 (2)	6 (3)		0,5743
Metabólicas	11 (12)	19 (18)	49 (24)		0,0522
Musculoesqueléticas	3 (3)	15 (14)	13 (6)		0,0101 ^c
Sistema nervioso	6 (6)	4 (4)	36 (17)		0,0030 ^d
Oftalmológicas	2 (2)	1 (1)	1 (1)		0,4077
Psiquiátricas	2 (2)	5 (5)	22 (10)		0,0142 ^e
Respiratorias	11 (12)	9 (8)	20 (5)		0,0984
Vasculares	24 (25)	26 (24)	48 (23)		0,9175

- a) Chi-square test showed significant differences on autoimmune diseases in nPDO group versus rest of groups.
 b) Chi-square test showed significant differences on genitourinary diseases in nPDO group versus rest of groups.
 c) Chi-square test showed significant differences on Musculoskeletal diseases in nDO with PDO group versus rest of groups.
 d) Chi-square test showed significant differences between three groups of population.
 e) Chi-square test showed significant differences on genitourinary diseases in nPDO group versus rest of groups.

3.2.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LOS FÁRMACOS ASOCIADOS A LOS DIFERENTES TIPOS DE DAÑO.

Clase farmacológica

En este estudio la clase farmacológica más frecuente en el grupo de PIDF fueron los antiinfectivos, en especial los antibacterianos (7 fármacos, 70%), seguido de los antiinflamatorios (3 fármacos, 30%). Los fármacos presentes en el grupo nPIDF fueron mayoritariamente fármacos para el tratamiento del sistema nervioso (9 fármacos, 27%), seguidos de los fármacos cardiovasculares 7 (21%) y los fármacos para el tratamiento de enfermedades digestivas 5 (15%).

Propiedades fisicoquímicas

Para determinar el papel de las propiedades farmacológicas en los casos de IDF en DILI, se realizó un análisis comparativo entre el grupo de fármacos que poseían PIDF y el grupo nPIDF. Se observó que los fármacos que poseían PIDF tenían una estructura química con mayor número de anillos (3,3 vs 2,3, $p=0,0343$) y heteroanillos (2,1 vs 1,2, $p=0,0104$). Los medicamentos con PIDF mostraban también una tendencia a poseer cadenas con menor número de átomos, tanto totales (3,2 vs 6,1 átomos, $p=0,0876$) como de átomos alifáticos exclusivamente (0,6 vs 2,4 átomos, $p=0,0738$). Además, los fármacos con PIDF mostraban un mayor peso molecular, aunque esta diferencia no alcanzó el umbral de la significación (412 vs 328 g/mol, $p=0,0633$) (Tabla 11)

Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas

Los medicamentos con PIDF incluían una mayor proporción de moléculas con bajo metabolismo hepático <50% (55 vs 19%, $p=0.0190$), así como una proporción elevada de fármacos excretados sin metabolizar (50 vs 6%, $p=0.0015$). Usando la clasificación BDDCS, se observaron diferencias entre los dos grupos de fármacos, los fármacos BDDCS de tipo 1 (alto metabolismo/alta solubilidad) y 2 (alto metabolismo/baja solubilidad) eran más predominantes en los fármacos PIDF (42 vs 0% y 42 vs. 20%, respectivamente), mientras que los fármacos BDDCS 3 (bajo metabolismo/baja solubilidad) fueron predominantes

en el grupo de fármacos con PDIF (60 vs 6%). Ninguna otra característica fisicoquímica como la vida media, la unión a proteínas, la lipofilia (LogP) o la producción de metabolitos reactivos mostro diferencias significativas entre ambos grupos de fármacos (Tabla 11).

Tabla 11: Propiedades fisicoquímicas de los fármacos en relación al potencial de inducir un inicio diferido de los síntomas.

Parámetros	PDIF N=11	nPDIF N=33	<i>p-value</i>
Fisicoquímicos			
Peso molecular, media g / mol	412	328	0.0633
Número de anillos totales, media	3.3	2.3	0.0343
Número de anillos aromáticos, media ± desviación estándar	0.9	1.0	0.9199
Heterorings, media	2.1	1.2	0.0104
Longitud de la cadena, media	3.2	6.1	0.0876
Longitud de la cadena alifática, media	0.6	2.4	0.0738
Alta electronegatividad de Pauling, n (%)	3 (21)	6 (17)	0.6963
Farmacocinéticos			
Vida media, mediana h	3.2 (1.2-12)	5.2 (2.9-16)	0.7692
Lipofilia (LogP), mediana	1.8 (0.1-2.9)	2.5 (0.1-3.8)	0.3747
Proporción de unión a proteínas, mediana	80 (40-97)	90 (35-97)	0.7702
Metabolismo hepático ≥ 50%, n (%)	5 (45)	27 (81)	0.0190
≥ 50% del fármaco excretado sin metabolizar, n (%)	5 (50)	2 (6)	0.0015
Circulación Enterohepática, n (%)	4 (36)	11 (37)	0.9858
Formación de metabolitos reactivos, n (%)	5 (45)	19 (59)	0.4226
Riesgo de daño mitocondrial, n (%)	5 (45)	20 (62)	0.5422
BDDCS, n (%)			
Clase 1 (↑ solub y ↑ hep met)	-	14 (42)	
Clase 2 (↓ solub y ↑ hep met)	2 (20)	14 (42)	0.0001
Clase 3 (↑ solub y ↓ hep met)	6 (60)	2 (6)	
Clase 4 (↓ solub y ↓ hep met)	2 (20)	3 (9)	
Farmacodinámicos			
Inhibidor de BSEP, n (%)	3 (27)	17 (51)	0.1620

Se incluyeron en el análisis 42 fármacos (44 agentes activos). Abreviatura: BDDCS, Sistema de clasificación fármacos biofarmacéuticos; Solub, solubilidad; Hep met, metabolismo hepático; ↑, alto; ↓, baja. Todos los valores se han calculado en función del número de fármacos con información disponible.

3.2.4 COMEDICACIÓN Y SU INFLUENCIA EN EL TIPO DE DAÑO

El consumo de medicación concomitante no presentó diferencias significativas entre los casos IDF y los casos no IDF. En esta misma línea, ningún grupo de fármacos concomitantes mostró una predominancia significativa. Aunque la medicación para el tratamiento de enfermedades infecciosas mostro un ligero incremento en los casos IDF, aunque el mismo no fue significativo (Tabla 12).

Tabla 12: Comedicación recibida en 204 pacientes que consumieron fármacos PDIF y 209 pacientes que consumieron fármacos nPDIF.

Clase farmacológicas para la comedicación	PDIF		nPDIF	p
	Inicio diferido (95)	No Inicio diferido (109)	No Inicio diferido (209)	
H2-receptor antagonists	1 (1)	4 (5)	3 (2)	0.2917
Antithrombotic agents	3 (4)	3 (4)	6 (4)	0.9831
ACE inhibitors + angiotensin II antagonists	7 (10)	6 (8)	16 (10)	0.7788
Statins	4 (6)	4 (5)	12 (8)	0.6951
Fibrates	-	-	1 (1)	0.6175
Female sex hormones	0	1 (1)	2 (1)	0.6383
Antithyroid preparations	-	-	-	-
Anti-infectives				
Penicillins-cephalosporins	3 (4)	2 (3)	3 (2)	0.5857
Fluoroquinolones	1 (1)	-	2 (1)	0.5815
Macrolides	3 (4)	1 (1)	2 (1)	0.2780
Antineoplastic agents	-	-	3 (1)	0.2332
Antiandrogens	-	-	1 (1)	0.6175
Non-steroidal anti- inflammatory drugs (NSAIDs)	3 (4)	8 (10)	12 (8)	0.4144
Immunosuppressants	-	-	1 (1)	0.6175
Antiepileptics	1 (1)	2 (2)	2 (1)	0.7746
Herbal products	2 (3)	1 (1)	5 (3)	0.6649

3.2.5 ANÁLISIS MULTIVARIANTE (REGRESIÓN LOGÍSTICA)

Usando similar metodología a la empleada en el estudio del tipo de daño, en esta parte se realizó una regresión logística para identificar los factores predictores IDF. Las propiedades farmacológicas y los factores del huésped que mostraron asociaciones significativas con el IDF fueron: el número de anillos totales, los heteroanillos, el metabolismo hepático, la excreción de fármacos sin metabolizar $\geq 50\%$, la clasificación BDDCS, la dosis diaria, la ictericia, la eosinofilia, las enfermedades asociadas, el patrón de lesión hepática y la gravedad. Se realizó un modelo de regresión logística múltiple incluyendo todos los elementos significativos de los estudios univariados con el objetivo de su efecto predictor. Utilizando un método por hacia atrás, se encontró que tres variables aumentaban la probabilidad de IDF: ausencia de enfermedades asociadas (OR 1,91 [95% IC: 1,08-3,39], $p = 0,0245$), dosis diaria de fármaco culpable ≥ 200 mg (OR 2,89 [IC del 95%: 1,25-7,58], $p = 0,0123$) y metabolismo hepático $< 50\%$ (OR 23,98 [IC del 95%: 10,84-63,68], $p = 0,0001$) (Tabla 13). El R^2 calculado para este modelo fue 0,3034 y el área bajo la curva ROC 0,8459 (Figura 16). El procedimiento “bootstrap” de validación interna mostró un sobreestimación del modelo mínima (0,0057).

Tabla 13. Modelo predictor de la aparición de inicio diferido de la sintomatología basado en las propiedades del fármaco y factores del paciente.

Predictores	OR	Probabilidad	95% CI
Metabolismo hepático < 50%	23.98	0.0001	10.84-63.68
Dosis diaria ≥ 200 mg	2.89	0.0123	1.25-7.58
Ausencia de enfermedades subyacentes	1.91	0.0245	1.08-3.39

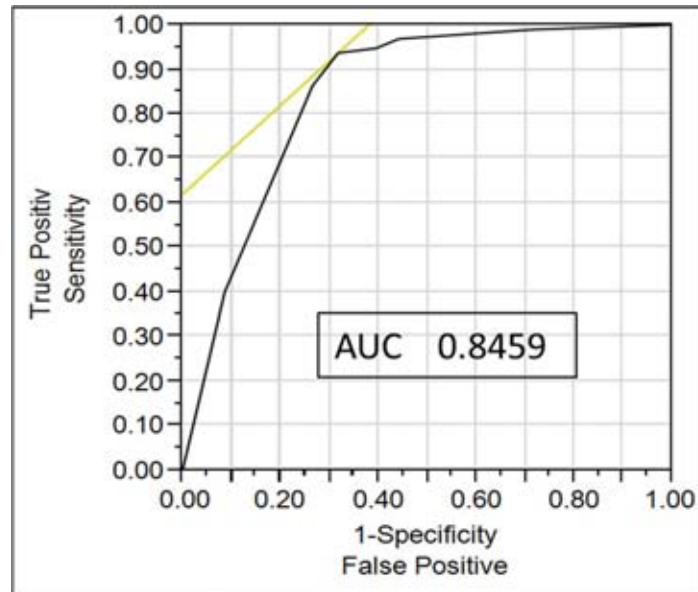


Figura 23. Curva ROC para el modelo de regresión en el que se han incluido tres predictores independientes (ausencia de enfermedades asociadas, dosis diaria ≥ 200 mg, metabolismo hepático $\geq 50\%$).

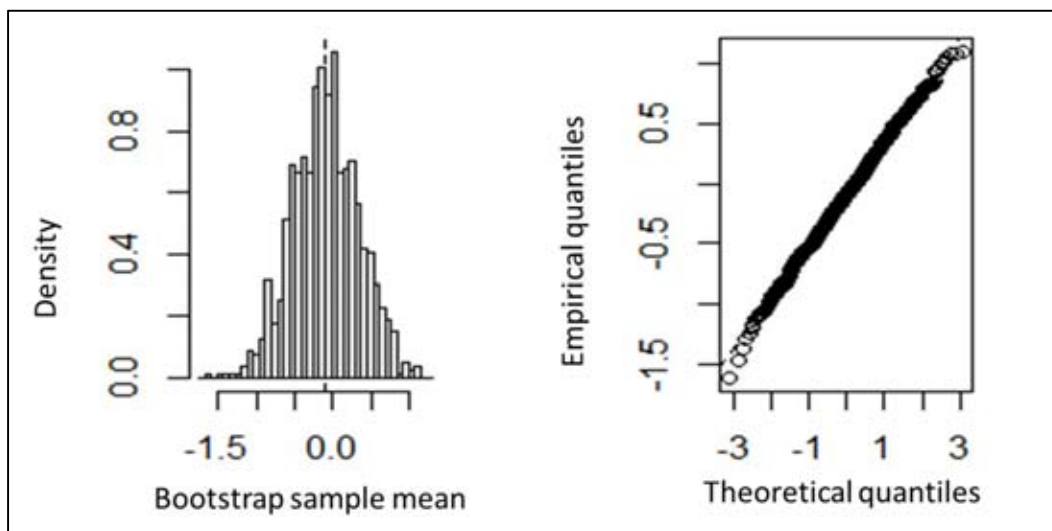


Figura 24. Histograma de 1000 observaciones realizadas mediante bootstrapping. Se observa una distribución normal (derecha). Si las observaciones son consistentes con una distribución normal, siguen una línea diagonal recta. Si las observaciones son inconsistentes con una distribución normal, entonces se desviarán sistemáticamente de la línea diagonal recta.

INTERACCIONES CARACTERISTICAS DEL PACIENTE - PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Posteriormente, se exploraron posibles interacciones fármaco-huésped en el inicio diferido de DILI. En el primer análisis exploratorio (selección de posibles interacciones entre el huésped y el fármaco), 50 de los 2684 pares de fármacos-huésped analizados, fueron identificados como estadísticamente significativos. En el posterior análisis de caracterización, se confirmó que cuatro pares tenían interacciones significativas en el inicio tardío.

Se identificaron tres factores del huésped, la edad (corte de 60 años), el género y las enfermedades cardíacas preexistentes, como modificadores de efectos significativos para los fármacos con responsabilidad mitocondrial. Las enfermedades cardíacas preexistentes también se identificaron como un modificador de efecto significativo para fármacos con alta electronegatividad de Pauling (Tabla 14)

Tabla 14. Modelo predictor de la aparición de inicio diferido de la sintomatología basado en propiedades farmacológicas y factores del paciente.

Edad	Potencial daño mitocondrial		OR*	95% CI	p-value
	Positivo	Negativo			
Edad ≥60 años	48/185 (25%)	7/35 (20%)	0.713	0.27-1.66	0.4562
Edad <60 años	38/142 (27%)	1/35 (3%)	0.080	0.01-0.39	0.0004
Sexo	Potencial daño mitocondrial		OR*	95% CI	p-value
	Positivo	Negativo			
Hombre	43/169 (25%)	7/33 (21%)	0.788	0.29-1.86	0.6014
Mujer	43/158 (27%)	1/37 (3%)	0.074	0.01-0.36	0.0002
Comorbilidades cardíacas	Potencial daño mitocondrial		OR*	95% CI	p-value
	Positivo	Negativo			
Presencia	3/37 (8%)	3/8 (37%)	6.800	1.03-47.39	0.0266
Ausencia	83/290 (29%)	5/62 (8%)	0.219	0.07-0.52	0.0002
Comorbilidades cardíacas	Pauling electronegatividad		OR*	95% CI	p-value
	Alta	Baja			
Presencia	2/4 (50%)	4/43 (9%)	0.102	0.01-0.94	0.0531
Ausencia	5/51 (10%)	84/321 (26%)	3.260	1.25-8.48	0.0058

Los datos de las dos primeras columnas muestran el número de casos con inicio tardío sobre el número de casos que satisfacen dos condiciones, factor del huésped y propiedad del fármaco (% de casos con inicio tardío).* Los valores OR se calcularon utilizando la primera columna como grupo de control

3.3 ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES EN LA GRAVEDAD DE LAS REACCIONES HEPÁTICAS INDUCIDAS POR FÁRMACOS.

De los 701 casos participantes en el estudio, fueron categorizados en función de su gravedad 671 casos, los restantes treinta casos fueron excluidos del estudio. Los casos fueron categorizados en función de su gravedad siguiendo los criterios establecidos por Aithal (Aithal, Watkins et al. 2011). De estos casos 250 fueron leves, 348 moderados, 47 casos severos y 26 casos fatales/trasplantados. En una primera aproximación se observó una muy fuerte relación entre el tipo de daño y la gravedad de la lesión. Se observó que la categorías leve estaba compuesta mayoritariamente por casos con daño hepatocelular, mientras la categoría moderada estaba constituida en su mayor parte por casos colestásicos. Este efecto vendría asociado a la presencia caso, ya que la mayoría de casos colestásicos cursan con elevaciones de BT pero esta elevación no es tan habitual en los casos hepatocelulares. Esta tendencia a agruparse preferentemente en uno u otro tipo de daño, suponía un hándicap para el estudio, ya que cualquier observación estaría más vinculada al tipo de daño que a un verdadero riesgo para el paciente. Debido a ello, en este estudio se utilizó una modificación de esta clasificación, en la que se unificaron las categorías leves y moderadas en la variante baja gravedad (BG) y los casos severos y fatales se aglutinaron en la categoría de alta gravedad (AG).

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

Al igual que los análisis anteriores se buscaron las diferencias entre las propiedades demográficas, clínicas y farmacológicas. La media de edad en ambos grupo fue similar siendo de 55 en los casos de baja gravedad y 56 en los casos de alta gravedad. Además se observó una ligera variación a que los casos más graves se asociaran con el sexo femenino, siendo la presencia de mujeres el 60% en los casos de alta gravedad y 50% en los casos de baja gravedad. Ambos grupos presentaron similares valores de índice de masa corporal. (Tabla 15)

Tabla 15. Características demográficas de los pacientes DILI en función de la gravedad del daño

Características demográficas	BG n=598	AG n=73	<i>p</i>
Edad, media (rango)	55 (11-88)	56 (14-90)	0,6271
Mujeres, n (%)	300 (50%)	44 (60%)	0,1029
IMC kg/m ²	25 (17-41)	25 (19-36)	0,7936

El porcentaje mostrado es calculado en función de la información disponible de los casos. Abreviaciones: BG, baja gravedad; AG, Alta gravedad; IMC, índice de masa corporal.

Al analizar los parámetros clínicos de ambos grupos no se observaron diferencias en el tiempo de tratamiento o en el tiempo de aparición de los síntomas. El parámetro clínico más habitual presentado en los casos de AG fue la ictericia (63%vs 100%, $p<0,0001$). Por otro lado, los pacientes en la categoría de AG tenían una mayor prevalencia de antecedentes alérgicos (8% vs 15%, $p=0,0884$). En esta misma línea se observó que los autoanticuerpos positivos estaban más presentes en los casos de alta gravedad (23%BG vs 34%AG, $p=0,0670$). Ninguna de las características de hipersensibilidad (rash, eosinofilia) dio diferencias significativas entre las poblaciones (Tabla 16).

Tabla 16. Presentación clínica de los casos DILI en función de su gravedad.

Información clínica	BG n=598	AG n=73	<i>p</i>
Duración de la terapia, mediana d (rango)	27 (1-2313)	32 (1-445)	0,9780
Tiempo de aparición, mediana d (rango)	25 (1-2313)	30 (1-557)	0,9315
Dosis diaria mediana, mg (rango)	375 (0.04-6000)	250 (1-3000)	0,3663
Ictericia, n (%)	376 (63%)	73 (100%)	0,0001
Rash, n (%)	38 (6)	6 (8)	0,5435
Eosinofilia, n (%)	138 (23)	11 (15)	0,1201
Linfopenia, n (%)	109 (21)	17 (31)	0,0947
Autoanticuerpos +, n (%)	110 (23)	18 (34)	0,0670
Antinuclear (ANA)	77 (16)	9 (17)	0,8752
Anti-muscular liso (AMLA)	41 (9)	7 (14)	0,2480
Anti-mitocondriales (AMA)	9 (2)	2 (4)	0,3475
Historial de alergias, n (%)	53 (8)	11 (15)	0,0884

El porcentaje mostrado es calculado en función de la información disponible de los casos. Abreviaciones: BG, baja gravedad; AG, alta gravedad.

El inicio del episodio se manifestó de forma heterogénea dentro de cada categoría de gravedad. Sin embargo, tres grupos de síntomas presentaron diferencia entre los grupos de gravedad. Los pacientes que desarrollaron AG mostraron una mayor incidencia de trastornos de la bilirrubina. Observándose estas diferencias en dos parámetros, por un lado como se vio en el apartado anterior los pacientes del grupo AG presentaban siempre ictericia. En esta misma línea la mayoría de los pacientes de AG presentaban coluria en el episodio (53% vs 35%, $p=0,0324$). El segundo de síntomas con mayor incidencia en los casos AG fueron los trastornos hematológicos durante el episodio índice (62% vs 50%), siendo los trastornos más habituales la leucopenia (23% vs 13%), la linfocitosis (25% vs 10%) y la plaquetopenia (14% vs 4%) con una significación de ($p=0,0736$, $0,0072$, $0,0046$, respectivamente). El tercer grupo de síntomas que presento diferencias significativas entre los grupos fueron los trastornos epiteliales, mostrando los casos AG una menor incidencia de alteraciones cutáneas (16% vs 25%, $p=0,1510$), principalmente relacionado con una menor incidencia de prurito (25 BG vs 14% AG, $p=0,0881$). (Fig. 26-28).

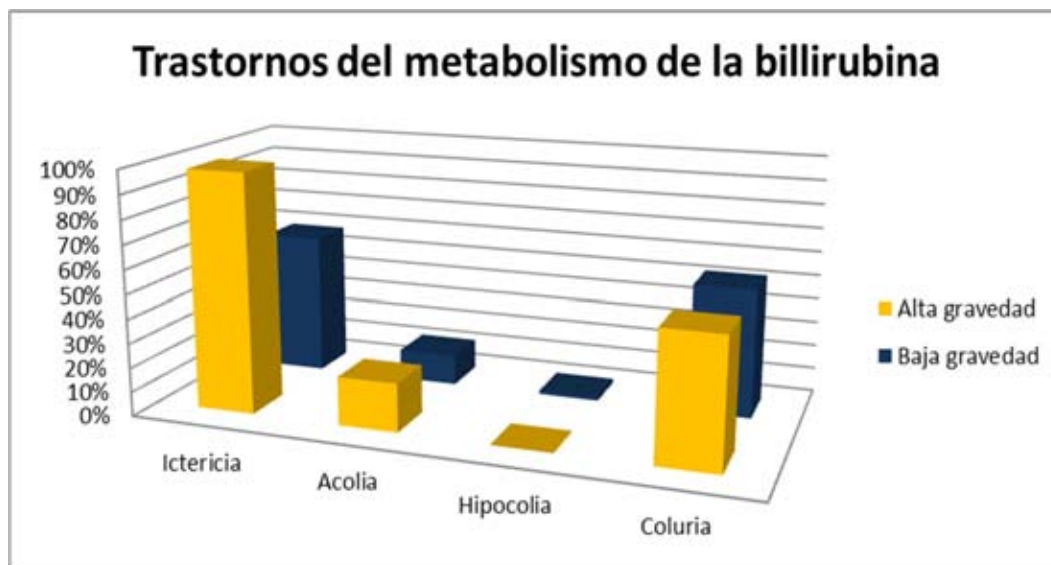


Figura 25. Distribución de los trastornos del metabolismo de la bilirrubina entre los casos de baja y alta gravedad

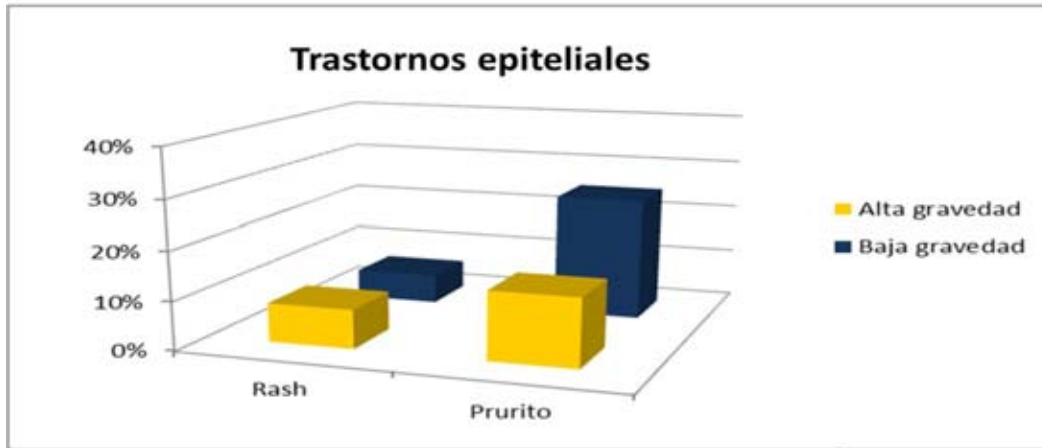


Figura 26. Distribución de los trastornos epiteliales entre los casos de baja y alta gravedad

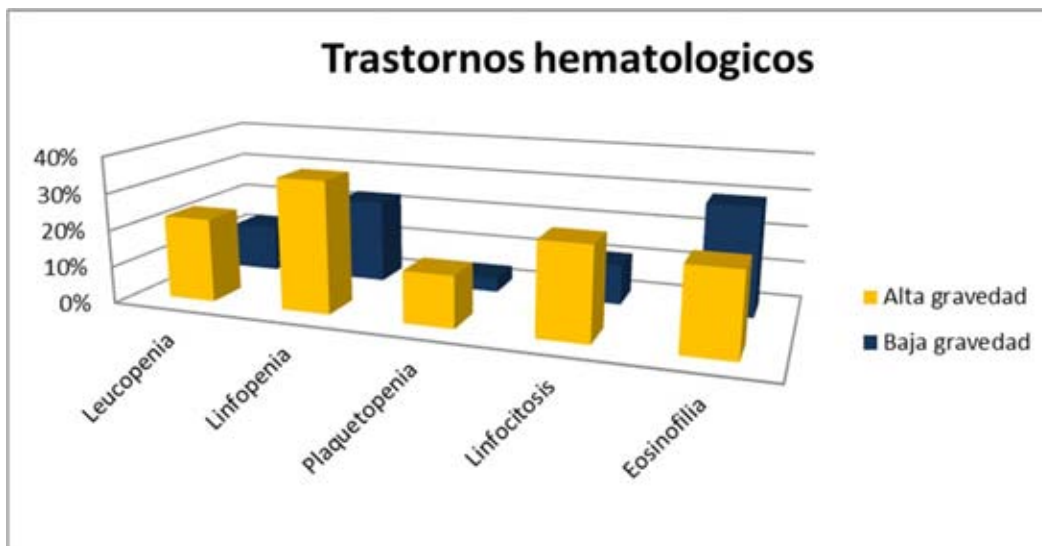


Figura 27. Distribución de los trastornos hematológicos entre los casos de baja y alta gravedad.

COMORBILIDADES Y SU RELACIÓN CON LA GRAVEDAD DE LA LESION

Los casos que desarrollaron AG presentaban una amplia gama de enfermedades subyacentes, no obstante dos categorías de comorbilidades mostraron diferencia en función del grupo de gravedad. Los casos con AG tenían una mayor incidencia de enfermedades infecciosas (8% vs 2%, $p=0.0011$) y una menor incidencia de enfermedades metabólicas (10%BG vs 24%AG, $p=0,0128$). En esta misma línea, las enfermedades autoinmunes eran menos frecuente en los casos de AG (1.6% vs 8%, $p=0.0604$), aunque no fue estadísticamente significativo.

PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LOS FÁRMACOS ASOCIADOS A LA DIFERENTE GRAVEDAD

La mayoría de las propiedades farmacológicas, del fármaco inductor del episodio, no presentaron diferencias. Aunque algunas propiedades tanto físicoquímicas como farmacocinéticas si mostraron una diferencia significativa.

Propiedades físicoquímicas

El grupo de AG presentaba electronegatividad alta (24% vs 12%, $p=0,0061$) según la definición, este grupo presentaba menor frecuencia de anillos con heteroátomos (1 vs 2, $p=0,0015$), así como un menor número de anillos no aromáticos (2 vs 3, $p=0,0011$). (Tabla 17)

Tabla 17. Propiedades físicoquímicas de los fármacos en función de la gravedad.

Parámetros físicoquímicos	BG n=598	AG n=73	<i>p</i>
Masa molecular, mediana g/mol	365	322	0.0996
Numero de anillos, media	3	2	0.0011
Numero de anillos aromáticos, media	1	1	0.8791
Índice anillos arom/totales, media	0.3	0.3	0.1988
Anillos con heteroátomos, media	2	1	0.0015
Anillos fusionados, media	1	0	0.1065
Presencia de átomos de azufre, n (%)	265 (48)	30 (51)	0.7066
Presencia de átomos halógenos, n (%)	166 (30)	23 (39)	0.1678
Electronegatividad atómica alta (Escala Pauling), media	62 (12)	14 (24)	0.0061
Índice de distancia topológica molecular, media (rango)	6572 (138-65429)	4846 (90-22763)	0.0545
Polaridad molecular, media	0.67	0.67	0.9626
Volumen McGowan, media (rango)	2.53	2.30	0.0655
Energía libre (Escala Platts), media	2.5	2.2	0.0681
Superficie topológica polar, media (rango)	96.31	72.88	0.0767
Tasa de hibridación de orbitales, media	0.40	0.41	0.3426
Longitud media de cadena, media de numero de átomos	5	5	0.0760
Longitud media de cadena alifática, media de numero de átomos	2	2	0.0909
Lipoafinidad, media	3.41	3.73	0.6022

Los porcentajes han sido calculados en función del número de casos con información en cada parámetro. Abreviaciones: BG, baja gravedad; AG, alta gravedad.

Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas

Los casos del grupo AG mostraron un mayor incidencia de metabolismo hepático significativo (74% vs 61%, $p=0,0298$), así como una mayor frecuencia de circulación enterohepática y una tasa menor de excreción en forma no metabolizada. Esto parece indicar que los casos de alta gravedad se vinculan con fármacos que necesitan ser metabolizados y que poseen un mayor tiempo de exposición. Sin embargo, esta observación podría estar vinculada a la alta frecuencia de casos hepatocelulares (Tabla 18). Como se vio en el primer apartado de este estudio, los fármacos que inducen casos hepatocelulares presentan estas propiedades.

Tabla 18. Propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los fármacos en función de la gravedad.

Propiedades farmacológicas	BG n=598	AG n=73	<i>p</i>
Farmacocinéticas			
Vida media de eliminación, mediana h	3.2	5.2	0.3598
Lipofilia (LogP), mediana (rango)	1.2 ((-6.8)-8.3)	1.3 ((-2.1)-8.3)	0.4492
Tasa de unión a proteínas, mediana	65	90	0.4035
Metabolismo hepático \geq 50%, n (%)	345 (61)	52 (74)	0.0298
Excreción con baja tasa de metabolización, n (%)	191 (34)	13 (19)	0.0128
Circulación enterohepática, n (%)	130 (24)	23 (36)	0.0417
Formación de metabolitos reactivos, n (%)	376 (68)	49 (74)	0.3101
Riesgo de daño mitocondrial, n (%)	420 (76)	55 (83)	0.2112
Clasificación sistema BDDC			
• 1	189 (33)	26 (38)	
• 2	158 (28)	25 (36)	0.0754
• 3	192 (34)	13 (19)	
• 4	27 (5)	5 (7)	
Farmacodinámicas			
BSEP IC ₅₀ , mediana, μ M	608	608	0.4407
Inhibidor de BSEP, n (%)	226 (41)	19 (32)	0.1787

El porcentaje mostrado es calculado en función de la información disponible de los casos. Abreviaciones: BG, baja gravedad; AG, alta gravedad; μ M, micromolar.

COMEDICACIÓN EN LA GRAVEDAD DEL DAÑO.

La frecuencia de consumo, así como el número de fármacos concomitantes fue similar en ambos grupos de gravedad. Sin embargo, el tipo de comedición si mostró diferencias significativas. Los casos AG mostraron una mayor frecuencia de consumo de fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas (15% vs 7% AG, $p=0,0278$), posiblemente asociado al incremento de enfermedades infecciosas, visto en el apartado de comorbilidades. Aunque el valor de los porcentajes es mayor en este apartado, probablemente asociado a que algunas comorbilidades no reciben tratamiento, existiendo un mayor número de comorbilidades.

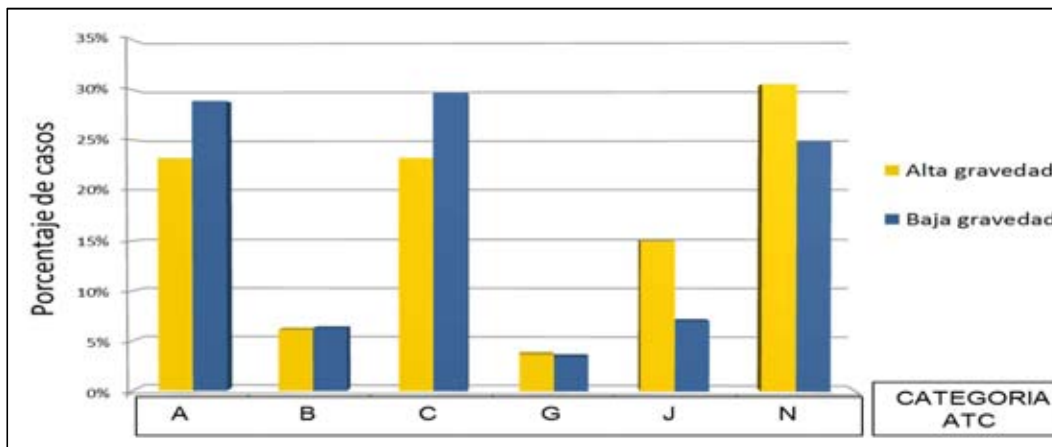


Figura 28. Distribución de la comedición en función del grupo de gravedad.

ANÁLISIS MULTIVARIANTE (REGRESIÓN LOGÍSTICA)

En este apartado se muestran los análisis multivariante de las características del huésped y los factores farmacológicos presentados en los apartados anteriores. Tras realizar los modelos de regresión logística con todas las variables analizadas, solo una variable fue seleccionada como predictor de gravedad del daño hepático tóxico. La comedición utilizada en el tratamiento de enfermedades infecciosas posee un efecto **potenciador** del riesgo de sufrir un episodio AG (OR 2.00, IC: 1.35-3.47, $p=0,008$).

INTERACCIONES CARACTERISTICAS DEL PACIENTE - PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Al analizar las posibles interacciones huésped fármaco que podrían condicionar la gravedad del daño. Ninguna interacción mostró capacidad para modular la gravedad de la reacción.

4. DISCUSION

La hepatotoxicidad ha sido definida como una patología multifactorial por varios grupos (Kaplowitz 2005; Chen, Suzuki et al. 2015). Sin embargo, se desconoce qué factores juegan los principales en dicha patología. Esto es debido a la existencia de un sesgo en los diferentes estudios de DILI, motivado por los enfoques altamente especializados de los grupos de investigación en DILI. Así existen grupos focalizados en estudios de propiedades farmacológicas (Chen, Hong et al. 2013; Chen, Borlak et al. 2016), en estudios epidemiológicos de los pacientes (Andrade, Lucena et al. 2005; Bjornsson, Bergmann et al. 2013; Chalasani, Bonkovsky et al. 2015) y/o en estudios genéticos (Stephens, Lopez-Nevot et al. 2013; Nicoletti, Werk et al. 2016; Petros, Lee et al. 2016). Estos diferentes enfoques presentan diferencias a la hora de evaluar el papel de cada factor en DILI. Además la mayoría de los anteriores estudios se focalizan en el riesgo de desarrollo de DILI mientras que los estudios sobre los moduladores de diferentes aspectos de DILI son limitados. Este estudio integra los diferentes factores de DILI en una aproximación única, esto ha permitido observar que ningún grupo de factores es el más importante en la modulación de DILI, siendo importante diferentes factores para diferentes características de DILI. En relación a lo descrito anteriormente. Se observó que el tipo de daño hepático está condicionado tanto por las características del huésped como por las propiedades del fármaco, jugando un papel primordial el metabolismo hepático. Estos efectos no son completamente independientes, sino que parece existir una vinculación entre algunos de ellos. Podemos encontrar un ejemplo en la interacción de la edad y el metabolismo hepático.

TIPO DE DAÑO HEPÁTICO

Estudios previos realizados por el Spanish DILI registry observaron diferencias en el tipo de daño en función de la edad y el género. (Lucena, Andrade et al. 2009). Los resultados del presente estudio respaldan dichas observaciones. No obstante, también se observa la aparición de nuevas características no descritas previamente. Probablemente la mejor justificación a estas diferencias es debido a la eliminación del grupo mixto, el cual es una combinación del daño hepatocelular y colestásico.

En el actual estudio, el tiempo de tratamiento y el tiempo de inicio de la reacción (latencia) mostraron diferencias significativas entre los grupos observados. Así los tiempos de inicio de la reacción fueron más cortos en los casos colestásicos. Aunque no existe una clara evidencia entre el tiempo de latencia y el tipo de daño, estudios previos han mostrado tiempos de inicio más cortos en casos colestásicos. Un estudio realizado en una población de 12 pacientes pediátricos, mostró que los casos con manifestaciones colestásicos se producían en los primeros 2 meses de tratamiento, mientras que los casos con características hepatocelulares aparecían hasta dos años después de empezar el tratamiento. Sin embargo, en este estudio el fármaco responsable de los casos hepatocelulares de mayor latencia fue minociclina el cual es un fármaco especial relacionado con la toxicidad autoinmune y con una latencia larga, de manera frecuente. (Molleston, Fontana et al. 2011). Otro estudio desarrollado en población DILI, mostró que los casos de AC-DILI poseían un menor tiempo de latencia frente al resto de fármacos con excepción de otros antibióticos, siendo conocido que AC-DILI desarrolla más frecuentemente daño colestásico (deLemos, Ghabril et al. 2016). Por su parte, fármacos típicamente hepatocelulares como troglitazona muestran un periodo de latencia largo de 1 a 6 meses, siendo los casos de menos de un mes inferiores al 20% (Graham, Green et al. 2003).

Las anteriores diferencias podrían ser explicadas por las diferencias en las manifestaciones de DILI. Así los casos colestásicos se manifiestan con la aparición de ictericia y prurito, siendo fácilmente detectables (Tujios and Fontana 2011; Bjornsson and Jonasson 2013). Por el contrario, los casos hepatocelulares suelen aparecer de manera asintomática o con síntomas inespecíficos, lo cual implicaría una detección más tardía del daño, aunque no se puede descartar el hecho de que realmente el daño en los pacientes colestásicos se manifiesta de manera más temprana.

Otra de las observaciones interesantes en este estudio fue la mayor incidencia de eosinofilia y linfopenia en los casos colestásicos. Aunque se desconoce si estos factores eran previos a la aparición de la reacción de hepatotoxicidad o fueron elementos implicados en el desarrollo de la reacción.

Este incremento en la eosinofilia alcanza el 30% en la población colestásica sugiriendo una posible relación entre el sistema inmune y el daño colestásico, ya sea como un elemento de predisposición de la reacción o como parte de su desarrollo. Así un estudio previo, señala que los haplotipos HLA-DRB1*15 y HLA-DQB1*06 serían potenciadores de la susceptibilidad en pacientes colestásicos. Mientras que los haplotipos HLA-DRB1*07 and HLA-DQB1*02 jugarían un papel protector. Este cambio de susceptibilidad debida a moléculas de histocompatibilidad II (HLA-II) (Andrade, Lucena et al. 2004), sugiere la participación del sistema inmune. Otro estudio ha señalado que las hepatotoxinas habitualmente relacionadas con daño colestásico son mayoritariamente hepatotoxinas con potencial inmunoalérgico. Mientras que las hepatotoxinas sin potencial inmunoalérgico están principalmente asociadas con daño hepatocelular (Kaplowitz 2005).

Relacionado con el sistema inmunológico, los antecedentes de reacciones alérgicas a fármacos mostraron diferencias entre los grupos. La mayor frecuencia correspondía a los casos hepatocelulares. DILI es una entidad no relacionada con las alergias medicamentosas. Sin embargo, muchos estudios apuntan a la participación del sistema inmune en el desarrollo de DILI, con lo cual se desconoce si podría existir alguna relación a través del sistema inmune. La razón por la que los casos hepatocelulares presentan más los antecedentes de reacciones alérgicas a fármacos, es desconocida, esta podría deberse a que la estimulación previa del sistema inmune por otros fármacos, desarrollaría una sensibilización en el organismo, especialmente en el hígado, al ser el órgano más expuesto a los fármacos. Esta sensibilización produciría una respuesta más toxica, favoreciendo el daño hepatocelular. Sin embargo, estudios previos han mostrado que DILI por el mismo producto mantiene el perfil de daño en ambos episodios, aunque se incrementa la velocidad de aparición (Papay, Clines et al. 2009; Lucena, Kaplowitz et al. 2011), con lo cual no parece que una reacción inmune previa favorezca el daño hepatocelular. Otra posibilidad sería que los antecedentes alérgicos no fueran un factor influyente en la selección del tipo de daño, siendo su selección en nuestro estudio una coincidencia estadística, debido a su bajo tamaño poblacional.

Dentro de las características del paciente, la presencia de autoanticuerpos posiblemente sea uno de los valores con mayores dificultades en su valoración. Eso es debido a que el aumento de los títulos de anticuerpos puede ocurrir meses después de la aparición de DILI. Además, los autoanticuerpos Debido a que el aumento de los títulos de anticuerpos puede ocurrir meses después de la reacción y que estos autoanticuerpos no son específicos de DILI, pudiendo aparecer en otras patologías autoinmunes hepáticas siendo en muchos casos difícil esclarecer su origen (Suzuki, Brunt et al. 2011; Himoto and Nishioka 2013; Castiella, Zapata et al. 2014). Además, la búsqueda de autoanticuerpos no forma parte del panel de pruebas bioquímicas de rutina, por ello en muchos casos no existe información previa al episodio de la existencia o no de los mismos.

A pesar de estas dificultades para establecer una relación de causa-efecto entre DILI y la autoinmunidad, el actual trabajo parece señalar que existe algún tipo de relación entre la presencia de autoanticuerpos y la lesión hepatocelular, existiendo varios estudios que sugieren esta relación (David and Hamilton 2010; deLemos, Foureau et al. 2014; Lu, Zhang et al. 2016). El origen de esta relación es incierto, aunque parece existir cierta similitud entre los factores de riesgo de algunas enfermedades autoinmunes y el daño hepatocelular, por ejemplo AIH se presenta preferentemente en mujeres al igual que el tipo de daño hepatocelular (Castiella, Zapata et al. 2014)(Lucena, Andrade et al. 2009). Existe una hipótesis en el estudio de DILI denominada “hipótesis del hapteno”, que justifica la presencia de autoanticuerpos, como por ejemplo ANA, debido a la estimulación del sistema inmune. Esta estimulación se debería a un antígeno formado por la unión de metabolitos reactivos con proteínas del hepatocito, lo cual implicaría una interacción directa entre el fármaco y el hepatocito. (Liu and Kaplowitz 2002; Gershwin, Vierling et al. 2008; Shaw, Ganey et al. 2010). Esto provocaría que solo los fármacos con potencial para interactuar de manera directa con el hepatocito produjeran autoanticuerpos, siendo estos fármacos principalmente inductores de daño hepatocelular.

La última característica del paciente destacada en el actual estudio, mostró la existencia de una relación entre las comorbilidades previas del paciente y el tipo de daño, estando asociadas las patologías cardíacas y/o vasculares con la aparición de daño colestásico. Es conocido que las enfermedades hepáticas y cardíacas están relacionadas. Así en los pacientes con cirrosis aparecen alteraciones cardíacas secundarias. En relación a lo observado en dicho estudio, se sabe que una alteración cardíaca reduce la perfusión arterial y también produce una congestión pasiva secundaria en el hígado, por incremento de la resistencia venosa (Moller and Bernardi 2013; Fouad and Yehia 2014). Las congestiones hepáticas como consecuencia de enfermedades cardíacas se manifiestan de manera aguda o crónica, la congestión hepática aguda se ha relacionado con la inducción directa con una colestasis en 1,2% de los pacientes. Por su parte la congestión crónica muestra hiperbilirrubinemia en el 20% de los pacientes (Levy 2013). Sin embargo, otros estudios relacionan la isquemia extensa derivada de un fallo cardíaco, con un cuadro similar al daño hepatocelular. Este cuadro se manifiesta con importantes elevaciones de ALT y AST, hasta 20 veces la normalidad, que retornan a la normalidad en poco tiempo (Seeto, Fenn et al. 2000).

Por otro lado, esta mayor frecuencia de enfermedades cardiovasculares en el daño colestásico podría deberse a un efecto de la comedición consumida para el tratamiento de estas comorbilidades. El grupo de fármaco para el tratamiento de estas patologías más estudiado en hepatotoxicidad son las estatinas, algunas de las cuales se vinculan con una mayor expresión de casos colestásicos como la atorvastatina o fluvastatina (Perdices, Medina-Caliz et al. 2014). Sin embargo estos fármacos presentan un tiempo de latencia de entre 3 y 4 meses, lo cual es superior a lo observado en el presente estudio (Bjornsson, Jacobsen et al. 2012). Por otro lado, se desconoce el comportamiento, con respecto a DILI, de estos fármacos cuando juegan el papel de comedición.

Las propiedades farmacológicas mostraban una mayor índice de anillos aromáticos y por lo tanto una mayor tasa de hibridación de orbitales de orbitales en los casos hepatocelulares. Existen diferentes hipótesis del papel de

estos anillos en la toxicidad hepatocelular. Algunos estudios sugieren que una. Existen diferentes hipótesis del papel de estos anillos en la toxicidad hepatocelular. Algunos estudios sugieren que una asociación con variantes génicas podría incrementar su riesgo hepatocelular, así han mostrado que determinados polimorfismos genéticos como el alelo C en *ABCB11 1331T>C* posee un riesgo de daño hepatocelular incrementado cuando se asocia a fármacos con anillos aromáticos (Ulzurrun, Stephens et al. 2013). También se ha sugerido que estas estructuras están más vinculadas a la producción de metabolitos reactivos debido a la generación de intermediario epóxidos (Stepan, Walker et al. 2011; Hughes, Miller et al. 2015).

Los casos hepatocelulares se asociaban mayoritariamente con el consumos de fármacos con mayor cantidad de anillos aromáticos y de un ratio de hibridación mayor. Existen diferentes hipótesis sobre el rol de estos anillos aromáticos en la toxicidad de tipo hepatocelular. Por ejemplo, se ha observado que el alelo C en el polimorfismo *ABCB111331T>C* incrementa el riesgo de daño hepatocelular en pacientes que toman fármacos con anillos aromáticos. (Ulzurrun, Stephens et al. 2013). Los compuestos aromáticos pueden ser oxidados, a diferentes metabolitos reactivos, debido a la acción del metabolismo hepático, entre los que se encuentran epóxidos, quininas, y quinonas (Ortiz de Montellano and Nelson 2011; Gu and Manautou 2012).

Estos metabolitos reactivos necesitan ser neutralizados por las enzimas detoxificadores para prevenir la inducción del daño. Estas funciones son llevadas a cabo por enzimas específicas como el epóxido hidrolasa o el GST.(Carlson 2011). Sin embargo, el proceso de neutralización de estos compuestos requiere el consumo de energía ATP, ya sea de manera directa o indirecta, en el caso del glutatión se consume ATP para restaurar el glutatión a su forma reducida, la cual es importante para su función. Cuando debido a este y otros procesos no es posible mantener el balance redox de la célula, se produce una alteración que induciría el estrés oxidativo y o el daño mitocondrial. Estos proceso desembocarían en la activación de las vías de transducción encargadas de modular los fenómenos de muerte celular. (Han, Shinohara et al. 2010). Adicionalmente a estos resultados, se ha comprobado

que en los hepatocitos *in vitro* expuestos a fármacos inductores de DILI, se produce un incremento del ratio ROS/ATP, siendo este incremento mayor en los fármacos que inducen daño hepatocelular que en aquellas que inducen daño colestásico (Zhang, Doshi et al. 2016).

Durante su metabolismo estas estructuras pueden suponer un mayor gasto energético debido a su alta energía de estabilización, lo que podría contribuir a una disminución de los niveles de ATP celular (Vanhove, Guillaume et al. 1997). Se ha propuesto que la depleción de los niveles de ATP, por diversas causas, podría inactivar proteínas celulares dependientes de ATP y generar daño. Una de estas maquinarias podría ser bomba de calcio en la membrana plasmática (PMCA), la cual depende del ATP para expulsar el exceso de calcio en la célula (Begrache, Massart et al. 2011). Aunque sería necesaria una reducción muy importante de los niveles de ATP, la cual no podría deberse únicamente al fármaco y probablemente necesitaría la presencia de otros factores, como variantes genéticos. Otro estudio, también señala la reducción de ATP como uno de los caminos para la generación del daño hepático, relacionándolo con la mayor aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS). Así se observa un incremento del índice ROS/ATP en los hepatocitos sometidos a fármacos inductores de DILI, siendo mayor este incremento en los fármacos asociados a daño hepatocelular (Zhang, Doshi et al. 2016).

El presente estudio mostró que la presencia de átomos de azufre podría favorecer el daño colestásico, mientras que las moléculas halógenas (especialmente nitrógeno y cloro) favorecerían la aparición del daño hepatocelular. No está claro el papel de estos elementos en la toxicidad aunque ambas moléculas poseen una alta potencial oxidante.

En la bibliografía ambos grupos de átomos han sido relacionados con la creación de intermediarios reactivos cuando son metabolizados, así se ha observado que al ser oxidado, el tiofeno genera una estructura reactiva el tiofeno s-oxido que puede interaccionar con grupos tiol o proteínas (Macherey and Dansette 2008).

El mismo efecto se ha observado con los átomos halógenos, los cuales dan lugar a metabolitos reactivos entre los que se encuentra el ion nitrenium (Weber, Boll et al. 2003; Falvey 2005). Una posible explicación es que los átomos de sulfuro se encuentran principalmente en fármacos antiinfectivos, principalmente sulfonamidas y penicilinas (Feng, Tang et al. 2016). Estos fármacos habitualmente suelen tener una baja tasa de metabolismo, lo cual impediría la creación de metabolitos reactivos.

El grado de polaridad también se presentó de manera diferente en cada tipo de daño. Los resultados apuntan a una mayor apolaridad de los compuestos inductores de daño hepatocelular, así como una lipoafinidad mayor a la observada en los compuestos inductores de daño colestásico. Esto indica que los compuestos inductores de daño hepatocelular poseen una mayor hidrofobicidad. El aumento de la hidrofobicidad facilitaría el paso a través de la membrana celular de manera pasiva, lo que conllevaría un incremento de la concentración intracelular. Por su parte, la menor apolaridad de los compuestos inductores de colestasis, indicaría una menor difusión y la necesidad de usar transportadores para entrar en el hepatocito, lo que limitaría su entrada al hepatocito y disminuiría la exposición de este al fármaco. Como consecuencia de esta menor exposición existirá un menor potencial de daño directo, sugiriendo que el daño directo al hepatocito induciría un tipo de daño hepatocelular. Hasta la fecha la bibliografía acerca de la concentración intracelular del fármaco y el tipo de daño es escasa, la mayoría de los estudios se focalizan en analizar la concentración de los fármacos inhibidores de transportadores celulares, lo cual implicaría una retención de la bilis intracelular (Kock, Ferslew et al. 2014; Park, Kim et al. 2016). También existen estudios que evalúan la concentración de fármacos hepatocelulares en orgánulos celulares (Pfeifer, Harris et al. 2013). Aunque estos estudios no pueden sustentar ni descartar el papel de la apolaridad en el daño hepatocelular.

Las propiedades farmacocinéticas de los fármacos estudiados mostraron diferencias significativas en función del tipo de daño. Uno de los parámetros con mayor relevancia en nuestro estudio es la tasa de metabolismo hepático. Altas tasas de metabolismo se relacionarían con una mayor frecuencia de daño hepatocelular. En estudios previos se ha observado que fármacos con metabolismo hepático >50% se relaciona con una mayor frecuencia de elevación de las transaminasas pero no con cambios en la presentación de ictericia (Lammert, Bjornsson et al. 2010). Sin embargo, un estudio reciente de 2014 no han observado este efecto en el tipo de daño en función de la tasa de metabolismo hepático, mostrando similares proporciones de tipo de daño entre los fármacos con alto y bajo metabolismo hepático (Vuppalanchi, Gotur et al.). Probablemente las diferencias con este estudio sean debidas a la alta frecuencia de nitrofurantoina en su estudio, así se observa que mientras en el presente estudio los fármacos de la categoría 4 BDDCS son una minoría (<5%), no obstante en dicho estudio alcanza el 11% justificado por la presencia de un numeroso grupo de casos por nitrofurantoina. El cual se ha visto posee el potencial de inducir hepatitis autoinmune, siendo probablemente diferentes las vías de desarrollo de este daño con autoinmunidad.

Los fármacos hepatocelulares mostraron una mayor tasa de circulación enterohepática y tasa de unión a proteínas plasmáticas como consecuencia de una mayor lipofilicidad. Esto sugiere un mayor tiempo de exposición del hígado al fármaco. Aunque no existen estudios de la lipofilicidad y el tipo de daño, existen estudios que señalan a la lipofilicidad junto a las altas dosis como un mecanismo de riesgo en DILI, así se ha visto que fármacos suministrados a dosis superiores a los 100mg y con un $\text{LogP} \geq 3$ poseen mayor riesgo de hepatotoxicidad (Chen, Borlak et al. 2013). Por otro lado hay que destacar que un pequeño grupo de fármacos colestásico posee estas mismas, las hormonas sexuales, las cuales son inductoras de colestasis pura (Velayudham and Farrell 2003). Sin embargo este tipo de colestasis no parece ser la mayoritaria dándose solo en este grupo de fármacos por lo que podría ser considerada un tipo especial de daño colestásico.

En resumen los resultados presentados sugieren que los fármacos que inducen daño hepatocelular, presentan una naturaleza apolar lo que les permite entrar con mayor facilidad al interior del hepatocito, en el cual son ampliamente metabolizados, produciendo metabolitos reactivos secundarios y una potencial depleción de ATP. Siendo la hipótesis de los metabolitos reactivos la más extendida. Ambos mecanismos el agotamiento de ATP y los metabolitos reactivos podrían funcionar conjuntamente o bien la depleción de ATP podría ser consecuencia de la generación de metabolitos reactivos. Así, la disfunción de otras maquinarias celulares como los mecanismos de expulsión de iones, eliminación de metabolitos, podrían incrementar la producción de metabolitos reactivos, debido al metabolismo incompleto de los fármacos, que podría retroalimentar el daño en el hepatocito. A estos procesos contribuirían las características del huésped. Un posible ejemplo sería la edad. Una mayor edad se relaciona con un empeoramiento en la tasa metabólica (Le Couteur and McLean 1998; Butler and Begg 2008). Esta menor tasa metabólica conllevaría una menor generación de metabolitos y un menor gasto energético. Lo que limitaría el daño hepatocelular en personas mayores y favorecería una mayor frecuencia de daño colestásico.

Por su parte, los fármacos inductores de daño colestásico presentan un perfil polar, con una baja vida media en el organismo y una menor tasa de penetración a través de la membrana lipídica. Esto disminuiría la interacción directa entre el fármaco y el hepatocito. Dificultando la generación de metabolitos reactivos y permitiendo la aparición de otra posible vía de daño hepático. Esta vía probablemente está vinculada a una respuesta pro-inflamatoria que favorecería la aparición de un daño colestásico, el cual produciría una acumulación de sales biliares. Se ha propuesto que en los pacientes colestásicos esta respuesta inmune se auto-propaga retrasando el tiempo de recuperación (Padda, Sanchez et al. 2011). Otros elementos que afectarían la respuesta inmune en el daño colestásico, sería el menor tiempo de latencia. Así como el carecer de mecanismos de exposición prolongada (circulación enterohepática o anidamiento a proteínas plasmáticas) indicando que el grado de exposición del hepatocito sería menor.

INICIO DIFERIDO DEL DE DAÑO HEPÁTICO

El momento inicial del daño hepático es un hecho de difícil diagnóstico, ya que en muchos casos los síntomas son muy inespecíficos, leves o incluso inexistentes. En muchos casos es difícil establecer si el daño apareció previamente y solo los síntomas aparecen tardíamente. Siendo lo anterior uno de los puntos débiles del presente estudio.

Este trabajo tenía como objetivo específico, identificar los factores que afectan la presentación clínica de IDF en DILI, mediante el análisis de las propiedades de los fármacos, los factores del paciente y sus interacciones. Para ello se utilizó una gran cohorte de pacientes DILI españoles. El modelo que incorpora las propiedades del fármaco y los factores del huésped reveló tres factores independientes que influyen en la probabilidad de aparición de IDF: metabolismo hepático (fármaco), dosis diaria (huésped) y enfermedades asociadas (huésped). La combinación de menos del 50% de metabolismo hepático del fármaco, una dosis diaria > 200 mg y la ausencia de enfermedades asociadas parecen jugar un papel en la ocurrencia de IDF en DILI. También se exploraron las interacciones fármaco-huésped, utilizando un enfoque de dos niveles. Se identificaron los factores del huésped que modifican significativamente el efecto de las propiedades específicas del fármaco sobre la probabilidad de aparición de IDF, proporcionando hipótesis para futuras investigaciones, relacionadas con las interacciones entre fármacos y huésped en las manifestaciones clínicas de DILI.

En el presente estudio, los fármacos asociados con la aparición de IDF fueron antibióticos principalmente, estos fármacos presentaban entre un 22% y 80% de casos DILI con IDF. Entre estos compuestos, AC fue el fármaco más importante con potencial de IDF, corroborando hallazgos previamente publicados (Lucena, Andrade et al. 2006; Aithal, Watkins et al. 2011). (Lucena, Andrade et al., 2006; Aithal, Watkins et al., 2011). El hecho de que los antibióticos sean los fármacos más asociados con IDF no es sorprendente, teniendo en cuenta que los antiinfectivos son generalmente prescritos por un corto período de tiempo. Sin embargo, no todos los antiinfectivos producen DO. La isoniazida y la ciprofloxacina, por ejemplo, no produjeron IDF en ninguno de

los casos inscritos en el registro DILI español. Por ello, la manifestación de IDF parece ser desencadenada por las propiedades específicas del fármaco, en pacientes con ciertos atributos que los hace más susceptibles a este fenotipo. Contrariamente a los supuestos anteriores, no encontramos evidencia de que IDF ocurra debido a la retención prolongada del fármaco o sus metabolitos en el cuerpo (Kaplowitz 2004). En contraste, los fármacos PIDF mostraron una tendencia a poseer una vida media más corta que los fármacos nPIDF, además poseían una proporción menor de circulación enterohepática frente a los fármacos nPIDF. En la misma línea, se encontró que los fármacos PIDF tenían un metabolismo hepático significativamente menor y, en consecuencia, una proporción más elevada se excretaba en forma de fármaco sin metabolizar. Los fármacos con PIDF mostraron un mayor número de anillos no aromáticos, así como heteroanillos. Estas propiedades se han relacionado con mayor solubilidad, menor lipofilia y menor unión a proteínas plasmáticas (Ritchie, Macdonald et al. 2011). Las propiedades mostradas previamente de los fármacos PIDF, hablan en favor de una excreción más rápida del fármaco con una interacción mínima con los hepatocitos, lo que contravendría la retención prolongada.

Una dosis diaria elevada se identificó, según el modelo, como un importante factor que influye en la probabilidad de IDF. Así, el 97,5% de los pacientes que desarrollaron IDF habían consumido una dosis diaria de más de 200 mg. Es difícil decir si una dosis de fármaco más alta aumenta el riesgo de IDF o si este efecto es el resultado de la preponderancia de casos IDF inducidos por antibióticos, los cuales generalmente se toman en dosis altas durante un corto período de tiempo. Aunque no se requiere una sobredosis de medicamentos, varios estudios sugieren que el DILI idiosincrático está asociado con un umbral mínimo de dosis de fármaco (Lammert, Einarsson et al. 2008; Lucena, Andrade et al. 2009; Bjornsson, Bergmann et al. 2013). Se supone que se debe superar este umbral para desarrollar estrés celular, el cual sería una señal detonante del inicio del daño celular y el desarrollo de DILI. Sin embargo la dosis exacta de fármaco requerida para alcanzar dicho umbral puede variar entre individuos (Han, Dara et al. 2013). En esta misma línea se ha demostrado en estudios previos que una dosis diaria elevada junto con una elevada lipofilia aumenta el

riesgo de desarrollo de DILI (Chen, Borlak et al. 2013). Esto permite plantear que los fármacos PIDF requieren una dosis diaria más alta, posiblemente debido a su bajo metabolismo y a su excreción rápida, con el fin de alcanzar un umbral de estrés celular e inducir daño de hepatocitos, así como una posterior respuesta inmune.

Otro factor importante que influyó en la probabilidad de IDF fueron las enfermedades asociadas, la ausencia de enfermedades asociadas aumenta la probabilidad de aparición de IDF. El efecto de las enfermedades asociadas en DILI es ampliamente desconocido con estudios limitados a las enfermedades hepáticas o alguna enfermedad específica. Sin embargo, un estudio epidemiológico reciente en DILI encontró que aproximadamente el 74% de los pacientes tenían algún tipo de enfermedades asociadas (Baekdal, Ytting et al. 2016) Nuestra proporción es similar a la presentada en este estudio. La correlación negativa entre las enfermedades asociadas e IDF podría ser una razón para la baja proporción de DILI con IDF en general, debido a la aparición común de condiciones asociadas en los pacientes DILI. El mecanismo por el cual las condiciones asociadas podrían influir en IDF no está claro. Una posible explicación sería que los pacientes sin enfermedades asociadas pueden ejercer mecanismos de adaptación celular contra el estrés celular inducido por fármacos y retrasar la aparición de manifestaciones sintomáticas. La duración más corta del tratamiento observada en los casos de IDF en DILI colaboraría con esta teoría, ya que los efectos toxicológicos del fármaco eventualmente sobrepasarían los mecanismos de defensa celular, dando como resultado una lesión hepática sintomática posterior al cese del fármaco. Las manifestaciones retrasadas de DILI también pueden ocurrir durante tratamientos más largos o incluso crónicos de ciertos fármacos. Sin embargo, en tales casos, las manifestaciones aparecerían durante el tratamiento y, por lo tanto, los casos serían considerados como latencia larga en lugar de IDF. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para refinar y confirmar esta hipótesis.

En este estudio, el impacto de la comedicación no fue investigado en profundidad debido al limitado tamaño de la población con IDF. Sin embargo, los fármacos concomitantes podrían afectar a los mecanismos implicados en la

respuesta del huésped a injerencia tóxica (adaptación celular, lesión, respuesta inmunitaria, inflamación y reparación) y, en consecuencia, podrían influir en los fenotipos DILI, incluyendo IDF. Los análisis anteriores de minería de datos han demostrado asociaciones entre co-medición y gravedad de DILI, lo que sugiere un posible efecto modular de las manifestaciones y gravedad de DILI por ciertos medicamentos usados concomitantemente (Suzuki, Yuen et al. 2009).

También se investigaron posibles interacciones fármaco-huésped que influyen en la demora de DILI. Hasta la fecha, no existen metodologías establecidas para explorar las interacciones fármaco-huésped en DILI. Hemos implementado un enfoque de dos niveles para explorar las interacciones de dos factores (un factor de fármaco y un factor del paciente), con esta técnica se identificaron cuatro interacciones que podrían influir en la aparición de sintomatología diferida en DILI. Se encontró que los pacientes más jóvenes y / o las mujeres tenían menos probabilidades de manifestar inicio tardío de DILI cuando tomaban fármacos sin toxicidad mitocondrial. Ambos elementos, el sexo femenino y la edad se han relacionado con daño hepatocelular y hepatitis más grave (Lucena, Andrade et al. 2009; Suzuki, Barnhart et al. 2017).

Se sabe que el sexo, las hormonas sexuales y el envejecimiento influyen tanto en las respuestas inmunes innatas como en las adaptivas (Bouman 2005, Shaw 2010). Las diferencias en la respuesta inmune a una propiedad específica del fármaco pueden definir la latencia del desarrollo del DILI. Suponiendo que los fármacos sin potencial daño mitocondrial son menos propensos a afectar la función mitocondrial, los pacientes con DILI inducidos por este tipo de fármacos pueden tener un mejor suministro de energía celular en comparación con los pacientes DILI inducidos por fármacos con potencial daño mitocondrial. Debido a ello serían capaces de contrarrestar los efectos toxicológicos y retrasar la toxicidad. Así como la aparición de síntomas de DILI. Cabe señalar que el efecto celular de los medicamentos mitocondriales

peligrosos puede variar dependiendo de los factores individuales del huésped, tales como las variaciones genéticas concomitantes además del sexo y la edad (Chen, Suzuki et al. 2015). No obstante se requieren más estudios para delinear los posibles mecanismos subyacentes a las interacciones descubiertas.

Las enfermedades cardíacas subyacentes también fueron identificadas en las interacciones como un modificador del efecto de los fármacos con daño mitocondrial; así como de los fármacos alta electronegatividad de Pauling. Aunque estas interacciones son difíciles de explicar según el conocimiento actual. Al evaluar las interacciones en el presente estudio, se desconoce si alguno de los factores como enfermedades cardíacas son reales modificadores del efecto farmacológico o por el contrario, estas interacciones identificadas fueron detectada de manera errónea debido a la existencia de factores coexistentes (por ejemplo, edad avanzada, sexo masculino, medicamentos concomitantes) (Strait y Lakatta 2012) . Se necesitan nuevas metodologías para descubrir riesgos multifactoriales para abordar más las interacciones identificadas.

Nuestro estudio tiene bastantes puntos fuertes. Es el primer estudio que investiga los factores del huésped, las propiedades de los fármacos y sus interacciones que influyen en el fenotipo DILI. Los casos DILI bien caracterizados evaluados en este estudio permitieron identificar factores significativos, asociados con la demora en la manifestación de DILI y generar interesantes hipótesis relativas, a la latencia diversidad en la manifestación DILI. Nuestro estudio también tiene debilidades. El tamaño de la población IDF no fue suficiente para evaluar los impactos de comorbilidades individuales, la co-medicación o sus interacciones. Además, nuestra metodología actual no permite evaluar los riesgos multifactoriales. Se necesitan el desarrollo de nuevos enfoques de investigación para determinar cómo los factores del huésped, las propiedades del fármaco y sus interacciones específicas juegan un papel en diversas manifestaciones DILI.

GRAVEDAD DEL DE DAÑO HEPÁTICO

La gravedad de las reacciones en el daño hepático inducido por fármacos es uno de los factores más impredecibles e importantes en DILI. Hasta el momento, se han desarrollado varias escalas con el objetivo de dirimir a nivel bioquímico la posible evolución del daño. La más usada en la actualidad es la ley de Zimmerman que indica que los casos de daño hepatocelulares con ictericia presentan un mayor riesgo de desembocar en un caso fatal/trasplante (Reuben 2004). Recientemente también se publicó un estudio que indicaba la existencia de otros predictores bioquímicos para intentar predecir la evolución del daño (Robles-Díaz, Lucena et al. 2014). El presente estudio pretende esclarecer que factores podrían tener relación con esa gravedad.

El actual estudio muestra que un mayor metabolismo hepático y una tasa mayor de excreción de fármaco metabolizado podrían contribuir al aumento de la gravedad. Sin embargo, estas propiedades son más frecuentes en daño hepatocelular como se muestra en el primer subanálisis de este trabajo. Es bien conocido que la fatalidad se asocia de manera predominante en daño hepatocelular, siendo escaso los casos colestásicos (Reuben 2004; Andrade, Lucena et al. 2005). Por ello estas observaciones parecen más relacionados con el tipo de daño hepático que con la gravedad del mismo.

Al analizar los factores del huésped que podrían condicionar la gravedad del mismo. Se encontró que el factor predictor fue el consumo de comedicación de tipo J. Lo cual indicaría que los pacientes con enfermedades infecciosas y/o fármacos para su tratamiento desarrollarían una reacción adversa más grave. Esto podría deberse bien a que la propia infección debilita al organismo y favorece la aparición de un daño más grave. O también podría significar, que los fármacos antiinfectivos concomitantes comparten algún efecto que incrementa la gravedad del daño. Es conocido que los antibióticos son una causa común de DILI (Andrade, Lopez-Ortega et al. 2008; Chalasani, Fontana et al. 2008), sin embargo la aparición de casos graves es muy baja en comparación a su consumo (Polson 2007), además su papel como comedicación es desconocido. Estos fármacos podrían producir cambios en el

organismo, tales como eliminación de la flora bacteriana, liberación de antígenos o endotoxina del microorganismo. Estos procesos incrementarían la gravedad de la reacción (Cani, Bibiloni et al. 2008). Estudios previos han mostrado que un desequilibrio en esta flora bacteriana, podría conllevar la aparición de enfermedades hepáticas como hígado graso, así como inducir cambios en el sistema inmune y el metabolismo. Manifestando cambios en su presentación (Machado and Cortez-Pinto 2016; Tilg, Cani et al. 2016).

CONCLUSIONES

1. TIPO DE DAÑO HEPATICO

- Dentro de las características del paciente, la edad es el factor determinante de la expresión fenotípica del daño. El daño hepatocelular predomina en pacientes jóvenes, mientras que los pacientes de edad avanzada (≥ 60 años) presentan más frecuentemente un daño colestásico. Además, los antecedentes de enfermedad cardiovascular condicionarían una mayor susceptibilidad al desarrollo de daño colestásico.
- Las principales propiedades farmacológicas que modulan la expresión del daño hepático tóxico son liposolubilidad, grado de fijación proteica, extensión del metabolismo hepático y la presencia de circulación enterohepática. El daño hepatocelular vendría determinado por fármacos que poseen mayor lipofilicidad, elevada fijación a proteínas plasmáticas e importante metabolismo hepático. Alternativamente, el daño colestásico estaría relacionado con fármacos más hidrosolubles con pobre fijación proteica y escaso metabolismo hepático.
- Otras características fisicoquímicas identificadas como potenciales moduladores de la expresión del daño hepático son la presencia de anillos con heteroátomos en la estructura química, la presencia de átomos de azufre y/o la tasa de hibridación de orbitales.
- La interacción de los factores del huésped y las propiedades farmacológicas sugieren que: una edad avanzada y el consumo de fármacos con escaso metabolismo hepático, incrementa de forma significativa el riesgo de daño colestásico en individuos susceptibles. Contrariamente a lo esperado, en pacientes jóvenes no se modifica el riesgo de desarrollar daño hepatocelular en función de la tasa de metabolismo hepático.

2. INICIO DIFERIDO DE LOS SÍNTOMAS

- Los fármacos con potencial para inducir una aparición diferida de los síntomas tienen una vida media más corta, un menor metabolismo hepático y una mayor proporción excretada en forma no metabolizada que los fármacos sin potencial de inicio diferido. Estas propiedades estarían relacionadas con mayor solubilidad, menor lipofilicidad y menor unión a proteínas plasmáticas.
- Tres factores independientes parecen influir en la probabilidad de inicio diferido de los síntomas: el metabolismo hepático (fármaco), la dosis diaria (huésped) y las enfermedades preexistentes (huésped).
- Los resultados derivados de las interacciones entre los factores del huésped y las propiedades farmacológicas del fármaco, sugieren que la interacción entre la responsabilidad mitocondrial y la edad, el sexo o las enfermedades cardíacas subyacentes modulan el riesgo de hepatotoxicidad con inicio diferido de los síntomas. La electronegatividad de Pauling combinada con enfermedades cardíacas subyacentes afecta de manera similar a la probabilidad de inicio diferido.

3. GRAVEDAD DEL DAÑO HEPATICO

- Fármacos con elevado metabolismo hepático y una tasa mayor de excreción de fármaco metabolizado parecen contribuir al aumento de la gravedad. Esta observación podría estar relacionada con la mayor frecuencia de casos hepatocelulares que se asocian a una mayor gravedad del daño.
- La presencia de enfermedades infecciosas y/o el consumo de medicación antiinfecciosa, incrementa el riesgo de desarrollar un episodio de toxicidad hepática con mayor gravedad.

La combinación de los factores del huésped y de las propiedades farmacológicas juega un papel relevante en la modulación del daño hepático idiosincrásico, por lo que futuros estudios en esta área deben contemplar esta visión integradora.

REFERENCIAS

- A. Gonzalez-Jimenez, I. M.-C., M. Robles-Díaz, ME. Zoubek, P. Díaz-Jimenez, M R. Cabello, A Ortega-Alonso, M García-Cortes, B García-Muñoz, M C. Fernandez, M Slim, M Romero-Gómez, F Bessone, N Fernandez, M Arrese, E. Montane, H Hallal, JA. Sanabria-Cabrera, R Sanjuan-Jimenez, M I. Lucena, R J. Andrade. (2016). Hepatotoxicity associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. A comparative analysis among ibuprofen, diclofenac and nimesulide from the Spanish and Latinamerican DILI registries. *EASL. The International Liver Congress 2016*. J. o. Hepatology. Barcelona, Journal of Hepatology.
- Aithal, G. P. (2015). "Pharmacogenetic testing in idiosyncratic drug-induced liver injury: current role in clinical practice." *Liver Int* **35**(7): 1801-1808.
- Aithal, G. P., P. B. Watkins, et al. (2011). "Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury." *Clin Pharmacol Ther* **89**(6): 806-815.
- Alberti-Flor, J. J., M. E. Hernandez, et al. (1989). "Fulminant liver failure and pancreatitis associated with the use of sulfamethoxazole-trimethoprim." *Am J Gastroenterol* **84**(12): 1577-1579.
- Amidon, G. L., H. Lennernas, et al. (1995). "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability." *Pharm Res* **12**(3): 413-420.
- Andrade, R., M. Lucena, et al. (2005). "Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period." *Gastroenterology* **129**: 512-521.
- Andrade, R. J., S. Lopez-Ortega, et al. (2008). "Idiosyncratic drug hepatotoxicity: a 2008 update." *Expert Rev Clin Pharmacol* **1**(2): 261-276.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (2004). "HLA class II genotype influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease." *Hepatology* **39**(6): 1603-1612.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (2000). "Fatal hepatitis associated with nimesulide." *J Hepatol* **32**(1): 174.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (2005). "Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period." *Gastroenterology* **129**(2): 512-521.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (2005). "Drug-Induced Liver Injury: An Analysis of 461 Incidences Submitted to the Spanish Registry Over a 10-Year Period." *Gastroenterology* **129**(2): 512-521.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (2002). "Chronic hepatitis C, ibuprofen, and liver damage." *Am J Gastroenterol* **97**(7): 1854-1855.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (1999). "Acute liver injury associated with the use of ebrotidine, a new H2-receptor antagonist." *J Hepatol* **31**(4): 641-646.
- Ariza, A., D. Garzon, et al. (2012). "Protein haptentation by amoxicillin: high resolution mass spectrometry analysis and identification of target proteins in serum." *J Proteomics* **77**: 504-520.
- Ayrton, A. and P. Morgan (2001). "Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion." *Xenobiotica* **31**(8-9): 469-497.
- Baekdal, M., H. Ytting, et al. (2016). "Drug-induced liver injury: a cohort study on patients referred to the Danish transplant center over a five year period." *Scand J Gastroenterol*: 1-5.
- Balaban, A. T., A. Beteringhe, et al. (2007). "Four new topological indices based on the molecular path code." *J Chem Inf Model* **47**(3): 716-731.
- Becker, S. (2004). "Liver toxicity in epidemiological cohorts." *Clin Infect Dis* **38 Suppl 2**: S49-55.

- Begrache, K., J. Massart, et al. (2011). "Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver." *J Hepatol* **54**(4): 773-794.
- Benet, L. Z., F. Broccatelli, et al. (2011). "BDDCS applied to over 900 drugs." *AAPS J* **13**(4): 519-547.
- Benichou, C. (1990). "Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting." *J Hepatol* **11**(2): 272-276.
- Benjamin, S. B., Z. D. Goodman, et al. (1985). "The morphologic spectrum of halothane-induced hepatic injury: analysis of 77 cases." *Hepatology* **5**(6): 1163-1171.
- Bessone, F. (2010). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage?" *World J Gastroenterol* **16**(45): 5651-5661.
- Bessone, F., N. Hernandez, et al. (2012). "Building a Spanish-Latin American network on drug induced liver injury: much to get from a joint collaborative initiative." *Ann Hepatol* **11**(4): 544-549.
- Bessone, F., N. Hernandez, et al. (2016). "The Latin American DILI Registry Experience: A Successful Ongoing Collaborative Strategic Initiative." *Int J Mol Sci* **17**(3).
- Bickford, C. L. and A. P. Spencer (2005). "Biliary sludge and hyperbilirubinemia associated with ceftriaxone in an adult: case report and review of the literature." *Pharmacotherapy* **25**(10): 1389-1395.
- Bjornsson, E. and L. Davidsdottir (2009). "The long-term follow-up after idiosyncratic drug-induced liver injury with jaundice." *J Hepatol* **50**(3): 511-517.
- Bjornsson, E., E. I. Jacobsen, et al. (2012). "Hepatotoxicity associated with statins: reports of idiosyncratic liver injury post-marketing." *J Hepatol* **56**(2): 374-380.
- Bjornsson, E. and R. Olsson (2006). "Suspected drug-induced liver fatalities reported to the WHO database." *Dig Liver Dis* **38**(1): 33-38.
- Bjornsson, E. S., O. M. Bergmann, et al. (2013). "Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland." *Gastroenterology* **144**(7): 1419-1425, 1425 e1411-1413; quiz e1419-1420.
- Bjornsson, E. S. and J. G. Jonasson (2013). "Drug-induced cholestasis." *Clin Liver Dis* **17**(2): 191-209.
- Boelsterli, U. A. and P. L. Lim (2007). "Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity?" *Toxicol Appl Pharmacol* **220**(1): 92-107.
- Bolton, J. L., M. A. Trush, et al. (2000). "Role of quinones in toxicology." *Chem Res Toxicol* **13**(3): 135-160.
- Burch, D. (2008). "Martindale - The complete drug reference, 35th edition." *Tls-the Times Literary Supplement*(5471): 12-12.
- Butler, J. M. and E. J. Begg (2008). "Free drug metabolic clearance in elderly people." *Clin Pharmacokinet* **47**(5): 297-321.
- Cani, P. D., R. Bibiloni, et al. (2008). "Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice." *Diabetes* **57**(6): 1470-1481.
- Capella, D., M. Bruguera, et al. (1999). "Fluoxetine-induced hepatitis: why is postmarketing surveillance needed?" *Eur J Clin Pharmacol* **55**(7): 545-546.
- Carlson, G. P. (2011). "Comparison of styrene oxide enantiomers for hepatotoxic and pneumotoxic effects in microsomal epoxide hydrolase-deficient mice." *J Toxicol Environ Health A* **74**(6): 347-350.
- Castiella, A., E. Zapata, et al. (2014). "Drug-induced autoimmune liver disease: A diagnostic dilemma of an increasingly reported disease." *World J Hepatol* **6**(4): 160-168.
- Cetti, R. J., S. Venn, et al. (2009). "The risks of long-term nitrofurantoin prophylaxis in patients with recurrent urinary tract infection: a recent medico-legal case." *BJU Int* **103**(5): 567-569.

- Corsini, A. and M. Bortolini (2013). "Drug-induced liver injury: the role of drug metabolism and transport." *J Clin Pharmacol* **53**(5): 463-474.
- Czaja, A. J. (2011). "Drug-induced autoimmune-like hepatitis." *Dig Dis Sci* **56**(4): 958-976.
- Chalasani, N. (2005). "Statins and hepatotoxicity: focus on patients with fatty liver." *Hepatology* **41**(4): 690-695.
- Chalasani, N., H. Aljadhey, et al. (2004). "Patients with elevated liver enzymes are not at higher risk for statin hepatotoxicity." *Gastroenterology* **126**(5): 1287-1292.
- Chalasani, N. and E. Bjornsson (2010). "Risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury." *Gastroenterology* **138**(7): 2246-2259.
- Chalasani, N., H. L. Bonkovsky, et al. (2015). "Features and Outcomes of 899 Patients With Drug-Induced Liver Injury: The DILIN Prospective Study." *Gastroenterology* **148**(7): 1340-1352 e1347.
- Chalasani, N., R. J. Fontana, et al. (2008). "Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States." *Gastroenterology* **135**(6): 1924-1934, 1934 e1921-1924.
- Chalasani, N. P., P. H. Hayashi, et al. (2014). "ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury." *Am J Gastroenterol* **109**(7): 950-966; quiz 967.
- Chen, M., J. Borlak, et al. (2013). "High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury." *Hepatology* **58**(1): 388-396.
- Chen, M., J. Borlak, et al. (2016). "A Model to predict severity of drug-induced liver injury in humans." *Hepatology* **64**(3): 931-940.
- Chen, M., H. Hong, et al. (2013). "Quantitative structure-activity relationship models for predicting drug-induced liver injury based on FDA-approved drug labeling annotation and using a large collection of drugs." *Toxicol Sci* **136**(1): 242-249.
- Chen, M., A. Suzuki, et al. (2015). "Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors." *J Hepatol* **63**(2): 503-514.
- Chen, M., V. Vijay, et al. (2011). "FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury." *Drug Discov Today* **16**(15-16): 697-703.
- Chiang, J. Y. (2009). "Bile acids: regulation of synthesis." *J Lipid Res* **50**(10): 1955-1966.
- Chien, R. N., L. J. Yang, et al. (1997). "Hepatic injury during ketoconazole therapy in patients with onychomycosis: a controlled cohort study." *Hepatology* **25**(1): 103-107.
- Daly, A. K., G. P. Aithal, et al. (2007). "Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes." *Gastroenterology* **132**(1): 272-281.
- Danan, G. and C. Benichou (1993). "Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries." *J Clin Epidemiol* **46**(11): 1323-1330.
- David, S. and J. P. Hamilton (2010). "Drug-induced Liver Injury." *US Gastroenterol Hepatol Rev* **6**: 73-80.
- Dawson, S., S. Stahl, et al. (2012). "In vitro inhibition of the bile salt export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans." *Drug Metab Dispos* **40**(1): 130-138.
- de Abajo, F. J., D. Montero, et al. (2004). "Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study." *Br J Clin Pharmacol* **58**(1): 71-80.
- Degott, C., G. Feldmann, et al. (1992). "Drug-induced prolonged cholestasis in adults: a histological semiquantitative study demonstrating progressive ductopenia." *Hepatology* **15**(2): 244-251.
- deLemos, A. S., D. M. Foureau, et al. (2014). "Drug-induced liver injury with autoimmune features." *Semin Liver Dis* **34**(2): 194-204.

- deLemos, A. S., M. Ghabril, et al. (2016). "Amoxicillin-Clavulanate-Induced Liver Injury." *Dig Dis Sci* **61**(8): 2406-2416.
- Derby, L. E., H. Jick, et al. (1993). "Erythromycin-associated cholestatic hepatitis." *Med J Aust* **158**(9): 600-602.
- Drasar, B. S., A. G. Renwick, et al. (1972). "The role of the gut flora in the metabolism of cyclamate." *Biochem J* **129**(4): 881-890.
- Dreifuss, F. E., N. Santilli, et al. (1987). "Valproic acid hepatic fatalities: a retrospective review." *Neurology* **37**(3): 379-385.
- Dressman, J. B., M. Vertzoni, et al. (2007). "Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract." *Adv Drug Deliv Rev* **59**(7): 591-602.
- Du, H., X. Chen, et al. (2013). "Slow N-acetyltransferase 2 genotype contributes to anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: a meta-analysis." *Mol Biol Rep* **40**(5): 3591-3596.
- Durand, F., D. Pessayre, et al. (1995). "Antituberculous therapy and acute liver failure." *Lancet* **345**(8958): 1170.
- Dykens, J. A. and Y. Will (2007). "The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development." *Drug Discov Today* **12**(17-18): 777-785.
- Eggleston, S. M. and M. M. Belandres (1985). "Jaundice associated with cephalosporin therapy." *Drug Intell Clin Pharm* **19**(7-8): 553-555.
- Erlinger, S. (1997). "Drug-induced cholestasis." *J Hepatol* **26 Suppl 1**: 1-4.
- Falvey, D. E. (2005). Nitrenium Ions. *Reactive Intermediate Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.: 593-650.
- Faulkner, L., X. Meng, et al. (2014). "The importance of hapten-protein complex formation in the development of drug allergy." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **14**(4): 293-300.
- Feng, M., B. Tang, et al. (2016). "Sulfur Containing Scaffolds in Drugs: Synthesis and Application in Medicinal Chemistry." *Curr Top Med Chem* **16**(11): 1200-1216.
- Fontana, R. J., L. B. Seeff, et al. (2010). "Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: summary of a clinical research workshop." *Hepatology* **52**(2): 730-742.
- Fouad, Y. M. and R. Yehia (2014). "Hepato-cardiac disorders." *World J Hepatol* **6**(1): 41-54.
- Fountain, F. F., E. Tolley, et al. (2005). "Isoniazid hepatotoxicity associated with treatment of latent tuberculosis infection: a 7-year evaluation from a public health tuberculosis clinic." *Chest* **128**(1): 116-123.
- García-Cortes, M., Y. Borraz, et al. (2008). "[Liver injury induced by "natural remedies": an analysis of cases submitted to the Spanish Liver Toxicity Registry]." *Rev Esp Enferm Dig* **100**(11): 688-695.
- García Rodríguez, L. A., B. H. Stricker, et al. (1996). "Risk of acute liver injury associated with the combination of amoxicillin and clavulanic acid." *Arch Intern Med* **156**(12): 1327-1332.
- Gershwin, M. E., J. M. Vierling, et al. (2008). *Liver Immunology: Principles and Practice*, Humana Press.
- Goldberg, D. S., K. A. Forde, et al. (2015). "Population-representative incidence of drug-induced acute liver failure based on an analysis of an integrated health care system." *Gastroenterology* **148**(7): 1353-1361 e1353.
- Gordin, F. M., D. L. Cohn, et al. (2004). "Hepatotoxicity of rifampin and pyrazinamide in the treatment of latent tuberculosis infection in HIV-infected persons: is it different than in HIV-uninfected persons?" *Clin Infect Dis* **39**(4): 561-565.
- Graham, D. J., L. Green, et al. (2003). "Troglitazone-induced liver failure: a case study." *Am J Med* **114**(4): 299-306.
- Gu, X. and J. E. Manautou (2012). "Molecular mechanisms underlying chemical liver injury." *Expert Rev Mol Med* **14**: e4.
- Hadzic, N., B. Portmann, et al. (1990). "Acute liver failure induced by carbamazepine." *Arch Dis Child* **65**(3): 315-317.

- Hagley, M. T., D. T. Hulisz, et al. (1993). "Hepatotoxicity associated with angiotensin-converting enzyme inhibitors." *Ann Pharmacother* **27**(2): 228-231.
- Han, D., L. Dara, et al. (2013). "Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria." *Trends Pharmacol Sci* **34**(4): 243-253.
- Han, D., M. Shinohara, et al. (2010). "Signal transduction pathways involved in drug-induced liver injury." *Handb Exp Pharmacol*(196): 267-310.
- Hanley, J. A. and B. J. McNeil (1982). "The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve." *Radiology* **143**(1): 29-36.
- Harayama, S., M. Kok, et al. (1992). "Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases." *Annu Rev Microbiol* **46**: 565-601.
- Hautekeete, M. L., Y. Horsmans, et al. (1999). "HLA association of amoxicillin-clavulanate--induced hepatitis." *Gastroenterology* **117**(5): 1181-1186.
- Hein, D. W., M. A. Doll, et al. (2000). "Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**(1): 29-42.
- Heubi, J. E., M. B. Barbacci, et al. (1998). "Therapeutic misadventures with acetaminophen: hepatotoxicity after multiple doses in children." *J Pediatr* **132**(1): 22-27.
- Himoto, T. and M. Nishioka (2013). "Autoantibodies in liver disease: important clues for the diagnosis, disease activity and prognosis." *Auto Immun Highlights* **4**(2): 39-53.
- Hinson, J. A., S. L. Michael, et al. (2000). "Western blot analysis for nitrotyrosine protein adducts in livers of saline-treated and acetaminophen-treated mice." *Toxicol Sci* **53**(2): 467-473.
- Horita, Y. and N. Doi (2014). "Comparative study of the effects of antituberculosis drugs and antiretroviral drugs on cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein." *Antimicrob Agents Chemother* **58**(6): 3168-3176.
- Hosoya, H. (2007). "Important mathematical structures of the topological index Z for tree graphs." *J Chem Inf Model* **47**(3): 744-750.
- Hughes, T. B., G. P. Miller, et al. (2015). "Modeling Epoxidation of Drug-like Molecules with a Deep Machine Learning Network." *ACS Cent Sci* **1**(4): 168-180.
- Hunt, C. M., W. R. Westerkam, et al. (1992). "Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A." *Biochem Pharmacol* **44**(2): 275-283.
- INE. (2014). "Encuesta Europea de Salud 2014. Asistencia sanitaria: Cifras absolutas." *Instituto Nacional de Estadística*, from <http://www.ine.es/dynt3/inebase/index.htm?type=pcaxis&path=/t15/p420/a2014/p02/&file=pcaxis>.
- Ingelman-Sundberg, M., M. Oscarson, et al. (1999). "Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment." *Trends Pharmacol Sci* **20**(8): 342-349.
- Ingelman-Sundberg, M. and C. Rodriguez-Antona (2005). "Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1460): 1563-1570.
- Jaeschke, H. and M. L. Bajt (2006). "Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death." *Toxicol Sci* **89**(1): 31-41.
- Javier Rodriguez-Gonzalez, F., J. L. Montero, et al. (2002). "Orthotopic liver transplantation after subacute liver failure induced by therapeutic doses of ibuprofen." *Am J Gastroenterol* **97**(9): 2476-2477.
- Jollow, D. J., J. R. Mitchell, et al. (1973). "Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo." *J Pharmacol Exp Ther* **187**(1): 195-202.
- Kaplowitz, N. (2004). "Drug-induced liver injury." *Clin Infect Dis* **38** Suppl 2: S44-48.
- Kaplowitz, N. (2005). "Idiosyncratic drug hepatotoxicity." *Nat Rev Drug Discov* **4**(6): 489-499.
- Kaplowitz, N. (2013). "Avoiding idiosyncratic DILI: two is better than one." *Hepatology* **58**(1): 15-17.

- Karch, F. E. and L. Lasagna (1977). "Toward the operational identification of adverse drug reactions." *Clin Pharmacol Ther* **21**(3): 247-254.
- Kashkooli, S., B. Baraty, et al. (2014). "alpha-Methyldopa-induced hepatitis during the postpartum period." *BMJ Case Rep* **2014**.
- Kirchheiner, J., I. Roots, et al. (2005). "Effect of genetic polymorphisms in cytochrome p450 (CYP) 2C9 and CYP2C8 on the pharmacokinetics of oral antidiabetic drugs: clinical relevance." *Clin Pharmacokinet* **44**(12): 1209-1225.
- Kleiner, D. E., N. P. Chalasani, et al. (2014). "Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations." *Hepatology* **59**(2): 661-670.
- Knowles, S. R., J. Uetrecht, et al. (2000). "Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes." *Lancet* **356**(9241): 1587-1591.
- Kock, K., B. C. Ferslew, et al. (2014). "Risk factors for development of cholestatic drug-induced liver injury: inhibition of hepatic basolateral bile acid transporters multidrug resistance-associated proteins 3 and 4." *Drug Metab Dispos* **42**(4): 665-674.
- Kumar, N., C. K. Kedarisetty, et al. (2014). "Antitubercular therapy in patients with cirrhosis: challenges and options." *World J Gastroenterol* **20**(19): 5760-5772.
- Lammert, C., E. Bjornsson, et al. (2010). "Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events." *Hepatology* **51**(2): 615-620.
- Lammert, C., S. Einarsson, et al. (2008). "Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals." *Hepatology* **47**(6): 2003-2009.
- Lankisch, T. O., G. Behrens, et al. (2009). "Gilbert's syndrome and hyperbilirubinemia in protease inhibitor therapy--an extended haplotype of genetic variants increases risk in indinavir treatment." *J Hepatol* **50**(5): 1010-1018.
- Lankisch, T. O., U. Moebius, et al. (2006). "Gilbert's disease and atazanavir: from phenotype to UDP-glucuronosyltransferase haplotype." *Hepatology* **44**(5): 1324-1332.
- Larrey, D. and G. P. Pageaux (1997). "Genetic predisposition to drug-induced hepatotoxicity." *J Hepatol* **26 Suppl 2**: 12-21.
- Larrey, D., T. Vial, et al. (1992). "Hepatitis associated with amoxicillin-clavulanic acid combination report of 15 cases." *Gut* **33**(3): 368-371.
- Le Couteur, D. G. and A. J. McLean (1998). "The aging liver. Drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis." *Clin Pharmacokinet* **34**(5): 359-373.
- Lee, C. R., J. A. Goldstein, et al. (2002). "Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data." *Pharmacogenetics* **12**(3): 251-263.
- Levy, C. (2013). *Cholestatic Liver Diseases, An Issue of Clinics in Liver Disease*, Elsevier Health Sciences.
- Lewis, J. H., R. C. Ranard, et al. (1989). "Amiodarone hepatotoxicity: prevalence and clinicopathologic correlations among 104 patients." *Hepatology* **9**(5): 679-685.
- Li, C., J. Long, et al. (2013). "GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: an updated meta-analysis." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**(7): 859-868.
- Liu, R., H. Sun, et al. (2001). "Development of quantitative structure-property relationship models for early ADME evaluation in drug discovery. 2. Blood-brain barrier penetration." *J Chem Inf Comput Sci* **41**(6): 1623-1632.
- Liu, Z. X. and N. Kaplowitz (2002). "Immune-mediated drug-induced liver disease." *Clin Liver Dis* **6**(3): 755-774.
- Livertox, N. (2015). "Isoniazid." from <http://livertox.nlm.nih.gov/Isoniazid.htm>.
- Lu, R. J., Y. Zhang, et al. (2016). "Clinical characteristics of drug-induced liver injury and related risk factors." *Exp Ther Med* **12**(4): 2606-2616.

- Lucena, M. I., R. J. Andrade, et al. (2006). "Determinants of the clinical expression of amoxicillin-clavulanate hepatotoxicity: a prospective series from Spain." *Hepatology* **44**(4): 850-856.
- Lucena, M. I., R. J. Andrade, et al. (2009). "Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex." *Hepatology* **49**(6): 2001-2009.
- Lucena, M. I., R. J. Andrade, et al. (2008). "Glutathione S-transferase m1 and t1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug-induced liver injury." *Hepatology* **48**(2): 588-596.
- Lucena, M. I., R. J. Andrade, et al. (2000). "Trovafoxacin-induced acute hepatitis." *Clin Infect Dis* **30**(2): 400-401.
- Lucena, M. I., R. J. Andrade, et al. (2006). "Prolonged cholestasis after raloxifene and fenofibrate interaction: A case report." *World J Gastroenterol* **12**(32): 5244-5246.
- Lucena, M. I., R. Camargo, et al. (2001). "Comparison of two clinical scales for causality assessment in hepatotoxicity." *Hepatology* **33**(1): 123-130.
- Lucena, M. I., E. Garcia-Martin, et al. (2010). "Mitochondrial superoxide dismutase and glutathione peroxidase in idiosyncratic drug-induced liver injury." *Hepatology* **52**(1): 303-312.
- Lucena, M. I., N. Kaplowitz, et al. (2011). "Recurrent drug-induced liver injury (DILI) with different drugs in the Spanish Registry: the dilemma of the relationship to autoimmune hepatitis." *J Hepatol* **55**(4): 820-827.
- Lucena, M. I., M. Molokhia, et al. (2011). "Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA class I and II alleles." *Gastroenterology* **141**(1): 338-347.
- Machado, M. V. and H. Cortez-Pinto (2016). "Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet." *Int J Mol Sci* **17**(4): 481.
- Macherey, A.-C. and P. M. Dansette (2008). "Biotransformations leading to toxic metabolites: chemical aspects."
- Maggini, M., R. Raschetti, et al. (1999). "Use of amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid and hospitalization for acute liver injury." *Ann Ist Super Sanita* **35**(3): 429-433.
- Magnusson, J. O., B. Bergdahl, et al. (1982). "Metabolism of digoxin and absorption site." *Br J Clin Pharmacol* **14**(2): 284-285.
- Makin, A. J., J. Wendon, et al. (1995). "A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987-1993)." *Gastroenterology* **109**(6): 1907-1916.
- Maria, V. A. and R. M. Victorino (1997). "Development and validation of a clinical scale for the diagnosis of drug-induced hepatitis." *Hepatology* **26**(3): 664-669.
- Medina-Caliz, I., M. Robles-Diaz, et al. (2016). "Definition and risk factors for chronicity following acute idiosyncratic drug-induced liver injury." *J Hepatol*.
- Menzies, D., R. Long, et al. (2008). "Adverse events with 4 months of rifampin therapy or 9 months of isoniazid therapy for latent tuberculosis infection: a randomized trial." *Ann Intern Med* **149**(10): 689-697.
- Miners, J. O., R. A. McKinnon, et al. (2002). "Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance." *Toxicology* **181-182**: 453-456.
- Mitchell, S. J. and S. N. A. P. Hilmer (2010). "Drug-induced liver injury in older adults." *Ther Adv Drug Saf* **1**(2): 65-77.
- Moller, S. and M. Bernardi (2013). "Interactions of the heart and the liver." *Eur Heart J* **34**(36): 2804-2811.
- Molleston, J. P., R. J. Fontana, et al. (2011). "Characteristics of idiosyncratic drug-induced liver injury in children: results from the DILIN prospective study." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **53**(2): 182-189.
- Munoz, S. J., A. Martinez-Hernandez, et al. (1990). "Intrahepatic cholestasis and phospholipidosis associated with the use of trimethoprim-sulfamethoxazole." *Hepatology* **12**(2): 342-347.

- Neuberger, J., J. G. Kenna, et al. (1985). "Antibody mediated hepatocyte injury in methyl dopa induced hepatotoxicity." Gut **26**(11): 1233-1239.
- Nicoletti, P., A. N. Werk, et al. (2016). "HLA-DRB1*16: 01-DQB1*05: 02 is a novel genetic risk factor for flupirtine-induced liver injury." Pharmacogenet Genomics **26**(5): 218-224.
- Nolan, C. M., S. V. Goldberg, et al. (1999). "Hepatotoxicity associated with isoniazid preventive therapy: a 7-year survey from a public health tuberculosis clinic." JAMA **281**(11): 1014-1018.
- O'Donohue, J., K. A. Oien, et al. (2000). "Co-amoxiclav jaundice: clinical and histological features and HLA class II association." Gut **47**(5): 717-720.
- Obach, R. S., A. S. Kalgutkar, et al. (2008). "Can in vitro metabolism-dependent covalent binding data in liver microsomes distinguish hepatotoxic from nonhepatotoxic drugs? An analysis of 18 drugs with consideration of intrinsic clearance and daily dose." Chem Res Toxicol **21**(9): 1814-1822.
- Ogedegbe, A. O. and M. S. Sulkowski (2003). "Antiretroviral-associated liver injury." Clin Liver Dis **7**(2): 475-499.
- Onakpoya, I. J., C. J. Heneghan, et al. (2016). "Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature." BMC Med **14**: 10.
- Orellana, M. and V. Guajardo (2004). "[Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases]." Rev Med Chil **132**(1): 85-94.
- Ortiz de Montellano, P. R. and S. D. Nelson (2011). "Rearrangement reactions catalyzed by cytochrome P450s." Arch Biochem Biophys **507**(1): 95-110.
- Pachkoria, K., M. I. Lucena, et al. (2007). "Genetic and molecular factors in drug-induced liver injury: a review." Curr Drug Saf **2**(2): 97-112.
- Pachkoria, K., M. I. Lucena, et al. (2007). "Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 are not related to drug-induced idiosyncratic liver injury (DILI)." Br J Pharmacol **150**(6): 808-815.
- Padda, M. S., M. Sanchez, et al. (2011). "Drug-induced cholestasis." Hepatology **53**(4): 1377-1387.
- Papay, J. I., D. Clines, et al. (2009). "Drug-induced liver injury following positive drug rechallenge." Regul Toxicol Pharmacol **54**(1): 84-90.
- Park, B. K., H. Laverty, et al. (2011). "Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity." Chem Biol Interact **192**(1-2): 30-36.
- Park, H. J., T. H. Kim, et al. (2016). "Functional characterization of ABCB4 mutations found in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3." Sci Rep **6**: 26872.
- Pasipanodya, J. G. and T. Gumbo (2010). "Clinical and toxicodynamic evidence that high-dose pyrazinamide is not more hepatotoxic than the low doses currently used." Antimicrob Agents Chemother **54**(7): 2847-2854.
- Pelkonen, O. and H. Raunio (1997). "Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs." Environ Health Perspect **105 Suppl 4**: 767-774.
- Perdices, E. V., I. Medina-Caliz, et al. (2014). "Hepatotoxicity associated with statin use: analysis of the cases included in the Spanish Hepatotoxicity Registry." Rev Esp Enferm Dig **106**(4): 246-254.
- Pessayre, D., B. Fromenty, et al. (2012). "Central role of mitochondria in drug-induced liver injury." Drug Metab Rev **44**(1): 34-87.
- Pessayre, D., A. Mansouri, et al. (2010). "Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury." Handb Exp Pharmacol(196): 311-365.
- Petros, Z., M. M. Lee, et al. (2016). "Genome-wide association and replication study of anti-tuberculosis drugs-induced liver toxicity." BMC Genomics **17**(1): 755.
- Pfeifer, N. D., K. B. Harris, et al. (2013). "Determination of intracellular unbound concentrations and subcellular localization of drugs in rat sandwich-cultured hepatocytes compared with liver tissue." Drug Metab Dispos **41**(11): 1949-1956.

- Polson, J. E. (2007). "Hepatotoxicity due to antibiotics." *Clin Liver Dis* **11**(3): 549-561, vi.
- Porceddu, M., N. Buron, et al. (2012). "Prediction of liver injury induced by chemicals in human with a multiparametric assay on isolated mouse liver mitochondria." *Toxicol Sci* **129**(2): 332-345.
- Reuben, A. (2004). "Hy's law." *Hepatology* **39**(2): 574-578.
- Reuben, A., D. G. Koch, et al. (2010). "Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study." *Hepatology* **52**(6): 2065-2076.
- Rifkind, A. B., C. Lee, et al. (1995). "Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes." *Arch Biochem Biophys* **320**(2): 380-389.
- Roberts, M. S. (2010). "Drug structure-transport relationships." *J Pharmacokinet Pharmacodyn* **37**(6): 541-573.
- Robles-Diaz, M., M. I. Lucena, et al. (2014). "Use of Hy's law and a new composite algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury." *Gastroenterology* **147**(1): 109-118 e105.
- Rodriguez-Antona, C., R. Jover, et al. (2000). "Quantitative RT-PCR measurement of human cytochrome P-450s: application to drug induction studies." *Arch Biochem Biophys* **376**(1): 109-116.
- Rostom, A., L. Goldkind, et al. (2005). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hepatic toxicity: a systematic review of randomized controlled trials in arthritis patients." *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**(5): 489-498.
- Roy, B., A. Chowdhury, et al. (2001). "Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 'null' mutation." *J Gastroenterol Hepatol* **16**(9): 1033-1037.
- Russo, M. W., M. Scobey, et al. (2009). "Drug-induced liver injury associated with statins." *Semin Liver Dis* **29**(4): 412-422.
- Sabate, M., L. Ibanez, et al. (2007). "Risk of acute liver injury associated with the use of drugs: a multicentre population survey." *Aliment Pharmacol Ther* **25**(12): 1401-1409.
- Salpeter, S. R. (1993). "Fatal isoniazid-induced hepatitis. Its risk during chemoprophylaxis." *West J Med* **159**(5): 560-564.
- Scully, L. J., D. Clarke, et al. (1993). "Diclofenac induced hepatitis. 3 cases with features of autoimmune chronic active hepatitis." *Dig Dis Sci* **38**(4): 744-751.
- Scharer, L. and J. P. Smith (1969). "Serum transaminase elevations and other hepatic abnormalities in patients receiving isoniazid." *Ann Intern Med* **71**(6): 1113-1120.
- Schenker, S., R. R. Martin, et al. (1999). "Antecedent liver disease and drug toxicity." *J Hepatol* **31**(6): 1098-1105.
- Schiødt, F. V., E. Atillasoy, et al. (1999). "Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States." *Liver Transpl Surg* **5**(1): 29-34.
- Schmid, M. M., R. W. Freudenmann, et al. (2013). "Non-fatal and fatal liver failure associated with valproic acid." *Pharmacopsychiatry* **46**(2): 63-68.
- Seeff, L. B., B. A. Cuccherini, et al. (1986). "Acetaminophen hepatotoxicity in alcoholics. A therapeutic misadventure." *Ann Intern Med* **104**(3): 399-404.
- Seeto, R. K., B. Fenn, et al. (2000). "Ischemic hepatitis: clinical presentation and pathogenesis." *Am J Med* **109**(2): 109-113.
- Setchell, K. D., C. M. Rodrigues, et al. (1997). "Bile acid concentrations in human and rat liver tissue and in hepatocyte nuclei." *Gastroenterology* **112**(1): 226-235.
- Sgro, C., F. Clinard, et al. (2002). "Incidence of drug-induced hepatic injuries: A French population-based study." *Hepatology* **36**(2): 451-455.

- Shaw, P. J., P. E. Ganey, et al. (2010). "Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity." *Toxicol Sci* **118**(1): 7-18.
- Shiffman, M. L., F. B. Keith, et al. (1990). "Pathogenesis of ceftriaxone-associated biliary sludge. In vitro studies of calcium-ceftriaxone binding and solubility." *Gastroenterology* **99**(6): 1772-1778.
- Shimada, T., C. L. Hayes, et al. (1996). "Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1." *Cancer Res* **56**(13): 2979-2984.
- Shimada, T., H. Yamazaki, et al. (1994). "Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians." *J Pharmacol Exp Ther* **270**(1): 414-423.
- Singh, J., A. Arora, et al. (1995). "Antituberculosis treatment-induced hepatotoxicity: role of predictive factors." *Postgrad Med J* **71**(836): 359-362.
- Singlas, E. (1995). "[Clinical pharmacokinetics of azithromycin]." *Pathol Biol (Paris)* **43**(6): 505-511.
- Siramshetty, V. B., J. Nickel, et al. (2016). "WITHDRAWN--a resource for withdrawn and discontinued drugs." *Nucleic Acids Res* **44**(D1): D1080-1086.
- Siu, E. C. and R. F. Tyndale (2008). "Selegiline is a mechanism-based inactivator of CYP2A6 inhibiting nicotine metabolism in humans and mice." *J Pharmacol Exp Ther* **324**(3): 992-999.
- Stepan, A. F., D. P. Walker, et al. (2011). "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* **24**(9): 1345-1410.
- Stephens, C., M. A. Lopez-Nevot, et al. (2013). "HLA alleles influence the clinical signature of amoxicillin-clavulanate hepatotoxicity." *PLoS One* **8**(7): e68111.
- Stolk, M. F., M. C. Becx, et al. (2006). "Severe hepatic side effects of ezetimibe." *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**(7): 908-911.
- Stricker, B. H., A. P. Blok, et al. (1988). "Hepatic injury associated with the use of nitrofurans: a clinicopathological study of 52 reported cases." *Hepatology* **8**(3): 599-606.
- Suarez-Ortega, S., A. Puente-Fernandez, et al. (2013). "[Constitutional syndrome: clinical entity or a mixed bag]." *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* **51**(5): 532-535.
- Sulkowski, M. S., D. L. Thomas, et al. (2002). "Hepatotoxicity associated with nevirapine or efavirenz-containing antiretroviral therapy: role of hepatitis C and B infections." *Hepatology* **35**(1): 182-189.
- Suzuki, A., R. J. Andrade, et al. (2010). "Drugs associated with hepatotoxicity and their reporting frequency of liver adverse events in VigiBase: unified list based on international collaborative work." *Drug Saf* **33**(6): 503-522.
- Suzuki, A., E. M. Brunt, et al. (2011). "The use of liver biopsy evaluation in discrimination of idiopathic autoimmune hepatitis versus drug-induced liver injury." *Hepatology* **54**(3): 931-939.
- Suzuki, A., N. Yuen, et al. (2009). "Co-medications that modulate liver injury and repair influence clinical outcome of acetaminophen-associated liver injury." *Clin Gastroenterol Hepatol* **7**(8): 882-888.
- Tang, W. (2003). "The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives." *Curr Drug Metab* **4**(4): 319-329.
- Teoh, N., I. Leclercq, et al. (2003). "Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning." *Hepatology* **37**(1): 118-128.
- Teschke, R. and G. Danan (2016). "Diagnosis and Management of Drug-Induced Liver Injury (DILI) in Patients with Pre-Existing Liver Disease." *Drug Saf* **39**(8): 729-744.
- Tilg, H., P. D. Cani, et al. (2016). "Gut microbiome and liver diseases." *Gut*.

- Tsutsumi, M., A. Takada, et al. (1994). "Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 related to the development of alcoholic liver disease." *Gastroenterology* **107**(5): 1430-1435.
- Tujios, S. and R. J. Fontana (2011). "Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**(4): 202-211.
- Tuteja, S., N. T. Pырsopoulos, et al. (2008). "Simvastatin-ezetimibe-induced hepatic failure necessitating liver transplantation." *Pharmacotherapy* **28**(9): 1188-1193.
- Ueda, K., T. Ishitsu, et al. (2007). "Glutathione S-transferase M1 null genotype as a risk factor for carbamazepine-induced mild hepatotoxicity." *Pharmacogenomics* **8**(5): 435-442.
- Uetrecht, J. (2009). "Immunoallergic drug-induced liver injury in humans." *Semin Liver Dis* **29**(4): 383-392.
- Ulzurrun, E., C. Stephens, et al. (2013). "Role of chemical structures and the 1331T>C bile salt export pump polymorphism in idiosyncratic drug-induced liver injury." *Liver Int* **33**(9): 1378-1385.
- Urban, T. J., A. K. Daly, et al. (2014). "Genetic basis of drug-induced liver injury: present and future." *Semin Liver Dis* **34**(2): 123-133.
- van der Ven, A. J., P. P. Koopmans, et al. (1991). "Adverse reactions to co-trimoxazole in HIV infection." *Lancet* **338**(8764): 431-433.
- Vanhove, M., G. Guillaume, et al. (1997). "Kinetic and thermodynamic consequences of the removal of the Cys-77-Cys-123 disulphide bond for the folding of TEM-1 beta-lactamase." *Biochem J* **321** (Pt 2): 413-417.
- Velayudham, L. S. and G. C. Farrell (2003). "Drug-induced cholestasis." *Expert Opin Drug Saf* **2**(3): 287-304.
- Vuppalanchi, R., R. Gotur, et al. "Relationship Between Characteristics of Medications and Drug-Induced Liver Disease Phenotype and Outcome." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **12**(9): 1550-1555.
- Watkins, P. B., N. Kaplowitz, et al. (2006). "Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: a randomized controlled trial." *JAMA* **296**(1): 87-93.
- Waxman, D. J. and M. G. Holloway (2009). "Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes." *Mol Pharmacol* **76**(2): 215-228.
- Weber, L. W., M. Boll, et al. (2003). "Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model." *Crit Rev Toxicol* **33**(2): 105-136.
- Wu, C. Y. and L. Z. Benet (2005). "Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system." *Pharm Res* **22**(1): 11-23.
- Yokoi, T. (2010). "Troglitazone." *Handb Exp Pharmacol*(196): 419-435.
- Zhang, J., U. Doshi, et al. (2016). "Evaluation of multiple mechanism-based toxicity endpoints in primary cultured human hepatocytes for the identification of drugs with clinical hepatotoxicity: Results from 152 marketed drugs with known liver injury profiles." *Chem Biol Interact* **255**: 3-11.
- Zimmerman, H. J. and K. G. Ishak (1982). "Valproate-induced hepatic injury: analyses of 23 fatal cases." *Hepatology* **2**(5): 591-597.
- Zimmerman, H. J. and W. C. Maddrey (1995). "Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure." *Hepatology* **22**(3): 767-773.

DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY. FACULTY OF MEDICINE
UNIVERSITY OF MALAGA

MÁLAGA BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE
(IBIMA)

Analysis of drug properties, host factors and their interaction in the development of drug- induced liver injury

Doctoral project

Andres Gonzalez Jimenez
16/01/2017

Current study has been developed mainly in Department of Pharmacology in University of Malaga. This study have been supported by grants from "Instituto de Salud Carlos III" cofounded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional – FEDER "Una manera de hacer Europa" (contract number: PI15/01440) and "Plan Propio" University of Malaga.



INDEX

FIGURE INDEX.....	I
TABLE INDEX.....	ii
ABBREVIATIONS.....	III
FUNDING SUPPORT INFORMATION.....	V
INTERNATIONAL COLLABORATION.....	V
QUALITY INDICATORS.....	VI
SUMMARY.....	VII

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION.....	1
2. MECHANISM OF HEPATIC TOXICITY.....	1
3. HEPATOTOXICITY CHARACTERIZATION.....	2
3.1 Diagnostic criteria in DILI.....	3
3.2 Causality.....	4
3.3 Type of liver injury in DILI.....	4
3.4 Severity of DILI.....	6
4. DRUG PROPERTIES.....	7
4.1 Daily dose.....	8
5. PHARMACOKINETIC PROPERTIES.....	8
5.1 Solubility.....	8
5.2 Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System.....	9
5.3 Half-life.....	9
5.4 Lipophilia.....	10
5.5 Plasma protein binding.....	11
5.6 Formation of reactive metabolites.....	11

5.7	Enterohepatic circulation	12
6.	PHARMACODYNAMIC PROPERTIES	12
6.1	Inhibition of BSEP	12
7.	HOST FACTORS	13
7.1	Age	13
7.2	Sex	14
7.3	Lifestyle	14
7.4	Concomitant medications	15
7.5	Underlying diseases	15
7.6	Individual variability (Genetic variability)	16
8.	HYPOTHESIS	17
9.	AIMS	17

MATERIALS AND METHODS

10.	MATERIALS AND METHODS	19
10.1	Study design	19
10.2	Sample population	20
10.3	Working methodology Spanish DILI registry	20
10.4	Population (Spanish DILI registry)	22
11.	STUDY PARAMETERS	23
11.1	Demographic and clinical parameters	23
11.2	Type of liver injury	23
11.3	Delayed onset of the symptoms in the hepatic injury	24
11.4	Severity	24
11.5	Symptomatology	24
11.6	Underlying diseases	26
11.7	Drug properties	28
	Physicochemical properties	29
	Pharmacokinetic properties	32

Pharmacodynamic properties	33
12. ETHICAL CONSIDERATIONS	34
13. STATISTICAL METHODS	35

RESULTS

14. RESULTS	40
15. REGULATION FACTORS IN THE TYPE OF LIVER INJURY IN DILI	40
15.1 Demographic and clinical characteristics	40
15.2 Associated diseases	45
15.3 Drug properties and their relation to the type of liver injury	46
15.4 Concomitant medication	48
15.5 Multivariate analysis (nominal logistic regression)	49
15.6 Interaction host factor – drug property	51
16. MODULATING FACTORS IN THE PRESENTATION OF DELAYED ONSET IN DILI	54
16.1 Demographic and clinical characteristics	55
16.2 Associated diseases	57
16.3 Drug properties and their relation with delayed onset	58
16.4 Concomitant medication	60
17. CONTRIBUTING FACTORS IN THE SEVERITY OF LIVER INJURY IN DILI	64
17.1 Demographic and clinical characteristics	64
17.2 Associated diseases	67
17.3 Concomitant medication	67
17.4 Drug properties and their relation with severity	68
17.5 Multivariate analysis (nominal logistic regression)	69



DISCUSSION

18. DISCUSSION.....	70
18.1 Type of liver injury	71
18.2 Delayed onset in DILI	78
18.3 Severity in DILI	82

CONCLUSIONS

19. CONCLUSIONS.....	84
CONCLUSION 1: TYPES OF LIVER INJURY	84
CONCLUSION 2: DELAYED INITIATION OF SYMPTOMS.....	85
CONCLUSION 3: SEVERITY OF LIVER DAMAGE	85

FIGURE INDEX

Figure 1	Experimental equation to evaluate the LogP.	10
Figure 2	Distribution of the medical center members of the Spanish DILI registry.	19
Figure 3	Detailed process of collecting information from patients and biological samples by the Spanish DILI registry.	21
Figure 4	Changes in molecular recognition based on chain length.	31
Figure 5	R-script for the evaluation of the interaction of host factors and drug properties (II)	38
Figure 6	R-script for the evaluation of the interaction of host factors and drug properties.	39
Figure 7	Distribution of bilirubin metabolism disorders based on the type of liver injury.	43
Figure 8	Distribution of skin disorders based on the type of liver injury.	43
Figure 9	Distribution of manifestation of constitutional syndrome based on the type of liver injury.	44
Figure 10	Distribution of blood count disorders based on the type of liver injury.	44
Figure 11	Distribution of associated diseases based on the type of liver injury.	45
Figure 12	Ingestion of concomitant medication for patients according to their type of liver injury.	49
Figure 13	ROC curve for the consensus model with interactions.	51
Figure 14	Distribution of cholestatic and hepatocellular cases according to age and hepatic metabolism.	53
Figure 15	Distribution of cholestatic and hepatocellular cases according to age and enterohepatic circulation.	53
Figure 16	ROC curve for regression model in which have been included three independent predictors (Absence of associated diseases, daily dose $\geq 200\text{mg}$, hepatic metabolism $< 50\%$).	62
Figure 17	Normal quantile plots of 1000 observations drawn from a normal (right) distribution	62
Figure 18	Frequency of bilirubin disorder based on severity.	67
Figure 19	Distribution of hematological disorder based on severity.	68

TABLE INDEX

Table 1	Demographic characteristics based on type of liver injury.	41
Table 2	Clinical information in DILI cases based on type of liver injury	42
Table 3	Drug properties based on types of liver injury.	47
Table 4	Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties based on types of liver injury.	48
Table 5	Predictor factor of hepatocellular injury calculated by nominal logistic regression.	50
Table 6	Changes in relative risk of hepatocellular damage due to interaction of host-factor drug properties.	52
Table 7	Demographics and clinical characteristics of 204 Spanish DILI patients who intake drug with delayed onset potential classified by presence of delayed onset of symptoms and 209 patient who intake drug without potential.	56
Table 8	Diseases of 204 Spanish DILI patients who intake drug with delayed onset potential classified by presence of delayed onset of symptoms and 209 patient who intake drug without delayed onset potential.	57
Table 9	Physicochemical drug properties associated with delayed onset potential on DILI.	59
Table 10	Concomitant drug treatment of 204 Spanish DILI patients who intake drug with delayed onset potential classified by presence of delayed onset of symptoms and 209 patient who intake drug without delayed onset potential.	60
Table 11	Predictor model for delayed onset occurrence based on independent drug properties and host factors.	61
Table 12	Host factors modifying effects of drug properties on the likelihood of manifesting delayed onset in drug-induced liver injury.	63
Table 13	Demographic characteristics based on severity of liver injury.	65
Table 14	Clinical information in DILI cases based on severity of liver injury.	65
Table 15	Physicochemical properties of the drug associated with severity in DILI	68
Table 16	Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties associated with severity.	69

ABBREVIATIONS

95% CI	95% Confidence interval
AC	Amoxicillin-clavulanate
ADR	Adverse drug reaction.
HS	High severity (study criteria)
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (Spanish Medicine Agency)
ALF	Acute liver failure
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
AMA	Anti-mitochondrial antibodies
ASMA	anti-smooth muscle antibodies
ANA	anti-nuclear antibodies
AUC	<u>A</u> rea <u>U</u> nder the <u>C</u> urve
BDDCS	Biopharmaceutics drug disposition classification system
LS	Low severity (study criteria)
BMI	Body mass index
BSEP	Bile Salt Export Pump
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Science
DILI	Drug-induced liver Injury
DILIN	U. S. drug-induced liver injury network
DO	Delayed onset of symptoms (study criteria)
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-s-transferase
HLA	Human leukocyte antigen
LADME	Liberation, absorption, distribution, metabolism and excretion.

LogP	Partition coefficient
LTKB	Liver toxicity knowledge base
NCTR	National Center for Toxicological Research
OXPHOS	oxidative phosphorylation
pH	Potential of hydrogen (coefficient of acidity)
PMCA	Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase
R	Ratio (ALT/ULN÷ALP/ULN)
ROC	Receiver operating characteristic
ROS	Reactive oxygen species
SOL	space occupying lesions
t_{1/2}	Half life
TBL	Total bilirubin
ULN	Upper limit of normal

FUNDING SUPPORT INFORMATION

The present study has been supported by grants of the” Instituto de Salud Carlos III” cofounded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional – FEDER “Una manera de hacer Europa” (contract number: PI15/01440) and “Plan Propio” University of Malaga.

INTERNATIONAL COLLABORATION

As part of the procedure for obtaining the international mention / European doctorate were carried out the following international collaboration:

- University of Arkansas for medical Sciences (UAMS), Little Rock, Arkansas, EEUU.
- Central Arkansas Veterans Healthcare System (VA), Little Rock, Arkansas, EEUU.
- National Center for Toxicological Research (NCTR), Jefferson, Arkansas, EEUU.

QUALITY INDICATORS

PUBLICATIONS

A. Gonzalez-Jimenez , K. McEuen, M. Chen M, S. Ayako, M.I. Lucena, C. Stephens, R.J. Andrade (2017). The influence of drug properties and host factors on delayed onset of symptoms in drug-induced liver injury. Clinical Pharmacology and Therapeutics (submitted)

CONFERENCES AND PUBLICATIONS

A Gonzalez-Jimenez, A. Suzuki, C Stephens, M Chen, I Medina-Caliz, M Robles-Diaz, E Montane, A Aldea, R.J Andrade, M.I Lucena (2015). "The influence of drug physicochemical properties on delayed onset in hepatotoxicity: an analysis of the cohort included in the Spanish DILI registry". **36th Congress of The Spanish Society of Pharmacology SEF**, Valencia, Spain. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 117 (Suppl 2) 40

M. Robles-Diaz, I. M.-C., A. Ruiz, J. Sanabria, C. Stephens, A. González-Jimenez, A. Ortega-Alonso, B. Garcia-Munoz, M. Garcia-Cortes, M. Romero-Gomez, G. Pelaez, H. Hallal, G. Soriano, E. Roman, S. Blanco, A. Castiella, E.M. Zapata, J.M. Navarro, M. Jimenez, J.M. Moreno-Planas, A. Aldea, F. Bessone, N. Hernandez, M. Arrese, M.I. Lucena, R.J. Andrade. (2015). "Influence of metabolic risk factors in hepatotoxicity (DILI) phenotype and outcome". **The International Liver Congress™ 2015 EASL**. Amsterdam , Netherlands. Journal of Hepatology 62 (Suppl 2) S761–S762

Andres Gonzalez-Jimenez, A. Suzuki, C. Stephens, Miniun Chen, I. Medina-Caliz, Mercedes Robles Diaz., Martin Prieto, German Soriana, Eva Montane, A Aldea, Raul J. Andrade , M. I. Lucena (2015). "The influence of drug properties and host factors on delayed onset in hepatotoxicity: An analysis of the cohort included in the Spanish DILI Registry". **The Liver Meeting 2015® AASLD**. San Francisco, USA. Hepatology 62 (Suppl 1) 504A-505A

A. Gonzalez-Jimenez, M. C., K. McEuen, C. Stephens, I. Medina-Caliz, M. Robles-diaz, M. Slim, M.I. Lucena, A. Suzuki, and R. Andrade. (2017). "Influence of host characteristics and pharmacological properties on type of liver injury in hepatotoxicity". **The International Liver Congress™ 2017 EASL**. Vienna, Austria. Journal of Hepatology 66 (Suppl 1) S401-402

A. González-Jiménez, M. C., Kristin McEuen, Mercedes Robles-diaz, Inmaculada Medina-Caliz, Mahmoud Slim, Judith A. Sanabria, Camilla Stephens, Maria Isabel Lucena, Raul J. Andrade, Ayako Suzuki (2017). "Data mining for possible drug-host interplay in clinical phenotypes of drug-induced liver injury.". **Digestive Disease Week**, Chicago, USA. Gastroenterology 152 (Suppl 5) S1080-S1081

AWARDS

Award to the Best Communication titled "The influence of drug physicochemical properties on delayed onset in hepatotoxicity: an analysis of the cohort included in the Spanish DILI registry". Presented at the **36th Congress of the Spanish Society of Pharmacology SEF, Valencia 2015**

SUMMARY

INTRODUCTION

Drug-induced liver injury is an important concern in public health. In addition, it is one of the most common adverse events that cause lack of drug approval, drug withdrawals, and post-marketing regulatory decisions despite its low frequency in the general population. Nowadays, this adverse reaction is an important challenge during clinical phases in drug development. Hepatotoxicity is considered a multifactorial pathology dependent on host, drug and environmental aspects. This aspect combined with the wide range of clinical presentation associated with DILI, makes it difficult to characterize specific factors that play a role in DILI development. For this reason, the current study approach takes into consideration that both drug properties and host factors could modulate different features in DILI. Identifying specific parameters within these groups that could potentially have a modulatory role in DILI may help to understand the underlying mechanism(s) in DILI. In addition, the detection of such parameters could help prevent a fatal outcome for patients with this pathology. Based on previous observations, drug properties such as hepatic metabolism and lipophilicity may play an important role in delayed onset, liver injury pattern and DILI severity. Furthermore, these properties are likely to be modulated by host factors.

MATERIALS AND METHODS

A total of 870 DILI cases were evaluated, which were induced by a wide range of drugs and dietary supplements. In the present study, 701 cases were included, while 169 were excluded due to not meeting the study inclusion criteria. This cohort was used to evaluate host factors and pharmacological drug properties in search for those associated with the development of different features in DILI (type of liver injury, delayed onset and severity) using the same methodology for all three parts. Hence, only cases induced by conventional drugs were considered for this study.

Host factor information was retrieved from the Spanish DILI registry database. Drug property information was retrieved from the Liver Toxicity Knowledge Base (LTKB), a database developed by the National Center for Toxicological Research. Univariate analyses and nominal logistic regression were performed using the JMP (Cary, NC, USA) and R software to compare causative drug properties and host factors.

RESULT

Type of liver injury

Seven parameters were identified as predictors for different types of liver injury in DILI. The factors selected by the logistic regression as enhancers of the hepatocellular injury were as follows: age below 60 years (OR 2.06, confidence interval to 95 % (95%CI): 1.28-3.34, $p=0.0029$), previous allergic reactions to drugs (OR 2.69 [95% IC: 1.01-8.24], $p=0.0493$), culprit drug with enterohepatic circulation (OR 4.94 [95% IC: 2.34-11.45], $p=0.0001$), drugs with high hepatic metabolism, (OR 1.70 [95% IC: 1.02-2.84], $p=0.0417$), sp³/sp² hybridization ratio (<50%). Protective parameters were: intake of concomitant medication for treatment of cardiac diseases (OR 0.47 [95% IC: 0.29-0.77], $p=0.0030$) and increased number of heterorings in the drug molecule (OR 0.68 [95% IC: 0.52-0.88], $p=0.0270$). The ROC curve showed an AUC of 0.75863. A value between 0.75-0.90 indicates that the model has a good discrimination capacity.

In addition to the individual host factors and drug properties identified as liver injury predictors, several interactions between these factors also seem to play a role in the modulation of type of liver injury. Drugs with enterohepatic circulation increased the risk of hepatocellular type of injury in DILI patients with previous allergic reactions to drugs. In contrast, drugs with high hepatic metabolism decreased the risk of hepatocellular damage in patients with previous allergic drug reactions. Elevated number of heterorings was found to play a protective role in cases with previous allergic drug reaction. In addition, hybridization ratio was found to have a

contradictory effect and increased the risk of hepatocellular injury in patients with previous allergic reactions to drugs. Furthermore, age seems to play an important role in modulating type of liver injury. Low hepatic metabolism (<50%) or lack of enterohepatic circulation increased the frequency of cholestatic cases to approximately 50% in older patients.

Delayed onset

Three variables were found to increase the likelihood of delayed onset: absence of associated diseases (OR 1.91 [95% IC: 1.08-3.39], $p=0.0245$), culprit drug daily dose $\geq 200\text{mg}$ (OR 2.89 [95% CI: 1.25-7.58], $p=0.0123$) and hepatic metabolism <50% (OR 23.98 [95% CI: 10.84-63.68], $p=0.0001$). The calculated R^2 for this model was 0.3034 and the area under the ROC curve 0.8459. The interaction study resulted in four pairs of potential interactions that seem to have significant impacts on delayed onset. Three host factors, age (cut-off 60 years), gender, and pre-existing cardiac diseases, were identified as significant effect modifiers for drugs with mitochondrial liability. Pre-existing cardiac diseases were also identified as a significant effect modifier for drugs with high Pauling electronegativity.

Severity

Only concomitant use of anti-infectious drugs was found as a predictor for high severity. Consumption of anti-infective agents prior to or at the time of the episode doubled the risk of progressing to a highly severe outcome (OR 2.00, IC: 1.35-3.47, $p=0.008$). Due to the fact that a single predictor (concomitant use of anti-infectives) was found to explain the risk of severity, no further analyses of host factor – drug property interactions were performed.

CONCLUSIONS

CONCLUSION 1: TYPES OF LIVER INJURY

- a. Within the host factors, age is the determining factor of the phenotypic expression of the damage. Hepatocellular damage predominates in young patients, whereas patients aged ≥ 60 years present a higher frequency of cholestatic damage. In addition, the history of cardiovascular disease would condition a greater susceptibility to the development of cholestatic damage.

- b. The main drug properties that modulate the expression of toxic liver damage are liposolubility, degree of binding protein, extent of hepatic metabolism and presence of enterohepatic circulation. Hepatocellular damage would be determined by drugs that have higher lipophilicity, high plasma protein binding and significant hepatic metabolism. Alternatively, cholestatic damage would be related to drugs more soluble in water, with poor protein binding and poor hepatic metabolism.

- c. Other physicochemical characteristics identified as potential modulators of the damage are the presence of rings with heteroatoms in the chemical structure, the presence of sulfur atoms and / or the hybridization rate of orbitals.

- d. The interaction between host factors and drug properties suggests that advanced age and consumption of drugs with poor hepatic metabolism increase the risk of cholestatic damage in susceptible individuals. Contrary to expectations, in young patients the risk of developing hepatocellular damage does not change depending on the rate of hepatic metabolism.

CONCLUSION 2: DELAYED INITIATION OF SYMPTOMS

- a) Host factors that predominate in cases of hepatotoxicity with delayed onset of symptoms are a short duration of treatment and the absence of associated diseases.

- b) Drug properties in the same group are an average daily dose greater than 200 mg, a poor hepatic metabolism and a high excretion rate as a parental drug form.

- c) Results derived from the interaction between host factors and pharmacological properties suggest that the interaction of elderly patients and the administration of drugs with greater apolarity increase the risk of toxic damage with delayed onset of symptoms.

CONCLUSION 3: SEVERITY OF LIVER DAMAGE

- a) Drugs with high hepatic metabolism and a higher rate of metabolized drug excretion seem to contribute to the increase in severity. This observation could be related to the higher frequency of hepatocellular cases, which are associated with a greater severity of the damage.

- b) The presence of infectious diseases and / or the consumption of anti-infective comedication increase the risk of developing a more severe hepatic toxicity episode.

Finally, the identification of host factor-drug property interactions may provide insight into the underlying mechanisms responsible for the heterogeneity of clinical presentations in DILI. Furthermore, the generated hypotheses in the current study should be further explored in independent DILI cohorts.



1. INTRODUCTION

Drug-induced liver injury, also known as hepatotoxicity, is an important public health problem. In addition, it is one of the most common adverse events that cause lack of drug approval, drug withdrawals, and post-marketing regulatory decisions (Lucena, Andrade et al. 2009). Nowadays, this adverse reaction is an important challenge during clinical phases in drug development (Siramshetty, Nickel et al. 2016).

Nevertheless, DILI is still unknown to the majority of the population, due to its low frequency. The incidence of DILI is estimated to be between 3.4 and 19.9 per 100,000 inhabitants (Andrade, Lucena et al. 2005; Bjornsson, Bergmann et al. 2013). However, these values are probably underestimated, considering that many reactions go unnoticed because they can be asymptomatic. Another problem in DILI diagnosis is the lack of specific biomarkers and the wide range of clinical presentation associated with DILI. Hence, the phenotypic presentation of DILI resembles that of many other different hepatic conditions.

2. MECHANISM OF HEPATIC TOXICITY

Hepatotoxicity is a complex process and there are at least two type of hepatic damage. Intrinsic hepatotoxicity is dose dependent and can be predicted once a specific threshold concentration has been consumed, below the fatality threshold. The best examples of this type of DILI are acetaminophen (APAP) and acetylsalicylic acid overdose. Furthermore, some good animal models have significantly improved our understanding of the cellular impact of APAP DILI. On the contrary, idiosyncratic DILI has no direct relationship to dose and cannot be explained by the known pharmacological properties of the drug. In addition, this

toxicity is not reproducible in animal models. Although the mechanism of damage is still unclear, host factors, drug properties and environment factors are believed to be involved in their modulation. (Chen, Suzuki et al. 2015). Some studies point out that genetic factors may be the most important in susceptibility to DILI, especially when these factors affect the metabolic and detoxification process, as well as the repair of cell damage mechanism (Kaplowitz 2005; Han, Dara et al. 2013).

A special case of idiosyncratic DILI is autoimmune toxicity. The presentation of this toxicity is similar to idiosyncratic toxicity but also shows positive autoantibodies (anti-nuclear antibodies (ANA), anti-mitochondrial antibodies (AMA) and/or anti-smooth muscles (ASMA)). Some drugs are associated with this type of injury such as nitrofurantoin and minocycline. This toxicity may be more conditioned by genetic factors.

3. HEPATOTOXICITY CHARACTERIZATION

The definition of hepatotoxicity has been changing over time since the Council of International Organizations of Medical Scientists (CIOMS) elaborated the first definition (Benichou 1990). The most recent definition of DILI with updated information appeared in 2011. (Aithal, Watkins et al. 2011).

Based on these last criteria, clinically important DILI cases should meet at least one of the following criteria:

1. Hepatic biochemical alteration of alanine aminotransferase (ALT) more than five times the upper limit of normal (ULN).
2. Hepatic biochemical alteration of alkaline phosphatase (ALP) more than twice the ULN.
3. Hepatic biochemical alteration of ALT more than three the ULN and an increase of total bilirubin (TBL) more than twice the ULN.

3.1 Diagnostic criteria in DILI

DILI diagnosis is a difficult process, since the clinical presentation of DILI is similar to many other acute and chronic liver diseases. In addition, there are no biomarkers or specific tests to confirm the diagnosis. Therefore, DILI diagnosis is made by discarding other pathologies such as viral infections, biliary obstructions or alcoholic hepatitis (Benichou 1990). Evidences to establish the diagnosis are:

- Temporal relationship between exposure to medication and the appearance of symptoms of liver damage. This relationship can be difficult to establish because the adverse reaction can occur several weeks after the end of treatment. This delay in appearance of symptoms will be called “**delayed onset**” throughout this research.
- Temporal relationship between drug withdrawal and the decrease or disappearance of the symptoms and the reaction, although in a small percentage of the population the elevation can be maintained over time (Medina-Caliz, Robles-Diaz et al. 2016). Such cases are considered as chronic DILI cases. Certain drugs, such as isoniazid and statins, are known to sometimes produce DILI symptoms that disappear during continued therapy, a process referred to as adaptation (Andrade, Lucena et al. 2005; Livertox 2015).
- Exclusion of alternative causes that may cause liver damage, such as viral hepatitis A, B, C; systemic viral diseases, such as mononucleosis or herpes; bacterial hepatitis, hepatic ischemia; alcohol abuse; biliary obstructions and other causes, such as bile ducts or space occupying lesions (SOL) (Aithal, Watkins et al. 2011).

3.2 Causality

One of the most important issues in the diagnosis of hepatotoxicity is to establish a causal relationship between the case and the suspected drug. In clinical practice it is especially difficult to establish a clear relationship because patients often take different drugs at the same time which hinders the identification of the specific causative agent. For this reason, some researchers have developed different methods to assess the causality of hepatotoxicity.

Nowadays, the CIOMS scale, which was developed in 1989 (Danan and Benichou 1993) and the María y Victorino scale developed in 1997 (Maria and Victorino 1997) are the most used scales in the causality of hepatotoxicity. Although both scales have shown good results, the CIOMS scale has been defined as the most suitable for comparative studies (Lucena, Camargo et al. 2001).

The CIOMS scale involves a scoring system which categorizes the suspicion into "highly probable" (score > 8), "probable" (score 6-8), "possible" (score 3-5), "unlikely" (score 1-2) and "excluded" (score ≤ 0). However, this scale is less frequently used in clinical practice, where more emphasis is put on the presence or absence of specific clinical presentations associated with suspected causative agents.

3.3 Type of liver injury in DILI

Symptoms related to DILI have a wide range of clinical manifestations. There is no specific damage profile associated with DILI, however, three different types of injuries based on histological characteristics have been defined: hepatocellular, cholestatic and mixed type of liver injury. However, due to the infrequent performance of biopsies in DILI patients, the type of liver injury is normally determined based on biochemical parameters.

Hepatocellular damage is the most common type of injury in patients with DILI, and is characterized by a high ratio of hepatocyte death. **Cholestatic** damage causes toxicity by blocking bile flow, which increases the level of bile salt in the liver. In this lesion the level of cell death is lower than in the hepatocellular cases. The third type of injury, **mixed**, is a mixture of the two previous types of liver injury and has mixed characteristics.

The type of liver injury is based on the first identified elevations of liver chemistry that qualify as DILI (Aithal, Watkins et al. 2011). The type of liver injury is defined using the R value where $R = (ALT/ULN) / (ALP/ULN)$. This will require the measurement of ALT and ALP from the same serum sample. A recent study proposes the use of AST when ALT values are unavailable. (Robles-Diaz, Garcia-Cortes et al. 2015).

$$R = \frac{ALT (ULN)}{ALP (ULN)}$$

Based on biochemical values, the cases are defined as:

- **Hepatocellular**
The R ratio is greater or equal to 5. Or, on reaching the DILI criteria, the denominator is equal to or less than one.
- **Cholestatic**
The R ratio is less than or equal to 2. Or, when the DILI criteria are met, the numerator is equal to or less than one.
- **Mixed**
The R ratio is between 2 and 5.

3.4 Severity of DILI

Severity is one of the most interesting factors in the field of hepatotoxicity. The result of hepatotoxicity can vary, from spontaneous resolutions to acute liver failure (ALF) and even death. There is currently no indicator that can predict a worse outcome. The degree of elevation of liver enzyme levels alone does not reflect the severity of the liver injury since these values do not accurately predict specific clinical outcomes. Several scales are available to determine severity in hepatic pathologies such as Child-Pugh, King's College criteria for liver transplant, MELD or UKELD. However, none of these scales have predictive capacity and are merely limited to determine the current status of the patient.

In recent years, different scales have been proposed to determine severity in DILI. The best known model was developed in 2011 (Aithal, Watkins et al. 2011), however this scale has no predictive value since this model uses outcome parameters (coagulopathy, ascites) as criteria for classification.

In this scale there are **four** categories:

a) Mild

ALT or ALP values reaching criteria for DILI and TBL concentration $<2\times$ ULN.

b) Moderate

ALT or ALP values reaching criteria for DILI and TBL concentration $\geq 2\times$ ULN, or symptomatic hepatitis.

c) Severe

ALT or ALP values reaching criteria for DILI, TBL concentration $\geq 2 \times$ ULN, and one of the following:

- International normalized ratio ≥ 1.5 .
- Ascites and/or encephalopathy.
- Other organic failures due to DILI.

d) Fatal or liver transplantation

Death or liver transplantation due to hepatic injury.

4. DRUG PROPERTIES

Most drugs are small molecules that are taken as treatments for health problem or to avoid the disease symptoms or the disease itself (prophylaxis). Drugs, in their parental form or after their metabolization, are bioactive molecules, can interact with proteins or cell receptors that are in the membrane, cytoplasm or nucleus. The potential targets of these molecules depend on the chemical structure.

However, it is very difficult to analyze the relationship between chemical structure and adverse reactions because chemical structures are unique to each molecule, and small changes in their structure may change the function of the drug. Therefore, the use of drug properties is an adequate approach in the study of the relationship between chemical structures and adverse reactions.

In order to ease their study, the drug properties can be divided into two categories: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Pharmacokinetics properties explain the destination of substances administered to a living organism, that is, how the organism affects the drug. For this reason, pharmacokinetics properties are

influenced by factors related to the patient and by chemical properties of the drug. Generally, pharmacokinetic processes are subdivided into five phases known as **ADME** (absorption, distribution, metabolism and excretion). Pharmacodynamic properties explain the change in the body due to drug intake, that is, how the drug affects the organism. These effects include both desirable and undesirable aspect, as well as changes in the function of proteins and other biological elements.

4.1 Daily dose

Although idiosyncratic hepatotoxicity is not dose controlled, some studies suggest that the daily dose may play an important role in hepatotoxicity. Uetrecht first suggested that idiosyncratic DILI was rarely observed when the drugs were administered in daily doses of <10 mg (Uetrecht 1999). Lammert demonstrated that 77% of DILI cases from a Swedish hepatotoxicity database had a daily dose of more than 50 mg (Lammert, Einarsson et al. 2008). Similar results were found in the Island database, where 88% of DILI cases had a daily dose greater than or equal to 50 mg (Bjornsson, Bergmann et al. 2013).

5. PHARMACOKINETIC PROPERTIES

5.1 Solubility

In the chemical sciences, solubility is considered as the amount of substance that can be dissolved in a solvent, this solvent is usually water. The solubility in water is very important for drugs since the chemical reactions in the cell take place in water. This property can also modulate different pharmacokinetic parameters. There is a correlation between solubility and intestinal permeability (Amidon, Lennernas et al. 1995).

Wu and Benet have established the criteria for high and low solubility in 130 commonly used drugs (Wu and Benet 2005). High solubility is considered when the maximum market dose of a drug is dissolved in 250ml of water at pH 1-7.5 and 37°C. Using this criterion, Benet developed the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS) in 2011, which included 900 drugs (Benet, Broccatelli et al. 2011).

5.2 Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System

BDDCS is a classification system based on two factors, metabolism and solubility. In this classification the categories 1 and 3 are drugs with high solubility and the categories 2 and 4 are drugs with low solubility. The categories 1 and 2 involve drugs with a hepatic metabolism of more than 70% and the categories 3 and 4 involve low hepatic metabolism (<70%). These authors established a hepatic metabolism cut-off point at 70% based on their personal opinion (Wu and Benet 2005).

5.3 Half-life

The half-life of a drug is the time required for the body to reduce the pharmacological action of this drug in half. Generally, the half-life is related to the length of stay of drugs in plasma. Removal of the drug in plasma may be by direct elimination through the liver/kidney or translocation to other organs. Experimentally, the half-life is determined by consuming a single dose, usually intravenously, and measuring the concentration in the plasma at regular intervals.

5.4 Lipophilia

Lipophilia, also known as hydrophobicity, is an interesting property of the drug, as it is an essential factor in absorption, distribution and metabolic process. During the absorption process, the drug needs to cross the lipid bilayer in the intestine. If the drug has low lipophilic values, it will require the use of a transporter to cross the bilayer. On the other hand, if the drug is very lipophilic, it will be held back in the bilayer. The partition coefficient or LogP is used as a measure of lipophilicity. This value is the concentration ratio of a compound in a mixture of two immiscible phases in equilibrium (Fig. 1). Typically, one of the solvents is water while the second is a hydrophobic compound such as 1-octanol.

$$\text{Log P} \frac{\text{Non-polar Solvent}}{\text{Water}} = \text{Log P} \left(\frac{[\text{Solute}]_{\text{Non-polar}}}{[\text{Solute}]_{\text{Water}}} \right)$$

Figure 1. Experimental equation to evaluate the LogP.

Some previous studies have analysed the influence of lipophilicity on the development of DILI. Drugs with high daily doses (≥ 100 mg) and a $\text{LogP} \geq 3$ have been found to be associated with cases of high severity (Chen, Borlak et al. 2013). This observation called the “rule of two” shows that the combination of these different drug properties can predict a drug’s ability to induce severe DILI. The proposed mechanism to explain this observation was that absorption is increased when the drug is high lipophilic. The increase in drug concentration of hepatocytes could subsequently increase the amount of reactive metabolites (RMs). At high RMs levels, cellular protection mechanisms would be overcome, and RMs could potentially interact with different elements in the cell, such as the mitochondrial membrane, and cause cell damage (Kaplowitz 2013; Chen, Suzuki et al. 2015).

5.5 Plasma protein binding

During transport through the bloodstream, drugs bind to plasma proteins, such as albumin or lipoproteins. However, in order to perform their function the drugs need to be released from these binding proteins. In addition, only free drugs are able to undergo metabolic and excretion processes. The level of plasma protein binding influence a drug's concentration in the body and subsequently its half-life.

5.6 Formation of reactive metabolites

RMs can be covalently linked to proteins to form drug-protein adducts that can trigger immune-mediated reactions or exert direct toxicity (Pessayre, Fromenty et al. 2012; Faulkner, Meng et al. 2014). Some studies suggest that the formation of RMs play a role in the pathogenesis of idiosyncratic DILI (Knowles, Uetrecht et al. 2000). However, for a particular drug, there is no clear correlation between the potential to form RMs under experimental conditions and the actual incidence of hepatotoxicity in humans (Park, Lavery et al. 2011). In another study, Obach et al. measured the formation of RMs in vitro and found that metabolism-dependent covalent attachment to liver microsomes cannot distinguish hepatotoxic and non-hepatotoxic drugs (Obach, Kalgutkar et al. 2008). The presence of a particular chemical structure can render a drug more hepatotoxic. For instance, ebrotidine, an antiulcer drug pharmacologically related to famotidine, carries a bromobenzene ring that undergoes metabolic activation to reactive epoxides (Stepan, Walker et al. 2011). Likewise, temafloxacin and trovafloxacin share a single difluorinated side chain that does not occur in other quinolones with much lower hepatotoxicity potential (Lucena, Andrade et al. 2000).

5.7 Enterohepatic circulation

Enterohepatic circulation is a physiological process of bile salt. The function of this process is to recycle bile salt, favor the absorption of nutrients in the intestine, and modulate the lipid metabolism in the body. During the digestion of fatty foods the lipid emulsion is necessary to allow absorption into the small intestine. Bile acids play a critical role in lipid uptake by promoting this emulsification process. Triglyceride and bile salt enter the enterocyte by simple diffusion through the plasma membrane. The lipids are then transported from the enterocyte to the blood. In the liver, the bile salts are rescued and sent to the gallbladder where they are stored until the next digestion. This round of bile salts between the liver and the small intestine is called enterohepatic circulation (Chiang 2009). Some drugs can be transported to the liver by this mechanism.

6. PHARMACODYNAMIC PROPERTIES

6.1 Inhibition of BSEP

The bile salt export pump (BSEP) is a hepatobiliary transporter, and along with other transporters, is responsible for biliary excretion of several organic compounds including bile acids. Altered BSEP functions can lead to accumulation of cytotoxic bile acids in hepatocytes and subsequently increased oxidative stress and/or apoptosis and necrosis by FAS-mediated pathways (Pauli-Magnus and Meier 2006). Drugs and/or metabolites are capable of inhibiting BSEP activity. This has been demonstrated in an *in vitro* study using membrane vesicles harvested from BSEP-transfected insect cells to assess the ability of more than 200 drugs to interfere with BSEP function, a property that could potentially be related to liver injury. (Morgan, Trauner et al. 2010).

7. HOST FACTORS

Both the nature of DILI and the low frequency of DILI in the exposed population seem to indicate that hepatotoxicity is strongly influenced by patient characteristics, in particular genetic variations. It is currently unknown, however, which and how host factors contribute to DILI development. Previous studies have found associations between host factors and changes in DILI presentations. The following are the main identified host factors potentially related the modification of DILI phenotypes.

7.1 Age

Age is probably the most studied host factor in DILI as it may influence drug exposure and pharmacokinetic properties. Older patients suffer from decreased renal function, hepatic metabolism due to lost activity of cytochrome and reduction of conjugation reactions (Mitchell and Hilmer 2010). All of the above points to an increased risk of DILI with age, although the population of DILI patients analysed to date does not corroborate a higher prevalence of DILI in the elderly. Thus, in the Spanish DILI registry, 46% of patients had more or equal to 60 years, whereas in the U. S. network for DILI studies (DILIN), only 18,5% of patients were 65 years or older at the time of the DILI episode (Chalasani, Fontana et al. 2008; Lucena, Andrade et al. 2009).

Although age does not increase risk in DILI, some studies have found that age can modulate the manifestation of the reaction. One of these studies has determined that hepatocellular damage is predominant in young patients with DILI, whereas cholestatic/mixed damage is more frequent in elderly patients (Andrade, Lucena et

al. 2005). In addition, the severity of the reaction appears to increase in specific age groups. A study has determined that the risk of death from valproic acid intake is greater in children younger than 2 years and lower in patients over 10 years of age (Dreifuss, Santilli et al. 1987). Some drugs appear to have more potential for toxicity in specific age groups, for example, isoniazid is more common in elderly patients. A retrospective study of 3377 adults treated with isoniazid, has demonstrated that the risk of DIIL increases two times in patients between 35 and 49 years, and five times in patients over 50 years compared to patients younger than 35 years (Fountain, Tolley et al. 2005).

7.2 Sex

Gender, sex hormones, growth hormones and pregnancy influence enzyme levels in the body and change the rate of drug metabolism (Waxman and Holloway 2009). For example, cytochrome P450 (CYP) 3A4, is one of the most important enzymes in the metabolism of erythromycin or lidocaine, and is 24% more active in women than in men (Hunt, Westerkam et al. 1992). On the other hand, men have a higher clearance rate of acetaminophen due to increased hepatic glucuronidation compared with women.

7.3 Lifestyle

Lifestyle, toxic habits and diet are important factors that can modify the behavior of the drug in the body. For instance, azithromycin absorption decreases by approximately 50% when drugs are ingested with food (Singlas 1995). Similarly, alcohol consumption and high fat diets are inducers of CYP2E1 and CYP4, so the increase in CYP2E1 level due to alcohol intake has been associated with increased risk of hepatic injury induced by acetaminophen (Seeff, Cuccherini et al.

1986). On the other hand, malnutrition decreases xenobiotic elimination and causes a slower elimination of drugs from the body.

7.4 Concomitant medications

Concomitant medication, also known as comedication, has been a well-studied factor in toxicity due to potential negative interaction between drugs. These negative interactions may be direct by potentiating or inhibiting the effects of drugs, or indirect through changes in enzymatic activity related to the metabolism of other drugs. For example, a population case-control study showed that the combination of two or more drugs with hepatotoxic potential increased the risk of hepatotoxicity by a factor of 6 (de Abajo, Montero et al. 2004). In addition, pyrazinamide increases the toxic effect of isoniazid (Durand, Pessayre et al. 1995), while habitual consumption of anticonvulsants increases the risk of hepatotoxic induced by valproic acid (Schmid, Freudenmann et al. 2013). Concomitant medications also seem to play a role in severity. A database study has established a relation between concomitant medications for stimulation of sympathetic nervous system and fatality (Suzuki, Yuen et al. 2009).

7.5 Underlying diseases

Although the presence of underlying diseases, also known as associated diseases, have not been linked to an overall increase in DILI, some diseases appear to increase the risk of hepatotoxicity of specific drugs. Patients with human immunodeficiency virus infections and acquired immunodeficiency syndrome (HIV/AIDS) are more susceptible to hepatotoxicity by trimethoprim-sulfamethoxazole or sulfonamides (van der Ven, Koopmans et al. 1991). Similarly, patients with rheumatic arthritis have a higher risk of hepatotoxicity caused by acetylsalicylic acid, and patients with inflammatory bowel diseases are at a higher

risk for DILI induced by salazopyrine (Teoh, Leclercq et al. 2003). Other examples are methotrexate DILI in alcoholic hepatitis patients, antiretroviral treatment in patients coinfecting with HIV and viral hepatitis B, as well as rifampicin DILI in primary biliary cirrhosis patients (Andrade, Lucena et al. 2002). Finally, hepatotoxicity can be more severe in patients with significant liver diseases and decreased hepatic function (Schenker, Martin et al. 1999).

7.6 Individual variability (Genetic variability)

There is large individual variability in the expression and activity of metabolic enzymes. Other factors such as age, gender and nutrition can influence the effect of such genetic variations and further increase the variability between individuals. A previous study determined that genetic polymorphisms in genes corresponding to metabolic enzymes are responsible for 15-25% of variations in therapeutic effect of a drug (Ingelman-Sundberg and Rodriguez-Antona 2005). Similarly, the difference in efficacy of antituberculosis drugs has been related to genetic variants in *NAT2*, *GSTM1* y *GSTT1* (Roy, Chowdhury et al. 2001). Based on previous observations, a recent study has postulated that enzymatic and transporter polymorphisms in metabolic enzymes may be one of the major contributing factors to the risk of DILI in an individual (Urban, Daly et al. 2014).

8. HYPOTHESIS

The hypothesis in this study is that both drug properties and host factors could modulate different features in DILI. Identifying specific parameters within these groups that could potentially have a modulatory role in DILI may help to understand the underlying mechanism(s) in DILI. In addition, the detection of such parameters could help prevent a fatal outcome for patients with this pathology. Based on previous observations, drug properties such as hepatic metabolism and lipophilicity may play an important role in delayed onset, liver injury pattern and DILI severity. Furthermore, these properties are likely to be modulated by host factors.

9. AIMS

- a) **To analyze the specific characteristics of type of liver injury. To study how drug properties, host factors and their interactions could modulate DILI features.**
 - I. To establish clinical, demographic and biochemical differences classified by type of liver injury
 - II. To analyze the symptomatology and outcome in DILI cases classified by type of liver injury
 - III. To determine drug properties of causative agents and analyze their association with type of liver injury
 - IV. To analyze interactions between drug properties and host factors and their role in the development of a specific DILI injury pattern

b) To analyze the possible influence of drug properties, host factors and their interactions in delayed onset of symptoms.

- I. To establish clinical, demographic and biochemical differences associated with delayed onset of symptoms
- II. To determine whether host factors such as age, sex and health status can determine the presence of delayed onset of symptoms
- III. To determine drug properties of causative agents and analyze their association with delayed onset
- IV. To analyze interactions between drug properties and host factors and their role in the presence of delayed onset of symptoms

c) To analyze the possible influence of drug properties, host factors and their interactions in DILI severity.

- I. To establish clinical, demographic and biochemical differences classified by severity
- II. To determine drug properties of causative agents and analyze their association with severity
- III. To analyze interactions between drug properties and host factors and their role in DILI severity

10. MATERIALS AND METHODS

10.1 Study design

This is a retrospective and prospective study on the role of drug properties and host factors in the clinical presentation of DILI. This study was performed using a large cohort of patients from the Spanish DILI registry.

The Spanish DILI registry was created in 1994 by Dr. Raúl J Andrade of the Hepatology Unit of the University Hospital of Malaga and Dr. María Isabel Lucena of the Clinical Pharmacology Service of this same hospital. More than 50 centers throughout Spain have participated in the Spanish DILI registry and sent potential DILI cases for evaluation, since the initiation in 1994. (Fig. 2)



Figure 2. Distribution of the medical center members of the Spanish DILI registry. Each blue point shows at least one collaborative center.

10.2 Sample population

This study has evaluated all patients enrolled in the Spanish DILI registry from July 1994 to July 2014. A total of 870 DILI cases were evaluated, which were induced by a wide range of drugs and dietary supplements. In the present study, 701 cases were included, while 169 were excluded due to not meeting the study inclusion criteria. As the diagnostic frequency of DILI is low, the current study cohort size provides a good representation of DILI.

10.3 Working methodology Spanish DILI registry

After the detection of a possible DILI case, the patient is subjected to a detailed survey carried out by the physician in charge of the case. The information is used for the elaboration of an exhaustive clinical history. Data recorded also include information on surgery and blood transfusions in the last six months prior to the DILI onset, self-medications and existence of toxic habits such as drug addiction, alcohol intake and smoking. After the survey, the physician evaluates the possibility of DILI. If DILI suspicions are founded, the physician will complete a standard protocol form designed by the Spanish DILI registry. In the Spanish DILI registry, this form will be evaluated by three experts, who will consider the chronological sequence between drug intake and adverse reaction, the plausibility of the reaction in relation to the suspected drug and the exclusion of alternative causes. If the diagnosis finally confirms the plausibility of DILI, the case will be included in the Spanish DILI registry database (Fig. 3). The standard protocol form contains questions about adverse reactions. The information in this form is presented schematically for a quick evaluation. The standard form sections are:

- a) Demographic and personal information. It includes age, sex and body mass index (BMI).
- b) Temporal relationship between withdrawal of the drug and the outcome of liver injury.
- c) Symptomatology of the reaction. It includes all the symptoms presented prior to the detection of biochemical liver profile alterations.
- d) Signs of hypersensitivity or allergic features such as rash, eosinophilia, lymphopenia and fever.
- e) Serological and biochemical findings for the evaluation of alternative liver injury causes.
- f) List of drugs consumed before and during the reaction. This list will contain detailed information on consumption dates and doses.
- g) Relevant clinical information. This section includes information on previous adverse reactions or underlying diseases.
- h) Image test results and other information to exclude the existence of anomalies in SOLs or other hepatic pathologies.
- i) Biochemical values during the complete DILI episode and, if possible, baseline values before the onset of DILI.
- j) Outcome of the reaction.

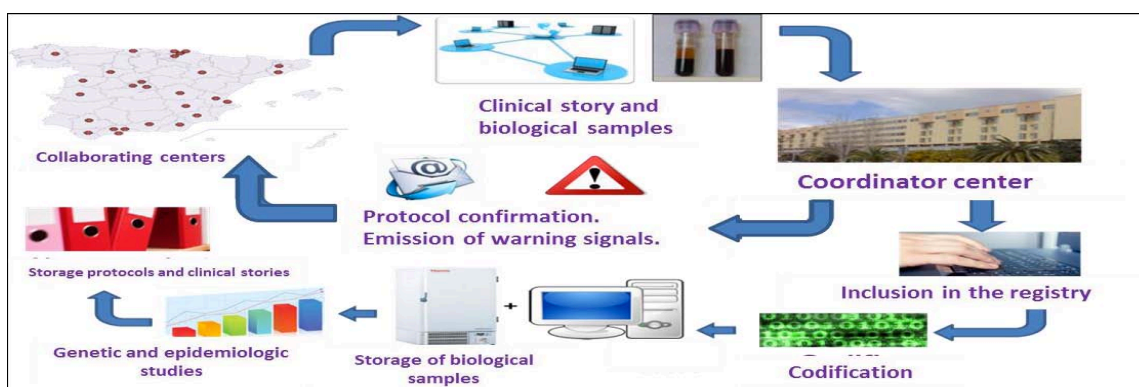


Figure 3: Detailed process of collecting information from patients and biological samples by the Spanish DILI registry.

10.4 Population (Spanish DILI registry)

- a) **Inclusion criteria:** An episode that meets the respective DILI biochemical criteria at the time of inclusion (Benichou 1990; Aithal, Watkins et al. 2011) and which causal evaluation has been favorable.
- b) **Exclusion criteria:** Cases that meet the above criteria are excluded when they also meet one of the following criteria: the presence of underlying or concomitant liver diseases when these diseases could be responsible for the adverse reaction (AR). These diseases include viral infections, alcoholic, metabolic, autoimmune and thyroid diseases, AIDS, chronic viral hepatitis B or C and Wilson disease.
- c) **Specific exclusion criteria for the present study:** Based on the nature of this study, a few additional cases have been excluded. The criteria for excluded cases are as follows:
- I. Hepatic injury due to herbal products or dietary supplements
 - II. Hepatic injury induced by illegal drugs (cocaine, ecstasy)
 - III. Hepatic injury induced by biological products, such as enzymes, antibodies or hybrid proteins (e.g. infliximab, asparaginase) (hormones are not included in this category)
 - IV. Re-exposure episodes where the patient develops DILI a second time due to re-exposure to the same active ingredient
 - V. DILI cases induced by two potential causative agents, and it is impossible to establish a single culprit
 - VI. Intrinsic DILI cases

- d) **Age requirements:** The current study has no specific age requirements, but includes patients of all ages. However, the number of pediatric units included in the Spanish DILI registry is very limited. Hence, most patients included were adults (>18 years) at the time of the DILI episode. In the present study, only 15 patients were under 18 years of age. The age of the total population ranges from 10 to 90 years.

11. STUDY PARAMETERS

11.1 Demographic and clinical parameters

In 2011, a group of experts set the baseline for assessing hepatic injury by drugs. The hepatic lesion should meet the following biochemical criteria:

- ALT ≥ 5 x ULN
- ALP ≥ 2 x ULN
- ALT ≥ 3 x ULN and TBL ≥ 2 x ULN

11.2 Type of liver injury

Cases that met the previous DILI criteria were classified according to their different injury patterns, based on the R value calculated using ALT and ALP values in the first blood test available after DILI detection.

- e) Hepatocellular damage: $R \geq 5$
- f) Cholestatic damage: $R \leq 2$
- g) Mixed damage: $2 < R < 5$

11.3 Delayed onset of the symptoms in the hepatic injury

One of the most important issues in the evaluation of hepatotoxicity is to determine the date of onset. Hepatotoxicity may occur any time between several hours after the start of treatment and weeks after treatment cessation. In the current study, delayed onset has been defined as the onset of symptoms more than 24 hours after the last drug intake.

11.4 Severity

The degree of elevation of enzyme levels may not by itself reflect the severity of the liver injury since these values do not accurately predict specific clinical outcomes. The severity of DILI is classified into four categories: mild, moderate, severe and fatal/transplant. These four categories are based on biochemical criteria and the development of specific reactions such as encephalopathy, ascites, and a decrease in prothrombin activity below 50%, hepatic failure and death or liver transplantation .

11.5 Symptomatology

In the present study, the symptoms have been analysed both individually and grouped. For this analysis the symptoms have been grouped into 7 categories based on the process. These categories are as follows:

- a) **Constitutional syndrome:** It refers to a group of symptoms formed by fatigue, anorexia and involuntary weight loss (Suarez-Ortega, Puente-Fernandez et al. 2013). These manifestations can accompany many different diseases.

- b) **Gastrointestinal disorders:** In this category, symptoms related to the digestive system such as nausea, vomiting, abdominal pain and dyspepsia are grouped together. Dyspepsia is a discomfort in the upper abdomen or stomach during or after eating. It can be characterized by a feeling of warmth, burning or pain in the area between the navel and the lower part of the sternum.
- c) **Bilirubin metabolism disorders:** In this category are grouped jaundice, dark urine and pale stools. Bilirubin is a yellow bile pigment that appears in the normal catabolic pathway of the heme-group in the liver. This pigment is stored in the gallbladder for use in the digestion of fats.
- d) **Skin disorders:** The skin disorders most frequently associated with hepatotoxicity are skin rash, pruritus and Stevens-Johnson syndrome. Rash is a change in the skin that affects its color, appearance, or texture. Pruritus is a sensation that causes the desire to scratch. Stevens–Johnson syndrome is a form of epidermal necrolysis. It is believed that this syndrome is a complex of hypersensitivity that affects the skin and the mucous membranes.
- e) **Nephritic disorders:** In this category are grouped renal problems such as edema, oliguria and polyuria, unspecific renal problems indicted by low glomerular filtration.
- f) **Changes in blood count:** Blood count changes have been measured according to the following criteria:
- I. **Leucopenia** is defined as the number of leukocytes in blood below $4 \times 10^3/\text{mm}^2$.

- II. **Lymphopenia** is considered when the lymphocyte counting is less than 20% or less than $1.5 \times 10^3/\text{mm}^2$.
- III. **Plaquetopenia or thrombocytopenia** is defined as platelet levels below $100 \times 10^3/\text{mm}^2$.
- IV. **Lymphocytosis** is considered when the lymphocyte population increase is above 40% or a count greater than $4.5 \times 10^3/\text{mm}^2$.
- V. **Eosinophilia** is considered when the increase in eosinophils is greater than 4% of total leukocytes or a count greater than $500/\text{mm}^2$.

11.6 Underlying diseases

In the sub analysis of underlying diseases and associated diseases, different diseases of the patient have been studied. The underlying diseases have been analysed in individual categories and have been grouped into organs.

A total of 18 categories have been created:

- a) **Cardiac diseases:** arrhythmias, atrioventricular block, endocarditis, atrial fibrillation, myocardial infarction (MI), Wolf-Parkinson-White syndrome and tachycardia.
- b) **Skin diseases:** cutaneous abscesses, pilonidal abscesses, atopic dermatitis, erythema, melanoma, psoriasis, urticarial or vitiligo.
- c) **Nervous system diseases:** transient ischemic attack, convulsions, dementia, epilepsy, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cranial arteriovenous malformation, meningioma, neuralgias, tremors, paraparesis and brain trauma.

- d) **Gastrointestinal diseases:** colon or gastric cancer, lymphocytic colitis, celiac disease, Crohn's disease, esophagitis, perianal fistula, gastritis, upper gastrointestinal hemorrhage, inguinal herniorrhaphy, pancreatitis, colon polyps, gastroesophageal reflux and irritable bowel syndrome.
- e) **Genitourinary diseases:** prostate or bladder cancer, nephritic colic, urethral duplicity, benign prostatic hypertrophy, nephrectomy, pyelonephritis and prostatectomy.
- f) **Gynecological diseases:** amenorrhea, endometriosis, breast fibroadenoma, fibrocystic mastopathy, uterine myoma, oophorectomy, endometrial polyp, menstrual disorders and breast tumor.
- g) **Hepatic diseases:** bile duct stones, primary biliary cirrhosis, liver cirrhosis, pregnancy cholestasis, fatty liver degeneration, alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis, autoimmune hepatitis and Gilbert's syndrome.
- h) **Infectious diseases:** brucellosis, candidiasis, HIV/AIDS infection, parasitosis, syphilis, cerebral toxoplasmosis and pulmonary or extrapulmonary tuberculosis
- i) **Musculoskeletal diseases:** bilateral calcana bursitis, cervicalgia, dupuytren, disc herniation, meniscus intervention, lumbago, generalized primary osteoarthritis, osteoporosis, tendonitis, and soft tissue sarcoma.
- j) **Ophthalmological diseases:** cataracts, conjunctivitis, dacryocystitis, retinal detachment, glaucoma, xerophthalmia, diabetic retinopathy and uveitis.
- k) **Respiratory, thoracic and mediastinal diseases:** asthma, bronchitis, dyspnea, chronic obstructive pulmonary disease, hemoptysis, pulmonary emphysema, pulmonary fibrosis, pulmonary hypertension, pneumonia, obstructive sleep apnea syndrome.

- l) **Vascular or circulatory diseases:** aneurysm, peripheral vascular disease, Raynaud's disease, essential hypertension, venous insufficiency, post-thrombotic syndrome, deep venous thrombosis.
- m) **Autoimmune or rheumatologic disorders:** arteritis, connective disease, Still's disease, scleroderma, ankylosing spondylitis, lupus, myasthenia gravis, other seropositive rheumatoid arthritis, polyarthritis, and Sjögren's syndrome.
- n) **Endocrine disorders:** goiter, diabetes mellitus, Graves-Basedow disease, hyperthyroidism, and hypothyroidism.
- o) **Hematological, immune and lymphatic system disorders:** pernicious anemia, von Willebrand disease, variable common immunodeficiency, chronic lymphocytic leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, thrombocytopenia, sarcoidosis, myelodysplastic syndrome.
- p) **Metabolic disorders:** alpha-1 antitrypsin deficiency, protein caloric malnutrition, mixed dyslipidemia, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hyperuricemia, tofacea disease, obesity, iron metabolism disorders.
- q) **Psychiatric disorders:** alcoholism, bulimia nervosa, schizophrenia, adaptive disorder, bipolar disorder and depressive disorders.

11.7 Drug properties

The chemical structure of the drug determines its function and properties. Drug properties are generally grouped into pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Pharmacokinetic properties describe how the body affects drugs, while pharmacodynamic properties explain how the drug affects the organism. The current study focuses on both physicochemical and pharmacokinetic properties.

Most of the information on drug properties comes from the Liver Toxicity Knowledge Base (LTKB) designed by National Toxicology Research Center. This

database contains information on the properties of drugs marketed in the United States. Information has also been obtained from bibliographic reviews, summary product characteristics of AEMPS (Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios, Spanish medicines agency), specific books (Burch 2008), and other specific databases (LiverTox, Toxnet and others).

Physicochemical properties

a) Rings, aromatic rings and heterorings

The number of rings in the molecule is an important property because it determines both the volume and the three-dimensional configuration. There are two types of rings: **aromatic rings**, which have a structure similar to that of phenyl, with alternations between double and the single bonds, and **normal rings** which do not have a cyclic structure. Rings may also be single or fused together. The ring index is the ratio between the number of aromatic and total rings, a value that can range from 0 to 1. Organic rings usually only have carbon atoms in their structures, however, some rings have different elements instead of some of these carbon atoms. These substituents are named **heteroatoms** and the corresponding rings are named **heterorings**. In the present study, special attention has been given to heterorings constituted by sulfur and halogen atoms. Organic molecules are usually made up of carbon, hydrogen and oxygen, however, some molecules, especially drugs, have other atoms in their structures. The presence of **sulfur** atoms can alter molecular reactivity because this atom can establish disulfide bonds with other molecules. **Halogen** atoms can oxidize other molecules due to high electronegativities.

a) Pauling electronegativity

Electronegativity is the tendency of an atom to attract electrons or oxidize compounds. The electronegativity scale used in the current study has been that of Linus Pauling, which is the most commonly scale to evaluate electronegativity of molecules (Hong, Xie et al. 2008). In the current study **high electronegativity** was defined as a mean electronegativity value of all atoms in a compound ≥ 1.016 .

b) Molecular topological distance (MTDI)

MTDI is a measure of a chemical structure, using the graph theory. Its function is to analyze the structure through mathematical approach. The values in MTDI are used for the identification of properties and the search for new molecules. There are different indices to calculate these values (Balaban, Beteringhe et al. 2007; Hosoya 2007). In the current study, the PaDEL software was used to calculate MTDI values. (Yap 2011).

c) Topological polar surface (TPSA)

TPSA is defined as the surface sum of all polar atoms. These atoms are mainly oxygen and nitrogen. TPSA is used in medical studies to predict lipid bilayer permeability by drugs.

d) McGowan's volume

McGowan's volume is a measure of the three-dimensional structure of the molecule. This index is used in biochemical research because the volume conditions the transport mechanism in the intestine and the blood-brain barrier.

e) Platts free energy

During the binding mechanism, the molecules undergo different alterations in their free energies due to the stabilization and dissolution of hydrogen bonds in the molecule. The Platts free energy scale is used to determine the free energy of the individual drugs, as this leads to changes in binding potential.

f) Hybridization ratio.

The phenomenon of mixing different orbitals (p or s) with the same energy level of an atom to produce equal number of hybrid-orbitals with the same energy and identical properties is known as **hybridization**.

There are three types of hybrid-orbitals: **sp orbitals** (orbitals are arranged at an angle of 180°), **sp² orbitals** (orbitals are arranged at an angle of 120° between them) and **sp³ orbitals** (orbitals are arranged in tetrahedral form).

Hybrid-orbitals may change between them under specific circumstances. In biochemical research these structures are important because sp³ orbitals establish simple bonds and sp² orbitals establish double bonds. In the current study, the ratio between the number of sp³ and sp² orbitals has been referred to as **hybridation ratio**.

g) Chain length and aliphatic chain length

The length of atom chains are markers of molecular size. The aliphatic chain is constituted by three types of atoms: carbon, hydrogen and oxygen, whereas the normal chain may be formed by other atoms. These properties participate in cell recognition and permeability.

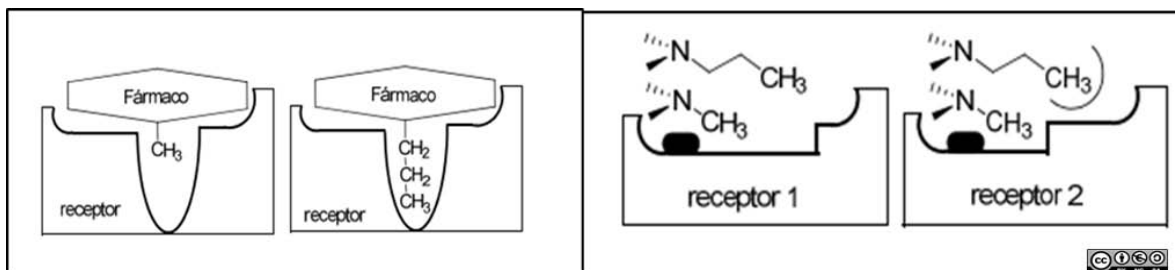


Figure 4. Changes in molecular recognition based on chain length. Source: Daniel Collado Martín. Design and synthesis of active biorganic compounds. Department of Chemistry. Málaga University.

Pharmacokinetic properties

a) Lipophilicity

Lipophilicity is defined as the octanol-water partition coefficient (LogP). Lipophilicity is one of the most important pharmacokinetic properties since LogP determines the ability to cross lipid bilayers and the degree of retention in tissues.

b) Lipoaffinity

Lipoaffinity is a measure based on molecular lipophilicity. Lipoaffinity is used to assess the ability to cross the blood-brain barrier since lipophilicity is not well related to this event (Liu, Sun et al. 2001).

c) Solubility

Solubility is the ability of the drug to be dissolved in water. Drugs are classified as having high or low solubility. Solubility is determined as the degree of dissolution of the highest commercialized dose of a specific drug in 250 mL of water at 37°C and a pH in the range 1–7.5.

d) Biopharmaceutical drug disposition classification system (BDDCS)

BDDCS is the classification of drugs according to their solubility and hepatic metabolism. Four categories are established:

- class 1 (high solubility and high hepatic metabolism)
- class 2 (low solubility and high hepatic metabolism)
- class 3 (high solubility and low hepatic metabolism)
- class 4 (low solubility and low hepatic metabolism)

e) Reactive metabolites

Some drugs produce RMs during drug metabolism. These molecules are chemical structures that can interact with different cellular compounds and subsequently disrupt normal cell functions (Stepan, Walker et al. 2011). For example, troglitazone has a ring structure than can be converted into an o-quinone structure. O-quinones have a high electronegativity and can alter the cell's redox potential, decreasing the GSH/GSSG ratio and increasing the NAD(P)+/NAD(P)H ratio, causing cell death (Bolton, Trush et al. 2000; Yokoi 2010).

f) Enterohepatic circulation

Drug excretion can occur in different ways: biliary, renal o mixed (Burch 2008). If drug excretion is produced by biliary excretion, the drugs can be recycled at the intestinal level and establish an **enterohepatic circulation**.

Pharmacodynamic properties

a) BSEP inhibition

BSEP, also known as ABCB11, is a canalicular hepatic bile salts transporter. Many drugs have the ability to inhibit the activity of this transporter *in vitro*. However, the drug concentration required for this inhibition often exceeds maximum recommended drug doses. BSEP inhibition is generally stated as a drug's IC₅₀ value, the drug dose required to inhibit 50% of BSEP activity. Drugs with BSEP IC₅₀ <300 µM were considered BSEP inhibitors in the current study (Warner, Chen et al. 2012).

12. ETHICAL CONSIDERATIONS

The present study has been approved by the Research Ethics Committee. Patients selected to be included were informed of the study objectives and gave written consent to participate. All patients were informed about their right to withdraw from the study at any time. Both the registry and the current study have respected the data protection law (organic law 15/1999, of 13 December, on the protection of personal data). Patient anonymity has been maintained during the study.

13. STATISTICAL METHODS

In the current study, a threshold of $p=0.05$ were established for statistical significance. To perform the analysis in the current study, the following techniques and statistical tools were used:

Descriptive statistics techniques: The statistical measurements used in the current study include distribution of frequencies and percentages for qualitative variables, statistics of central tendencies, dispersion and position for quantitative variables.

Statistical inference techniques: Statistical inferences are measurements to deduct properties of an underlying distribution through data analysis. The data were analysed using contingency tables and different statistical tests based on the type of variable.

- a) **Chi-squared test (χ^2)** is used to determine if there is a significant difference between expected frequencies and frequencies observed in one or more categories. If the calculated value is higher than the one established for the significance level, the null hypothesis is rejected. Fisher exact test has been used when necessary.
- b) **T-student test** is used for comparative studies of quantitative variables between two groups.
- c) **Pearson correlation coefficient** is a measure of linear dependency (correlation) between two quantitative variables. It has a value between +1

and -1 , inclusive, where 1 is the total positive linear correlation, 0 is no linear correlation, and -1 is the total negative linear correlation. Usually, the values 0.5 and -0.5 are the minimum thresholds to consider a relationship.

- d) **Analysis of variance (ANOVA)** is a collection of statistical models and methods used to analyze differences between the mean of groups. ANOVAs are useful for comparing three or more groups for statistical significance. It is one of the most commonly used tests, but is very restrictive test that needs to meet normality and homoscedasticity requirements. The Kolmogorov-Smirnov test was used for the evaluation of normality and the Levene test for homoscedasticity.

- e) **Mann-Withney or Kruskal Wallis** are both non-parametric tests. Being non-parametric tests, they do not assume normality of the data, as opposed to traditional ANOVA. The difference between these two tests is that the Mann-Whitney test is used to analyze two groups and the Kruskal-Wallis test for three or more groups.

- f) **Logistic regression models** measures the relationship between a categorical dependent variable and one or more independent variables by estimating probabilities, using a logistic function. The logistic model provides an equation used to evaluate the probability of a specific event based on predictor variables. This model also allows relative risk calculations for the event of each predictor (odds ratio, OR).

The logistic regression model has been subsequently evaluated using the Hosmer-Lemeshow test and receiver operating characteristic (ROC) curves. The **Hosmer-Lemeshow test** is a goodness of fit for logistic regression models. This test evaluates the distance between what is observed and what is expected under the model data. Hence, it evaluates if the proposed model can explain the observed values, or on the contrary, the population behaves differently to the predicted model.

The **ROC** curve is a graphical representation of sensitivity and specificity when the discrimination threshold changes. The optimal point of the model is calculated using the insertion point of the ROC curve with the discrimination line. This point establishes a better sensitivity and specificity of relationships. On the other hand, the area under the curve (AUC) is a parameter to evaluate the goodness of the model, which will take values between 1 (perfect test) and <0.5 (useless test). AUC is normally interpreted as the probability that the test will correctly classify a pair of individuals (Hanley and McNeil 1982). For example, 0.75 would be equivalent to a 75% probability of ranking correctly.

The interaction between host factors and drug properties were assessed through multiple logistic regression models using R-script (Fig. 6). Subsequently, each possible pair of interactions was validated individually excluding those unbalanced (one of the parameter was lower than 10% of the population). The objective of this validation was to eliminate false positives due to the existence of large differences between the populations analysed. The interactions resulting from this process were considered as potential interactions. These interactions were then validated individually. These analyses were performed using the statistical software JMP 10 by SAS.

```
#####
#Clear environment, set working directory, install/load packages
#####

rm(list = ls()) #Clear environment

#setwd( "C:/Users/.../")

needInstall = FALSE

if(needInstall == TRUE){
  install.packages("reshape2")
  install.packages("plyr")
}

rm(needInstall)
install.packages(ggplot2)
#Load packages
library(reshape2)
library(plyr)

library(aod)
library(ggplot2)
library(Rcpp)
#####
# PREPARE DATA, SET CORE VARIABLES HERE:
#####

#Load data
#mydata <- read.csv("C:/", stringsAsFactors=TRUE)
mydata <- read.csv("C:/", na.strings="")

colnames(mydata) #see where HF end and DP begin and var names

#These variables will be in every equation
core_vars <- sort(c("HF_Underlyingdiseases", "DG_DD200mg", "DG_NO_metabolizada"))

#remove rownames?
mydata <- mydata[-1]

sum(complete.cases(mydata))

#CHANGE HF TO COLUMN # WHERE HOST FACTORS BEGIN AND END
HF <- c(1:62)
host_factors <- sort(colnames(mydata[HF]))

#CHANGE HF TO COLUMN # WHERE DRUG PROPERTIES BEGIN AND END
DP <- c(63:(ncol(mydata)-5))
drug_properties <- sort(colnames(mydata[DP]))

#Rename endpoint to make code more generic (REPLACE DILI)
names(mydata)[names(mydata)=="Delayed"] <- "y"

#remove variables that contain all the same value
#i <- apply(mydata, 2, function(x) all(duplicated(na.omit(x))[-1L]))
#mydata <- mydata[-which(i==TRUE)]
#host_factors <- host_factors[-which(host_factors %in% names(i[i==TRUE]))]
#drug_properties <- drug_properties[-which(drug_properties %in% names(i[i==TRUE]))]

#Check that there are two levels for y variable and fix if not
#for three levels change 2 to 3
if(length(levels(mydata$y))>2){mydata$y <- droplevels(mydata$y)}
```

Figure 5. R-script for the evaluation of the interaction of host factors and drug properties

```
#####
#
#####

combo_names <- t(expand.grid(host_factors, drug_properties))
combo_names <- unname(combo_names)

names_est <- paste("V", 1:200, "_est", sep="")#names for coefficient estimates
names_pv <- paste("V", 1:200, "_pv", sep="")#names for p-value estimate
names_OR <- paste("V", 1:200, "_OR", sep="")#names for Odd's ratio
var_names <- paste("V", 1:200, sep="")#key

for(i in 1:ncol(combo_names)){

  #Logistic regression
  form <- as.formula(paste('y', '~', paste(core_vars, collapse = " + "), "+",
    paste(combo_names[i], collapse = " * ")))

  eq <- glm(form, data=mydata, family=binomial, na.action=na.exclude)

  coeff<-(summary(eq)$coefficients[1:(nrow(summary(eq)$coefficients)),c(1,4)])

  if(i%%25==0){
    print(paste("Calculating: ", i, "/", ncol(combo_names), " ", combo_names[1,i], " * ", combo_names[2,i], sep=""))
  }

  chisq_pvalue <- with(eq, pchisq(null.deviance - deviance, df.null - df.residual, lower.tail=FALSE)) #chi sq p_value for overall model significance

  temp <- data.frame(x=c(eq$aic, chisq_pvalue, as.vector(coeff), #coefficients and pvalues
    exp(na.omit(coef(eq))), #odds ratios
    row.names=c("AIC", "chisq_pvalue",
      "Intercept_est", names_est[1:(nrow(coeff)-1)], #names for coefficient estimates
      "Intercept_p-value", names_pv[1:(nrow(coeff)-1)], #names for p-value estimate
      "Intercept_OR", names_OR[1:(nrow(coeff)-1)]) #names for Odd's ratio

  key <- c(row.names(coeff)[2:nrow(coeff)])
  names(key) <- c(var_names[1:(nrow(coeff)-1)])

  temp <- data.frame(t(key), t(temp), stringsAsFactors = FALSE)

  if(i==1){
    results <- temp
  }else{
    results <- rbind.fill(results, temp)
  }

}

}

results <- results[sort(colnames(results))] # order results columns alphabetically

results <- results[order(results$chisq_pvalue,results$AIC)] #order rows so that smallest chi sq value, AIC is at the top

results$AIC <- round(results$AIC, digits=2)

View(results)

Write to file. Change filename/path
write.csv(results, "C:/")
```

Figure 6. R-script for the evaluation of the interaction of host factors and drug properties (II)

14. RESULTS

During the last 20 years, a significant number of cases of hepatotoxicity attributed to drugs, herbal and dietary products have been evaluated in the Spanish DILI registry. At the start of this study, 870 DILI cases had been included in the registry. For the three studies that have been carried out in the implementation of this project, 169 cases have been excluded because they do not meet the specific inclusion criteria.

15. REGULATION FACTORS IN THE TYPE OF LIVER INJURY IN DILI

Type of liver injury are classified as hepatocellular, cholestatic and mixed, based on the first elevations of liver chemistry identified and which make it eligible as DILI. The type of liver injury is an important element in DILI, as it may aid diagnosis and may provide information on the likely outcomes of patients (Fontana, Seeff et al. 2010). Although some drugs may induce a preferential type of injury, the reason behind the development of each pattern is still unclear. In the last year, some studies have suggested the role of some host factors in determining the type of injury (Chen, Borlak et al. 2016).

15.1 Demographic and clinical characteristics

In this study, 701 cases of the Spanish DILI Registry have been included. Cases have been classified according to the type of liver injury, and only hepatocellular

and cholestatic DILI cases were included in the following studies. All mixed cases were excluded. In total 429 hepatocellular and 124 cholestatic cases were analysed.

Demographic and clinical parameters showed differences between the two groups. Patients with hepatocellular cases were younger than cholestatic cases (53 vs 62 years, $p=0.0001$), and women were also more frequent in hepatocellular cases (53 vs 44%, $p=0.0511$) but this value was not significant (Table 1). These results are similar to those reported previously (Lucena, Andrade et al. 2009).

Table 1. Demographic characteristics based on type of liver injury.

	Hepatocellular (n=429)	Cholestatic (n=124)	<i>p-value</i>
Demographics parameters			
Age, mean (range)	53 (16-90)	62 (11-88)	0.0001
Women, n (%)	230 (53)	54 (44)	0.0511
BMI kg/m ² , (range)*	26 (17-41)	26 (17-38)	0.7290

Values have been calculated based on the number of patients with available information.

* The proportion of patients with information on this parameter was 62% for hepatocellular cases and 65% for cholestatic cases.

The clinical parameters of the lesion showed differences between hepatocellular and cholestatic cases. Hepatocellular cases had longer duration of treatment and time of onset than cholestatic cases (38 vs 16 days, $p=0.0004$ and 30 vs 20 days, $p=0.0010$, respectively). The daily dose was lower in hepatocellular cases (300 vs 600 mg, $p=0.0001$). Hepatocellular cases also had a lower proportion of alterations in the blood count (45% vs 66%, $p=0.0003$), mainly explained by a lower number of patients with lymphopenia (14% vs 27%, $p=0.0055$) and eosinophilia (17% vs 28%, $p=0.0080$) (Table 2).

A decrease was also observed in the number of cases with thrombocytopenia, although this decrease was not statistically significant (4% vs 9%, $p=0.0813$). Finally, the presence of positive autoantibody titres were not found to be different between the liver injury patterns.

Table 2. Clinical information in DILI cases based on the type of liver injury

Clinical parameters	Hepatocellular (n=429)	Cholestatic (n=124)	<i>p-value</i>
Duration of treatment, median d (range)	38 (1-2313)	16 (1-1826)	0.0007
Time to onset , median d (range)	30 (1-2313)	20 (1-1828)	0.0017
Daily doses, median mg (range)	300 (0.04-6000)	600 (0.15-6000)	0.0001
Jaundice, n (%)	268 (62)	92 (75)	0.0147
Rash, n (%)	22 (5)	9 (7)	0.3606
Eosinophilia, n (%)*	75 (17)	35 (28)	0.0080
Lymphopenia, n (%)**	64 (14)	34 (27)	0.0055
Auto-antibodies positive titles, n (%)	95 (22)	19 (15)	0.1922
• ANA	57 (18)	15 (17)	
• ASMA	35 (12)	8 (10)	
• AMA	10 (3)	-	
Known drugs previous allergic reaction	47 (11)	5 (4)	0.0203
Underlying diseases, n (%)	328 (76)	100 (81)	0.3069

Values have been calculated based on the number of patients with available information.

* The proportion of patients with information on this parameter was 81% of hepatocellular cases and 84% of cholestatic cases.

** The proportion of patients with information on this parameter was 78% of hepatocellular cases and 79% of cholestatic cases.

Symptomatic manifestations were different between the patterns of injury. Hepatocellular cases showed a lower alteration in bilirubin metabolism (65% vs 76%, $p=0.0213$), a lower frequency of jaundice (62% vs 75%, $p=0.0147$) and lower manifestation of pale stools (9% vs 19%, $p=0.0041$).

The presence of skin disorders was also lower in hepatocellular cases (18% vs 34%, $p=0.0001$), which explains the lower pruritus level (18% vs 33%, $p=0.0006$), since bilirubin deposited in the skin is responsible for pruritus. On the other hand, hepatocellular cases showed a higher frequency of constitutional syndrome (36% vs 20%, $p=0.0015$), especially higher frequency of fatigue symptom (33% vs 18%, $p=0.0007$) (Fig.7-10).

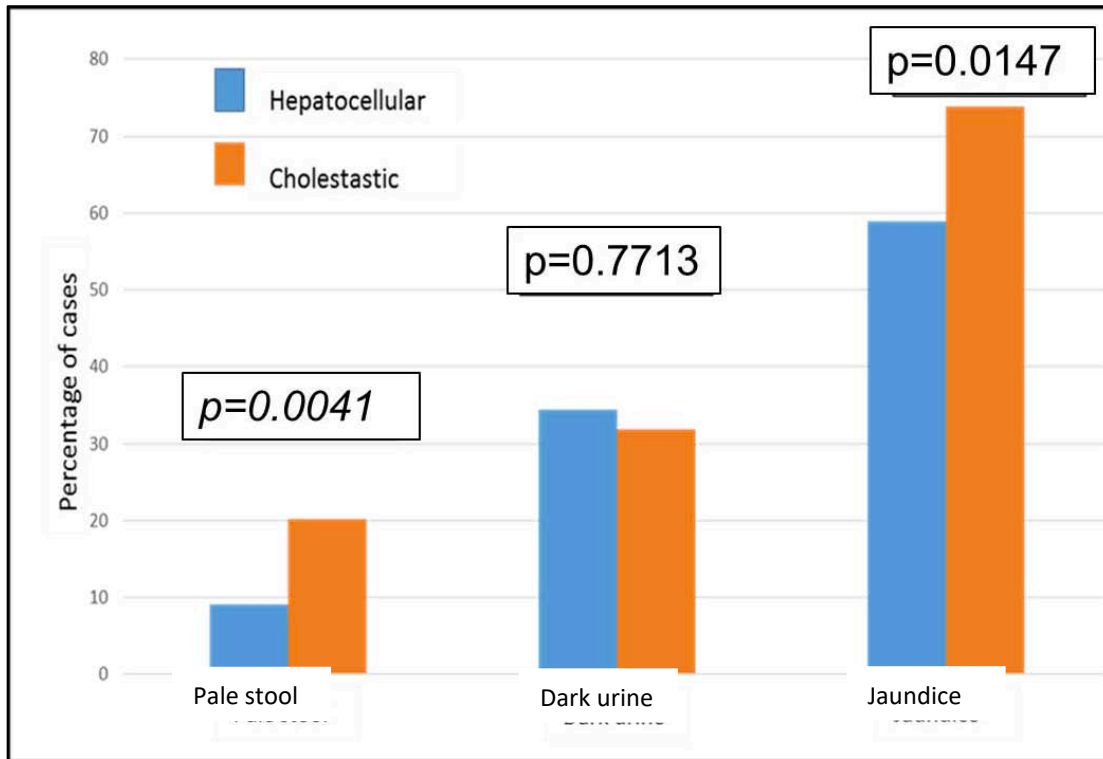


Figure 7. Distribution of bilirubin metabolism disorders classified by type of liver injury.

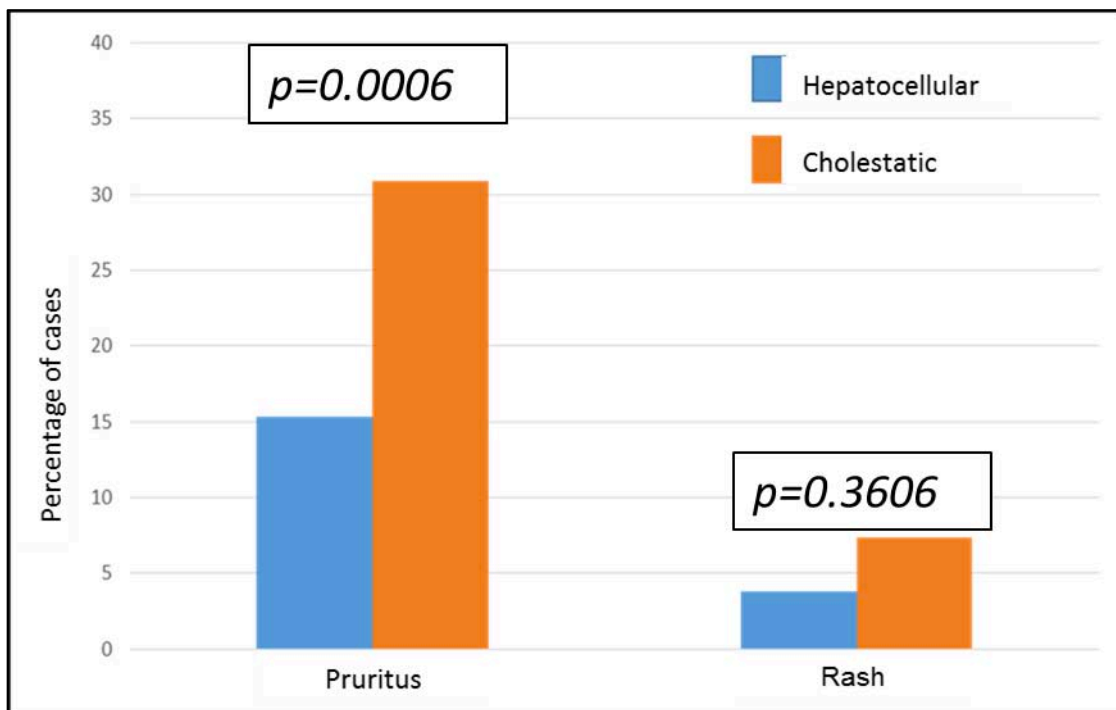


Figure 8. Distribution of skin disorders classified by type of liver injury.

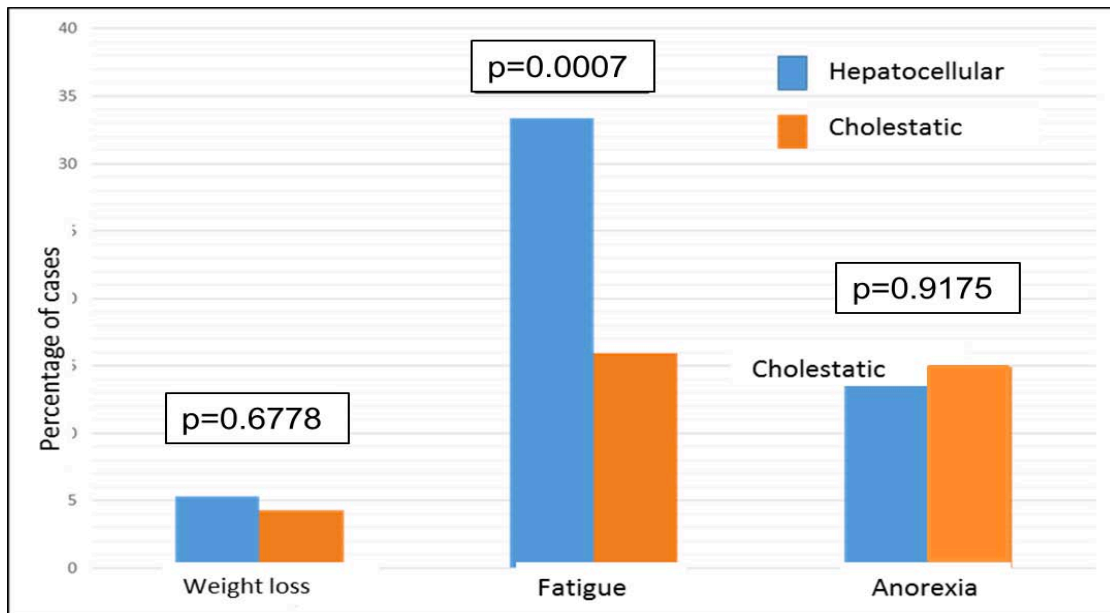


Figure 9. Distribution of manifestation of constitutional syndrome classified by type of liver injury.

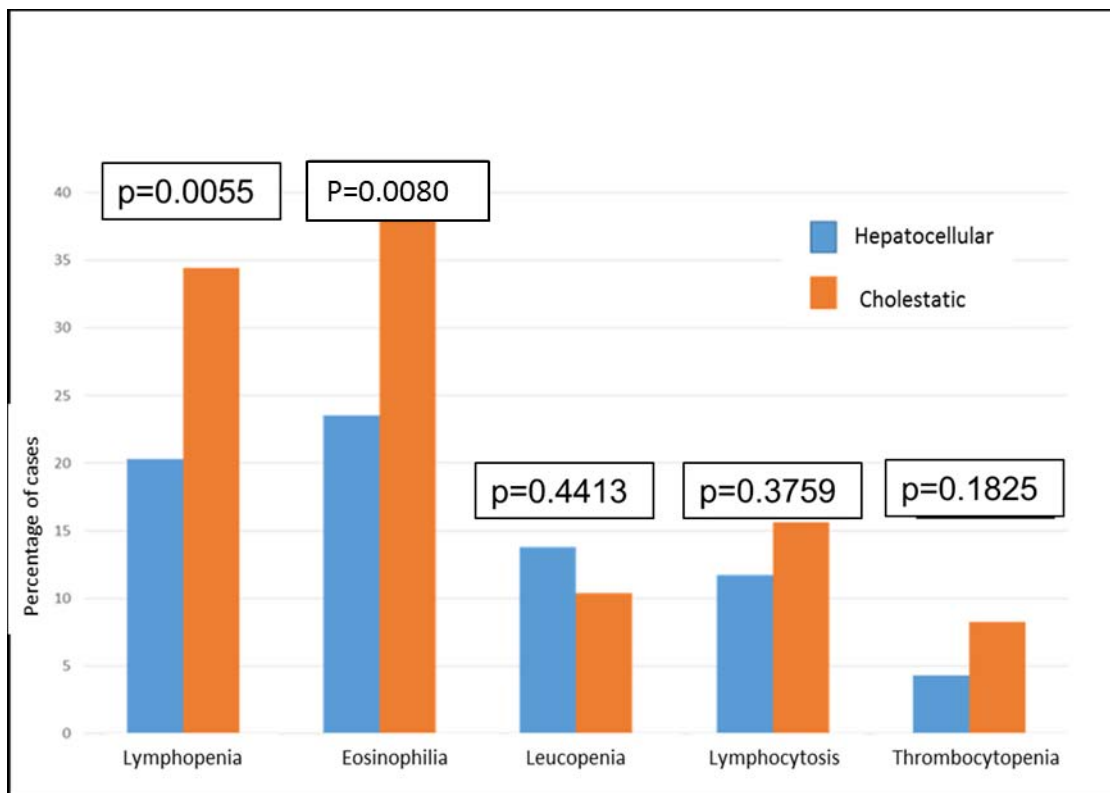


Figure 10. Distribution of blood count disorders classified by type of liver injury.

15.2 Associated diseases

The aim of this sub analysis was to identify relationships between previous associated diseases and type of liver injury. Both groups showed a similar frequency of underlying diseases. However, the types of underlying diseases were different. The cholestatic cases had a higher frequency of cardiac diseases (18% vs 8%, $p=0.0049$), vascular diseases (16% vs 32%, $p=0.0002$) and hypertension (17% vs 29%, $p=0.0138$). On the other hand, hepatocellular cases showed a higher frequency of autoimmune diseases, although this difference was not statistically significant ($p=0.0809$) (Fig. 11).

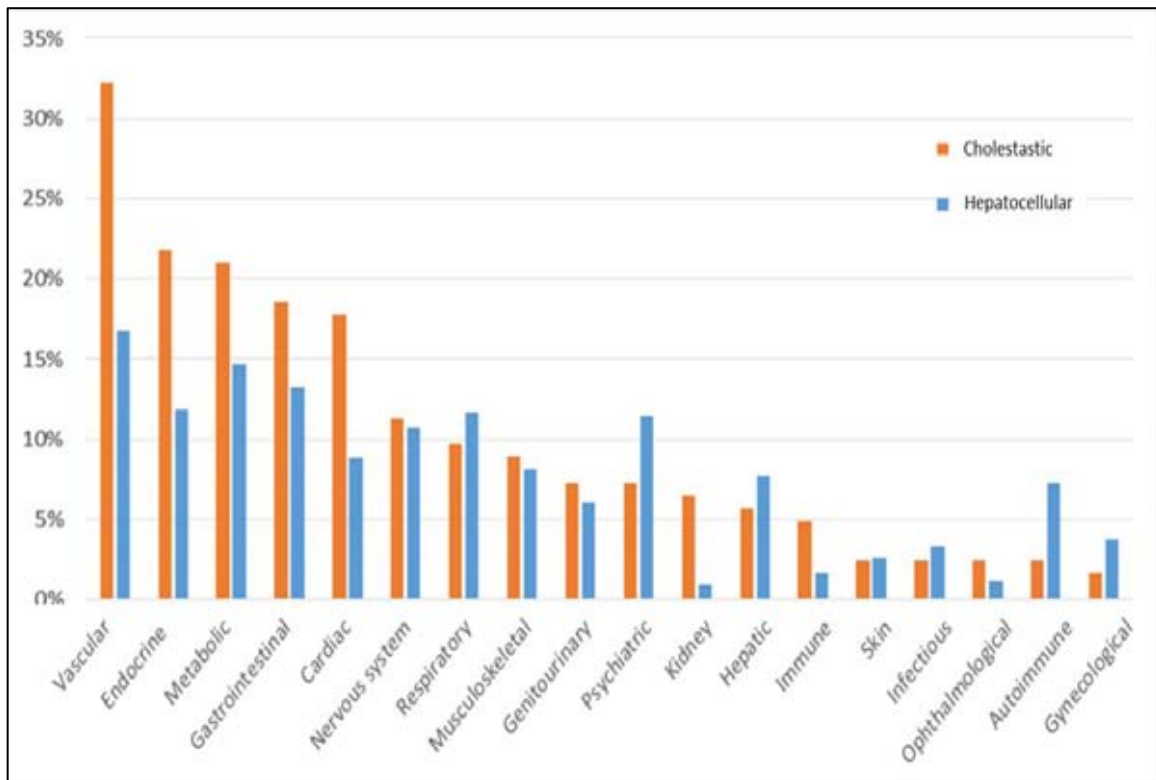


Figure 11. Distribution of associated diseases classified by type of liver injury.

15.3 Drug properties and their relation to the type of liver injury

In the present study, the analysis of drug properties has been divided into three categories: **physicochemical**, **pharmacodynamics** and **pharmacokinetics**. A total of 143 different drugs have been implicated as responsible for hepatocellular cases and 55 drugs for cholestatic cases. It should be noted that many of these drugs produced both types of injuries. Most of the medicines have been ingested orally. Alternative ways of administration have been observed in less than 5% of cases (Table 2).

a) Physicochemical properties

Some drug properties differed significantly between the pattern of liver injury groups. Drugs in hepatocellular cases showed a lower presence of sulfur atoms (40% vs 65%, $p=0.0001$), conversely these drugs showed a higher frequency of halogen molecules in their structures (36% vs 25%, $p=0.0190$). Drugs in hepatocellular cases showed a lower frequency of heterorings (1.21 vs 1.69, $p=0.0001$), that is, the number of rings was not different between the groups, although the ratio of aromatic/non-aromatic rings was. Drugs in hepatocellular cases had a higher proportion of aromatic rings versus non-aromatic rings (0.44 vs 0.35, $p=0.0067$). This result indicates that about 50% of the rings in the drugs responsible for the hepatocellular cases were aromatic.

b) Pharmacokinetics and pharmacodynamics properties

Several pharmacokinetics properties showed a specific profile for each type of liver injury. Drugs inducing hepatocellular cases had a longer half-life (4.5 vs 2.0 h, $p=0.0012$), a higher lipophilic value calculated by LogP (1.9 vs -0.3, $p=0.0001$) and high affinity for plasma protein binding (84% vs 22%, $p=0.0001$).

These drugs also differed with regards to metabolic parameters. The drugs associated with hepatocellular cases had predominantly hepatic metabolism, $\geq 50\%$ (73% vs 46%, $p=0.0001$), a higher frequency of enterohepatic circulation (31 vs 11%, $p=0.0012$) and subsequently lower frequency of low metabolism excretion. Hence, 23% of these drugs were excreted in parent form in the hepatocellular cases, while 49% of the drugs related to cholestatic cases were excreted as parent drugs ($p=0.0001$).

Similarly the drugs were grouped according to the BDDCS classification. Drugs responsible for hepatocellular cases predominated in group 1 and 2 (drug with high hepatic metabolism $>70\%$, regardless of solubility). In contrast, cholestatic drugs were more frequently found in group 3 ($p=0.0001$). No differences were found in the frequency of reactive metabolite production or mitochondrial liability.

Table 3. Drug properties based on types of liver injury.

Drug properties (Physicochemical)	Hepatocellular (n=437)	Cholestatic (n=126)	<i>p-value</i>
Molecular weight, median g/mol	337	365	0,1998
Number of rings, mean	2,51	2,79	0,0224
Number of aromatic rings, mean	1,10	0,90	0,0654
Index aromatic/total rings, mean	0,44	0,35	0,0067
Heterorings, mean	1,21	1,69	0,0001
Fused rings, mean	0,98	1,03	0,0013
Presence sulphur atom, n (%)	150 (40)	77 (65)	0,0001
Presence halogen atom, n (%)	137 (36)	29 (25)	0,0190
High electronegativity (Pauling scale), mean	0,99	0,99	0,8383
Volume McGowan, media (range)	2,46	2,52	0,3400
Free energy (Platts scale), mean	2,36	2,58	0,0067
Topological polar Surface, mean (range)	99 (1-321)	115 (3-287)	0,0078
Hybridation ratio, mean	0,36	0,42	0,0010
Length of chain, mean atoms	5,47	5,10	0,3397
Length of aliphatic chain, mean atoms	1,90	1,92	0,9401
Lipoaffinity, mean	4,10	2,09	0,0001

Values have been calculated based on the number of drugs with available information.

Table 4. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties based on types of liver injury.

Drug properties	Hepatocellular (n=437)	Cholestatic (n=126)	<i>p-value</i>
Pharmacokinetics			
Half-life, median h	4,5 (0,2-504)	2,0 (0,2-75)	0,0012
Lipophilia (LogP), median (range)	1,90 ((-6)-8,3)	-0,30 ((-2,5)-7,14)	0,0001
Plasma protein binding (%), median	84	22	0,0001
Hepatic metabolism \geq 50%, n (%)	295 (73)	56 (47)	0,0001
Low-metabolization excretion, n (%)	89 (23)	59 (49)	0,0001
Enterohepatic circulation, n (%)	117 (31)	13 (11)	0,0001
Reactive metabolite formation, n (%)	258 (66)	85 (71)	0,4135
Mitochondrial liability, n (%)	290 (76)	95 (80)	0,2920
BDDCS			
• 1	167 (41)	30 (25)	
• 2	134 (33)	24 (20)	0,0001
• 3	88 (22)	57 (47)	
• 4	16 (4)	9 (7)	
Pharmacodynamics			
BSEP IC ₅₀ , median μ M	581	608	0,5314
BSEP inhibitor, n (%)	162 (43)	41 (35)	0,1129

Values have been calculated based on the number of drugs with available information; BDDCS, Biopharmaceutical drug disposition classification system; BSEP, bile salt export pump.

15.4 Concomitant medication

The frequency of patients with concomitant medication and the number of concomitant medications did not differ between the pattern of liver injury groups. However, some specific groups of concomitant medication were predominant in one of the groups, for example concomitant drugs for treatment of heart and blood

diseases were more frequent in cholestatic cases ($p=0.0002$ y $p=0.0006$, respectively) (Fig. 12).

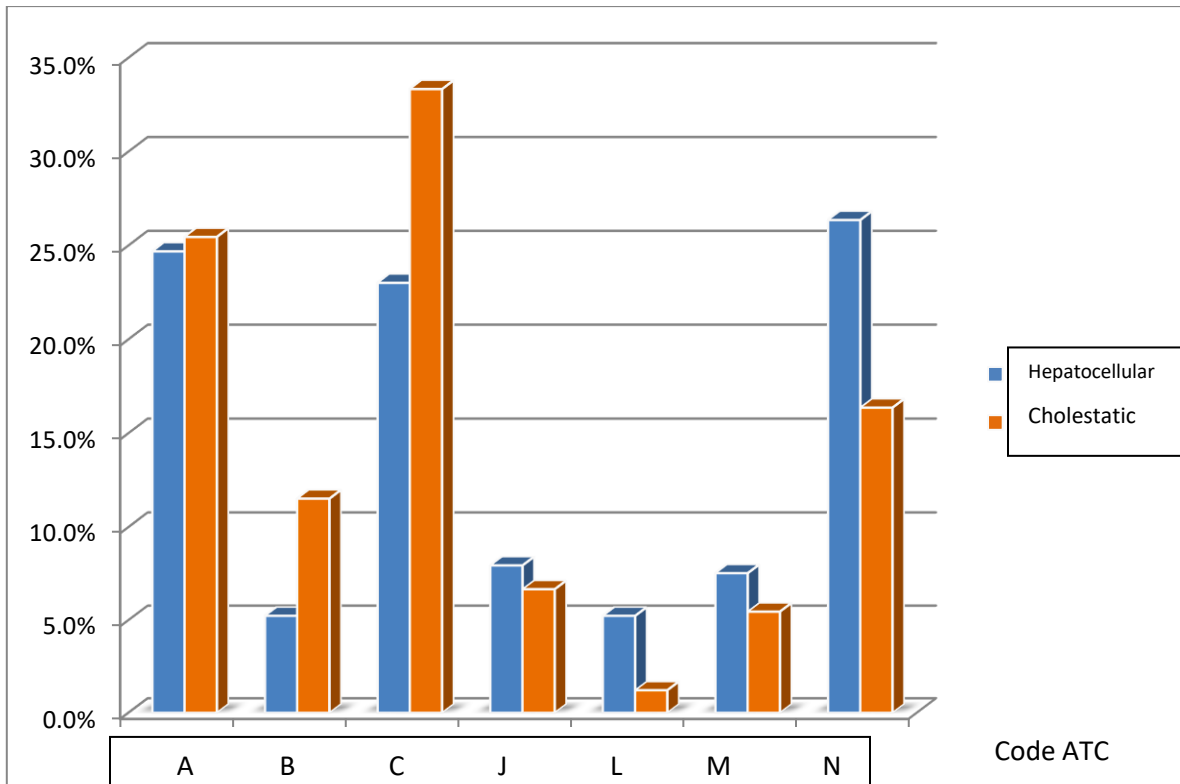


Figure 12. Concomitant medication used by DILI patients according to their type of liver injury. ATC code: A=Alimentary disorder, B= Blood alteration, C= Cardiovascular, J=Anti-infective, L=Antineoplastic, M=Muscle-skeletal system, N= Nervous system. Values have been calculated based on the number of patients with available information.

15.5 Multivariate analysis (nominal logistic regression)

This part of the study had as main goal to find the most outstanding parameters related to the modulation of the type of liver injury. These parameters could help to clarify the underlying mechanism in each type of injury. The factors selected by the logistic regression as enhancers of the hepatocellular injury were as follows: age below 60 years (OR 2.06, confidence interval to 95 % (95%CI): 1.28-3.34, $p=0.0029$), previous allergic reactions to drugs (OR 2.69 [95% IC: 1.01-8.24],

$p=0.0493$), culprit drug with enterohepatic circulation (OR 4.94 [95% IC: 2.34-11.45], $p=0.0001$), drugs with high hepatic metabolism, (OR 1.70 [95% IC: 1.02-2.84], $p=0.0417$), sp³/sp² hybridization ratio (<50%).

Protective parameters were: intake of concomitant medication for treatment of cardiac diseases (OR 0.47 [95% IC: 0.29-0.77], $p=0.0030$) and increased number of heterorings in the drug molecule (OR 0.68 [95% IC: 0.52-0.88], $p=0.0270$) (Table 5). The model was evaluated using the Hosmer-Lemeshow test and the ROC curve.

The Hosmer–Lemeshow test showed no difference between the predictor values of the model and the actual population, indicating high viability for the model. The ROC curve showed an AUC of 0.75863. A value between 0.75-0.90 indicates that the model has a good discrimination capacity (Fig. 13).

Table 5. Predictor factor of hepatocellular injury calculated by nominal logistic regression.

Predictor	<i>p-value</i>	OR	IC 95
Patient			
Age <60 years	0,0029	2,06	(1,28-3,34)
Previous allergic reaction to drugs	0,0493	2,61	(1,01-8,24)
Concomitant medication			
Cardiac disease	0,0030	0,47	(0,29-0,77)
Culprit drug			
Significant hepatic metabolism (>=50%)	0,0417	1,70	(1,02-2,84)
Enterohepatic circulation	0,0001	4,94	(2,34-11,45)
Hybridation ratio (<50%)	0,0285	2,04	(1,08-3,87)
Presence of heterorings	0,0270	0,68	(0,52-0,88)

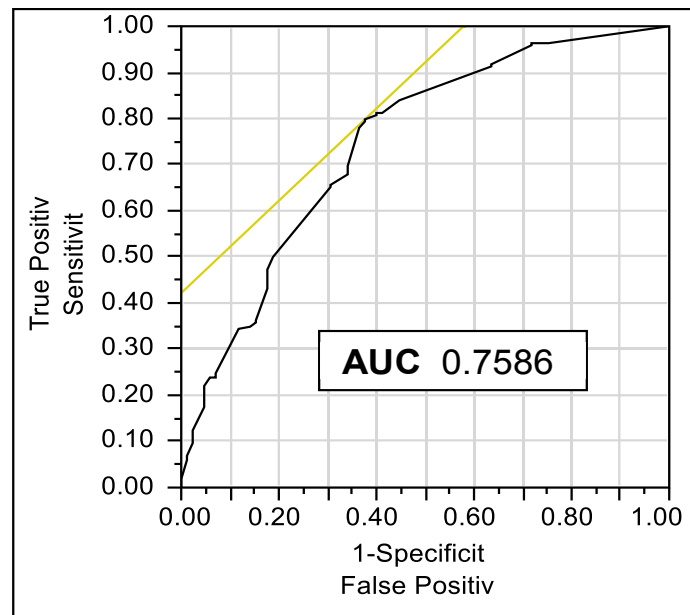


Figure 13. ROC curve for the model

15.6 Interaction host factor – drug property

In this part of the study we have analysed how host factors can potentially modulate the effect of drug properties on the type of liver injury. For this analysis only host factor and drug properties identified in the previous logistic regression analysis were used to examine potential interactions.

- a) **Previous allergic reactions to drugs:** previous allergic reactions to drugs had a different effect on the modulation of drug properties with regards to type of liver injury. Drugs with enterohepatic circulation increased the risk of hepatocellular type of injury in DILI patients with previous allergic reactions to drugs. In contrast, drugs with high hepatic metabolism decreased the risk of hepatocellular damage in patients with previous allergic drug reactions. Elevated number of heterorings was found to play a protective role in cases with previous allergic drug reaction. In addition, hybridization ratio was found to have a contradictory effect and increased the risk of hepatocellular injury in patients with previous allergic reactions to drugs.

b) Age (cut-off 60)

Age seems to play an important role in modulating the type of liver injury. Hepatic metabolism and enterohepatic circulation showed a different modulating effect according to the age group. Thus, in younger patients, the modulating effect of hepatic metabolism and enterohepatic circulation was low, and the differences between the groups were small. However, with the older patients the modulating effect was very significant. Here, low hepatic metabolism (<50%) or lack of enterohepatic circulation increased the frequency of cholestatic cases to approximately 50% in older patients. (Table 6, Fig. 14, 15).

Table 6. Changes in the relative risk of hepatocellular damage due to host factor - drug property interactions.

	Known previous allergic reaction to a drug (53)	No previous allergic reaction (502)	Age ≥ 60 (231)	Age < 60 (264)
Hepatic metabolism (≥50%)	2,91	5,25	3,37	1,54
Enterohepatic circulation	3,91	1,16	3,35	2,12
Hybridation ratio	1,02	0,12	0,54	0,16
Number heterorings	0,14	0,53	0,66	0,56

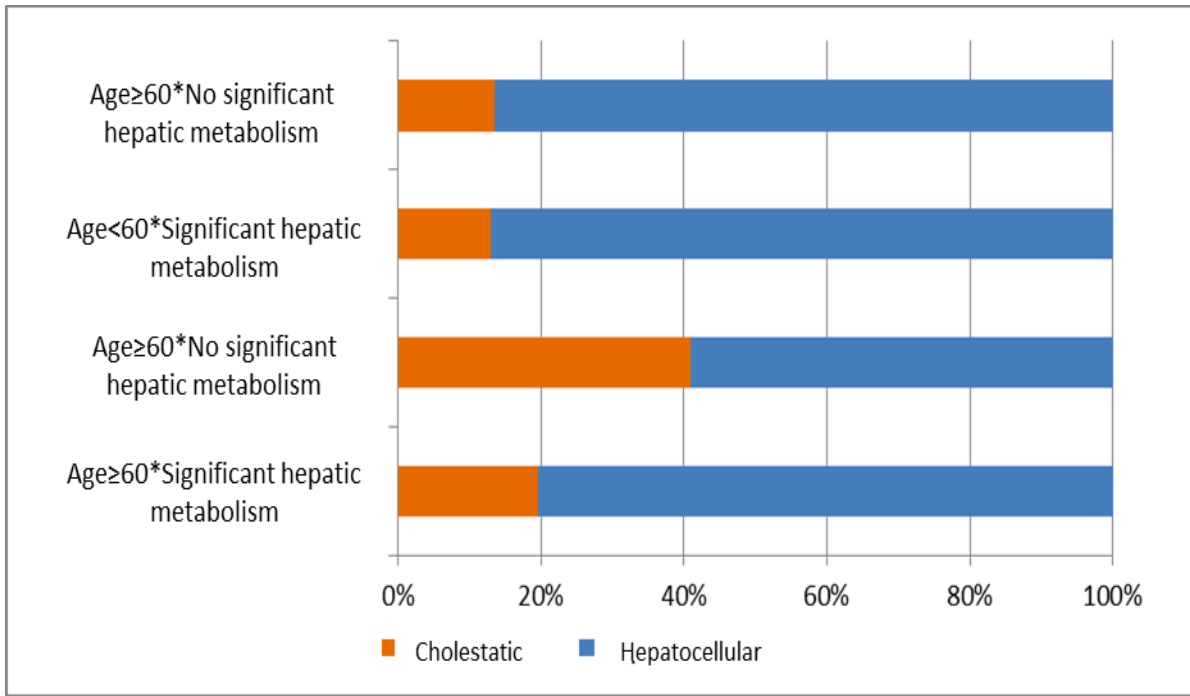


Figure 14. Distribution of cholestatic and hepatocellular cases according to age and hepatic metabolism.

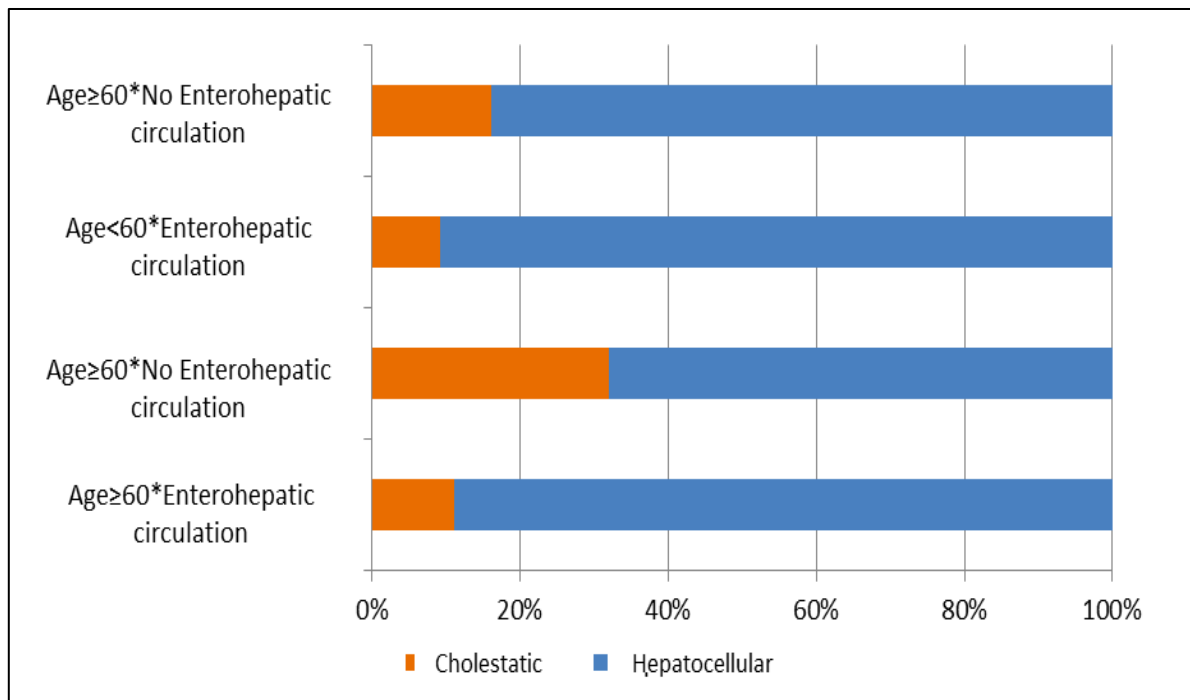


Figure 15. Distribution of cholestatic and hepatocellular cases according to age and enterohepatic circulation.

16. MODULATING FACTORS IN THE PRESENTATION OF DELAYED ONSET IN DILI

Most patients with drug-induced liver injury (DILI) show liver injury while undergoing drug treatments, however, some of them report that liver injury after treatment has been completed (i.e., delayed onset). The underlying mechanism of delayed onset is currently unknown. However, it has been postulated that delayed onset may be caused by a slow development of an immune response to the drug, alone or combined with a prolonged retention of the drug in the body. In this study we have tried to identify the properties of the drugs and host factors that are associated with delayed onset DILI.

To identify DILI causative drugs with and without potential to produce DO (PDO and nPDO, respectively) time to onset of all the included DILI cases in the current study were analysed with regards to time of drug cessation. A total of 10 PDO drugs (11 active ingredients) and 32 nPDO drugs (33 active ingredients) was identified. The PDO and nPDO drugs were associated with 204 and 209 DILI cases, respectively. Amoxicillin-clavulanate (AC) was the most prominent drug among the PDO drugs with 141 corresponding cases, of which 79 cases (56%) were associated with DO. Of the 204 cases induced by PDO drugs, 95 (46%) presented DO, and had a latency of 2-52 days after treatment cessation. The remaining 109 cases presented their first symptoms while receiving drugs.

16.1 Demographic and clinical characteristics

Demographic characteristics were evaluated to determine their potential role in DO modulation. Host factors in DILI DO we first compared cases with and without DO among the cases induced by PDO drugs (total 204 cases). Among the cases induced by PDO drugs, the DO cases exhibited higher daily dose (2004 vs 1018 mg, $p=0.0082$), more frequent jaundice (82 vs 70%, $p=0.0251$), and a lower proportion of patients with associated diseases (53 vs 67%, $p=0.0393$). The DO cases also tended to manifest eosinophilia more frequently when compared to cases without DO (38 vs 24%, $p=0.0615$). These differences were also detected when comparing the aforementioned two groups induced by PDO drugs as well as a third group of 209 DILI cases induced by nPDO drugs . In addition, the cases induced by nPDO drugs were found to have longer duration of treatment (40 vs 8 vs 9 days, $p=0.0002$) and time to onset (49 vs 19 vs 7 days, $p=0.0001$) compared to the cases induced by PDO drugs.

Comparing the two PDO drug groups no significant difference in liver injury pattern distribution was detected ($p=0.8004$), but when including the nPDO drug group in the analysis the difference in distribution between the three groups reached statistical significance ($p=0.0001$). However, this difference did not remain significant when AC cases were excluded from the analysis, most likely due to the high number of cholestatic/mixed cases among the AC patients. Similarly, the significant difference associated with increased frequency of jaundice in DO cases did not remain when AC cases were excluded. No other demographics and clinical parameters showed statistical significant differences (Table 7).

Table 7. Demographics and clinical characteristics of 204 Spanish DILI patients who intake drug with delayed onset potential classified by presence of delayed onset of symptoms and 209 patient who intake drug without potential.

Host factors	Drug with delayed onset potential		Drug without delayed onset potential	p-value
	Delayed onset (95)	No delayed onset (109)	No delayed onset (209)	
Demographics				
Age, mean (range)	57 (11-88)	58 (16-90)	57 (14-88)	0.7012
Women, n (%)	45 (47)	56 (52)	106 (49)	0.4779
Clinical presentation				
Duration of treatment, Median days (range)	8 (1-43)	9 (1-1826)	40 (1-1827)	0.0002 ^a
Time to onset, median days (range)	19 (6-73)	7 (1-1826)	49 (1-1827)	0.0001 ^b
Daily dose, mean mg (range)	2004 (20-5625)	1681 (20-4250)	371 (1-6000)	0.0001 ^c
Jaundice, n (%)	79 (82)	76 (70)	142 (66)	0.0089 ^d
Eosinophilia, n (%)	36 (38)	26 (24)	45 (20)	0.0122 ^e
Positive autoantibodies titers, n (%)	16 (17)	24 (22)	45 (21)	0.3185
Associated diseases, n (%)	50 (53)	69 (64)	194 (85)	0.0001 ^f
Pattern of liver injury, n (%)				
Hepatocellular	40 (43)	46 (44)	145 (68)	0.0001 ^g
Cholestatic	26 (28)	32 (31)	36 (17)	
Mixed	27 (29)	26 (25)	31 (15)	

Values have been calculated based on the number of patients with available information. DO, delayed onset; NDO, no delayed onset; AC, amoxicillin-clavulanic; d, days; mg, milligram.

a Mann–Whitney U test showed significant differences in time to onset between drug without delayed onset potential and both groups with delayed onset potential.

b Mann–Whitney U test showed significant differences in duration of treatment between drug without delayed onset potential and both groups with delayed onset potential.

c Mann–Whitney U test showed significant differences in daily doses between three groups of population.

d Chi-square test showed significant differences of jaundice frequency in delayed onset group against other two groups.

e Chi-square test showed significant differences of eosinophilia frequency in delayed onset group against other two groups.

f Chi-square test showed significant differences between three groups of population.

g Chi-square test showed significant differences between three groups of population.

h Chi-square test showed significant differences between three groups of population.

16.2 Associated diseases

As such showed in the previous section three groups showed different incidence of associated diseases, also there was difference in the incidence of associated conditions types. Although it is true that most were attributed to an increase in cases with nPDO drugs (53% vs 64% vs 85%; $p=0001$)(Table 7). All specific comorbidities showed a low number of cases, for this reason comorbidities did not include in multivariate study (Table 8).

Table 8. Diseases of 204 Spanish DILI patients who intake drug with delayed onset potential classified by presence of delayed onset of symptoms and 209 patient who intake drug without delayed onset potential.

Diseases	Drug with delayed onset potential		Drug without delayed onset potential	<i>p</i> -value
	Delayed onset (95)	No delayed onset (109)	No delayed onset (208)	
Autoimmune	2 (2)	2 (2)	15 (7)	0.0395 ^a
Cardiac	6 (6)	10 (9)	30 (14)	0.0857
Cutaneous	1 (1)	3 (3)	6 (3)	0.6095
Endocrine	13 (14)	17 (16)	30 (15)	0.9251
Gastrointestinal	8 (8)	15 (14)	28 (14)	0.4088
Genitourinary	5 (5)	3 (3)	21 (10)	0.0390 ^b
Gynecological	2 (2)	2 (2)	6 (3)	0.8241
immunological	3 (3)	-	5 (3)	0.2091
Infectious	2 (2)	-	4 (2)	0.3320
kidney	1 (1)	2 (2)	6 (3)	0.5743
Metabolic	11 (12)	19 (18)	49 (24)	0.0522
Musculoskeletal	3 (3)	15 (14)	13 (6)	0.0101 ^c
Nervous system	6 (6)	4 (4)	36 (17)	0.0030 ^d
Ophthalmological	2 (2)	1 (1)	1 (1)	0.4077
Psychiatric	2 (2)	5 (5)	22 (10)	0.0142 ^e
Respiratory	11 (12)	9 (8)	20 (5)	0.0984

- a) Chi-square test showed significant differences on autoimmune diseases in nPDO group versus rest of groups.
 b) Chi-square test showed significant differences on genitourinary diseases in nPDO group versus rest of groups.
 c) Chi-square test showed significant differences on Musculoskeletal diseases in nDO with PDO group versus rest of groups.
 d) Chi-square test showed significant differences between three groups of population.
 e) Chi-square test showed significant differences on genitourinary diseases in nPDO group versus rest of groups.

16.3 Drug properties and their relation with delayed onset

a) Drug classes

The most frequent therapeutic class of the PDO drugs was antiinfectives, especially antibacterials (70%), followed by anti-inflammatory drugs (30%). The nPDO drugs, on the other hand, were predominantly nervous system drugs (27%), followed by cardiovascular (21%) and alimentary tract (15%) drugs.

b) Physicochemical properties

To determine the role of the drug in DILI with DO, physicochemical drug properties were compared between the PDO and nPDO drug groups. The chemical structure of the PDO drugs were found to contain a significantly higher number of total rings (3.3 ± 1.3 vs 2.3 ± 1.1 , $p=0.0343$) and heterorings (2.1 ± 1.2 vs 1.2 ± 0.8 , $p=0.0104$) than the nPDO drugs. The PDO drugs also tended to have shorter total chains (3.2 ± 1.6 vs 6.1 ± 5.4 atoms, $p=0.0876$) as well as aliphatic chains (0.6 ± 1.1 vs 2.4 ± 3.1 atoms, $p=0.0738$) in their structures. Furthermore, the PDO drugs had higher molecular weight than the nPDO drugs, although the difference did not reach statistical significance (412 ± 180 vs 328 ± 134 g/mol, $p=0.0633$) (Table 9).

c) Pharmacokinetic properties

The PDO drugs included a higher proportion of drugs with <50% hepatic metabolism (55 vs 19%, $p=0.0190$) and a higher proportion of drugs with $\geq 50\%$ excretion in parent form (50 vs 6%, $p=0.0015$) than the nPDO drugs. Based on the BDDCS classification, we observed significant differences between the two groups ($p=0.0001$). Drugs of BDDCS class 1 (high metabolism/high solubility) and 2 (high metabolism/low solubility) were more prevalent in the nPDO group (42 vs 0% and 42 vs. 20%, respectively), while drugs of class 3 (low metabolism/high solubility) predominated in the PDO group (60 vs 6%). No other physicochemical properties analysed such as half-life, protein binding, lipophilicity (LogP) and production of RMs showed significant differences between the two groups.

No other physicochemical properties analysed such as half-life, protein binding, lipophilicity (LogP) and production of RMs showed significant differences between the two drug groups (Table 9).

Table 9: Physicochemical drug properties associated with delayed onset potential on DILI.

Parameter	Active agents with potential Delayed onset N=11	Active agents without potential Delayed onset N=33	<i>p</i> -value
Psychochemical			
Molecular weight, mean \pm SD g/mol	412 \pm 180	328 \pm 134	0.0633
Number total rings, mean \pm SD	3.3 \pm 1.3	2.3 \pm 1.1	0.0343
Number aromatic rings, mean \pm SD	0.9 \pm 0.5	1.0 \pm 0.9	0.9199
Heterorings, mean \pm SD	2.1 \pm 1.2	1.2 \pm 0.8	0.0104
Length of chain, mean \pm SD	3.2 \pm 1.6	6.1 \pm 5.4	0.0876
Length of aliphatic chain, mean \pm SD	0.6 \pm 1.1	2.4 \pm 3.1	0.0738
High Pauling electronegativity, n (%)	3 (21)	6 (17)	0.6963
Pharmacokinetics			
Half-life, h median (IQR)	3.2 (1.2-12)	5.2 (2.9-16)	0.7692
Lipophilia (LogP), median (IQR)	1.8 (0.1-2.9)	2.5 (0.1-3.8)	0.3747
Binding protein ratio, median (IQR)	80 (40-97)	90 (35-97)	0.7702
Hepatic metabolism \geq 50%, n (%)	5 (45)	27 (81)	0.0190
\geq 50% drug excreted in parent form, n (%)	5 (50)	2 (6)	0.0015
Enterohepatic circulation, n (%)	4 (36)	11 (37)	0.9858
Reactive metabolite formation, n (%)	5 (45)	19 (59)	0.4226
Mitochondrial liability, n(%)	5 (45)	20 (62)	0.5422
BDDCS, n (%)			
class 1 (\uparrow solub and \uparrow hep met)	-	14 (42)	
class 2 (\downarrow solub and \uparrow hep met)	2 (20)	14 (42)	0.0001
class 3 (\uparrow solub and \downarrow hep met)	6 (60)	2 (6)	
class 4 (\downarrow solub and \downarrow hep met)	2 (20)	3 (9)	
Pharmacodynamics			
BSEP inhibitor, n (%)	3 (27)	17 (51)	0.1620

42 Drugs (44 active agents) that were considered culprit in three or more cases in the registry were included in the analysis. Abbreviation: BDDCS, Biopharmaceutical drug disposition classification system; solub, solubility; hep met, hepatic metabolism; \uparrow , high; \downarrow , low. All values have been calculated based on the number of drugs with available information. The values have been calculated based in the number of drugs with available information.

16.4 Concomitant medication

Although some pharmacological properties of the drugs differed significantly between the three groups, no significant differences were found with respect to concomitant medications. Therefore, no pharmacological group or subgroup presented a significantly different frequency compared to the other groups (Table 10).

Table 10. Concomitant drug treatment of 204 Spanish DILI patients who intake drug with delayed onset potential classified by presence of delayed onset of symptoms and 209 patient who intake drug without delayed onset potential.

Drug classes in patient with concomitant medication	Drug with delayed onset potential		Drug without delayed onset potential	<i>p</i> -value
	Delayed onset (69)	No delayed onset (79)	No delayed onset (154)	
H2-receptor antagonists	1 (1)	4 (5)	3 (2)	0.2917
Antithrombotic agents	3 (4)	3 (4)	6 (4)	0.9831
ACE inhibitors + angiotensin II antagonists	7 (10)	6 (8)	16 (10)	0.7788
Statins	4 (6)	4 (5)	12 (8)	0.6951
Fibrates	-	-	1 (1)	0.6175
Female sex hormones	0	1 (1)	2 (1)	0.6383
Antithyroid preparations	-	-	-	-
Anti-infectives				
Penicillins-cephalosporins	3 (4)	2 (3)	3 (2)	0.5857
Fluoroquinolones	1 (1)	-	2 (1)	0.5815
Macrolides	3 (4)	1 (1)	2 (1)	0.2780
Antineoplastic agents	-	-	3 (1)	0.2332
Antiandrogens	-	-	1 (1)	0.6175
Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)	3 (4)	8 (10)	12 (8)	0.4144
Immunosuppressants	-	-	1 (1)	0.6175
Antiepileptics	1 (1)	2 (2)	2 (1)	0.7746
Herbal products	2 (3)	1 (1)	5 (3)	0.6649

16.5 Multivariable model to predict delayed onset of DILI including drug properties and host factors

The drug properties and host factors that showed significant associations with the delayed onset total rings, heterorings, hepatic metabolism, parent drug excretion, BDDCS classification, daily dose, jaundice, eosinophilia, associated diseases, liver injury pattern and severity) were then evaluated in a multiple logistic regression model to assess their effect sizes and predictive performance. Using a backward step elimination approach, three variables were found to increase the likelihood of delayed onset: absence of associated diseases (OR 1.91 [95% IC: 1.08-3.39], $p=0.0245$), culprit drug daily dose $\geq 200\text{mg}$ (OR 2.89 [95% CI: 1.25-7.58], $p=0.0123$) and hepatic metabolism $< 50\%$ (OR 23.98 [95% CI: 10.84-63.68], $p=0.0001$) (Table 11). The calculated R^2 for this model was 0.3034 and the area under the ROC curve 0.8459 (Fig. 16). The bootstrap procedure showed minimal overfitting (0.0057) (Figure 17).

Table 11. Predictor model for delayed onset occurrence based on independent drug properties and host factors.

Predictors	OR	Probability	95% CI
Hepatic metabolism < 50%	23.98	0.0001	10.84-63.68
Daily dose $\geq 200\text{mg}$	2.89	0.0123	1.25-7.58
Absence of associated diseases	1.91	0.0245	1.08-3.39

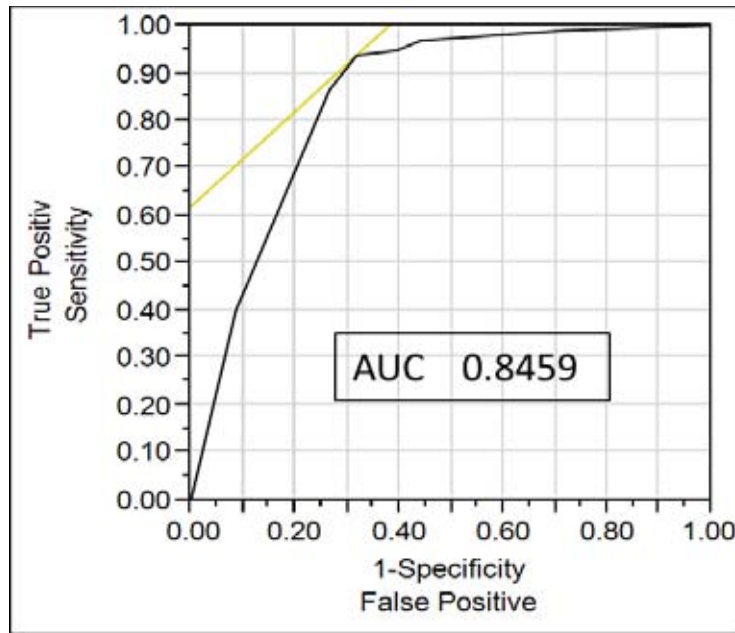


Figure 16. ROC curve for regression model in which have been included three independent predictors (Absence of associated diseases, daily dose $\geq 200\text{mg}$, hepatic metabolism $< 50\%$).

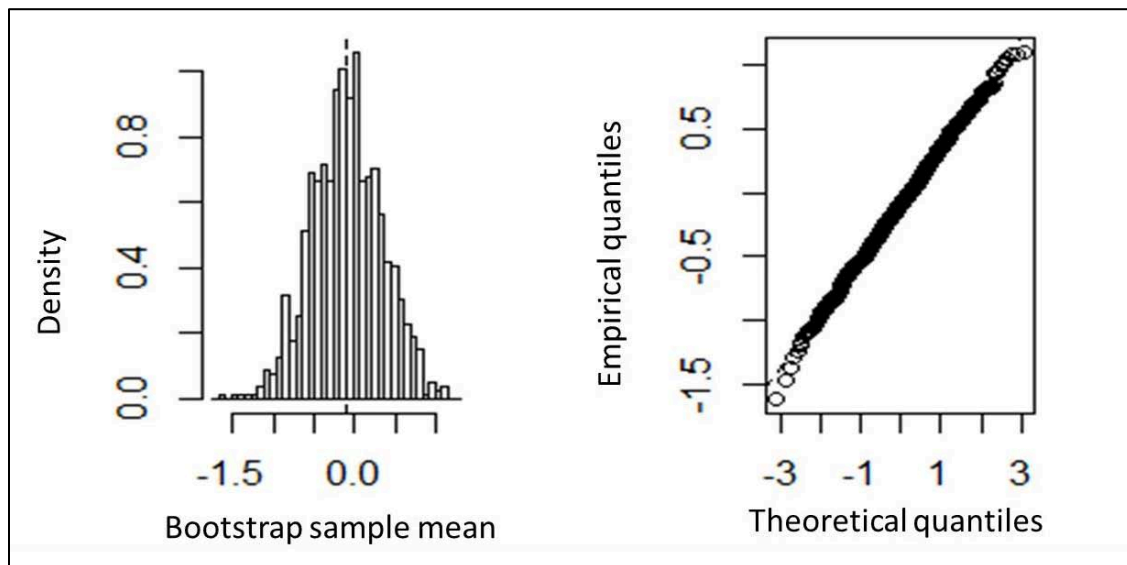


Figure 17. Normal quantile plots of 1000 observations drawn from a normal (right) distribution. If observations are consistent with a normal distribution, they follow a straight diagonal line. If the observations are inconsistent with a normal distribution, then they will deviate systematically from the straight diagonal line.

Drug-host interactions in delayed onset of DILI

Next, we sought to explore potential drug-host interactions in delayed onset of DILI. In the first exploratory analysis (screening of potential host-drug interactions), 50 of the 2684 drug-host pairs were identified as statistically significant. In the subsequent characterization analysis, four pairs were confirmed to have significant interactions in delayed onset. Three host factors, age (cut-off 60 years), gender, and pre-existing cardiac diseases, were identified as significant effect modifiers for drugs with mitochondrial liability. Pre-existing cardiac diseases were also identified as a significant effect modifier for drugs with high Pauling electronegativity (Table 12).

Table 12. Host factors modifying effects of drug properties on the likelihood of manifesting delayed onset in drug-induced liver injury

Age	Potential mitochondrial liability		OR*	95% CI	p-value
	Positive	Negative			
Age ≥60 years	48/185 (25%)	7/35 (20%)	0.713	0.27-1.66	0.4562
Age <60 years	38/142 (27%)	1/35 (3%)	0.080	0.01-0.39	0.0004
Sex	Potential mitochondrial liability				
	Positive	Negative			
Male	43/169 (25%)	7/33 (21%)	0.788	0.29-1.86	0.6014
Female	43/158 (27%)	1/37 (3%)	0.074	0.01-0.36	0.0002
Underlying cardiac diseases	Potential mitochondrial liability				
	Positive	Negative			
Presence	3/37 (8%)	3/8 (37%)	6.800	1.03-47.39	0.0266
Absence	83/290 (29%)	5/62 (8%)	0.219	0.07-0.52	0.0002
Underlying cardiac diseases	Pauling electronegativity				
	High (N= 55)	Low (N=364)			
Presence	2/4 (50%)	4/43 (9%)	0.102	0.01-0.94	0.0531
Absence	5/51 (10%)	84/321 (26%)	3.260	1.25-8.48	0.0058

Data in the first two columns show numbers of cases with delayed onset over numbers of cases satisfying two conditions, a host factor and a drug property (% of cases with delayed onset). *OR values were computed using the first column as control group.

17. CONTRIBUTING FACTORS IN THE SEVERITY OF LIVER INJURY IN DILI

In the first approach of the present study, the 701 DILI cases included were categorized for severity according to Aithal et al (Aithal, Watkins et al. 2011). Based on this classification, the distribution of cases was 237 mild, 388 moderate, 49 severe and 27 fatal/transplant cases. Using this classification, the following analysis revealed a strong relationship between severity and type of liver injury. This was partly caused by the large proportion of cholestatic cases being moderate, as cholestatic cases usually develop jaundice. This strong relationship was a disadvantage for the study and for this reason a new classification was implemented. The cases were divided into high-severity (HS) and low-severity (LS), based on the manifestation of at least one of the following conditions in the HS group: ascites, encephalopathy, coagulopathy and affection of other organs, or death/transplant.

17.1 Demographic and clinical characteristics

Demographic characteristics were similar in both groups. The average age was 55 years for the LS cases and 56 years for the HS cases. The frequency of females was slightly higher in HS group, but not statistically significant (60% vs 50%, $p=0.1029$). The BMI was 25 kg/m² in both groups (Table 13). The clinical characteristics did not differ between the groups, with similar treatment time, time to onset and daily dose in the two groups. The only significant difference was the presence of jaundice, which was 100% of the HS cases (as part of the selection criteria) and 63% in LS cases ($p=0.0001$).

Previous allergic reactions to drugs appeared more frequently in HS cases (15% vs 8%, $p=0.0884$). In addition, frequency of positive autoantibody titres were higher in HS cases (34% vs 23%, $p=0.0670$) as well as presence of lymphopenia (31% vs 21%, $p=0.0947$). However, none of these differences reached statistical significance. (Table 14).

Table 13. Demographic characteristics classified by severity of liver injury.

	Low-severity (LS) n=598	High-severity (HS) n=73	<i>p-value</i>
Age median (range)	55 (11-88)	56 (14-90)	0,6271
Women, n (%)	300 (50%)	44 (60%)	0,1029
BMI kg/m ²	25 (17-41)	25 (19-36)	0,7936

Values have been calculated based on the number of patients with available information

Table 14. Clinical information in DILI cases classified by severity of liver injury.

	Low-severity (LS) n=598	High-severity (HS) n=73	<i>p-value</i>
Clinical			
Duration of treatment, median d (range)	27 (1-2313)	32 (1-445)	0.9780
Time to onset, median d (range)	25 (1-2313)	30 (1-557)	0.9315
Daily dose, median mg (range)	375 (0.04-6000)	250 (1-3000)	0.3663
Jaundice, n (%)	376 (63%)	73 (100%)	0.0001
Rash, n (%)	38 (6)	6 (8)	0.5435
Eosinophilia, n (%)	138 (23)	11 (15)	0.1201
Lymphopenia, n (%)	109 (21)	17 (31)	0.0947
Auto-antibodies positive titres, n (%)	110 (23)	18 (34)	0.0670
• ANA	77 (16)	9 (17)	0.8752
• ASMA	41 (9)	7 (14)	0.2480
• AMA	9 (2)	2 (4)	0.3475
Known previous allergic reactions	53 (8)	11 (15)	0.0884

Values have been calculated based on the number of patients with available information

The HS group presented a wide variety of initial symptoms. Compared to the LS groups, the HS cases had a higher incidence of bilirubin disorders, mainly due to the presence of jaundice (as part of the selection criteria). The rest of the bilirubin disorders on their own did not show any significant differences between the groups (Fig. 17).

A second category of symptoms was blood count disorders, which was more frequent in HS cases (59% vs 50%). The most important differences here appeared in lymphocytosis (25% vs 10%) and thrombocytopenia (10% v 3%). The respective p-values were $p=0.0024$ and $p=0.0331$ (Fig. 18).

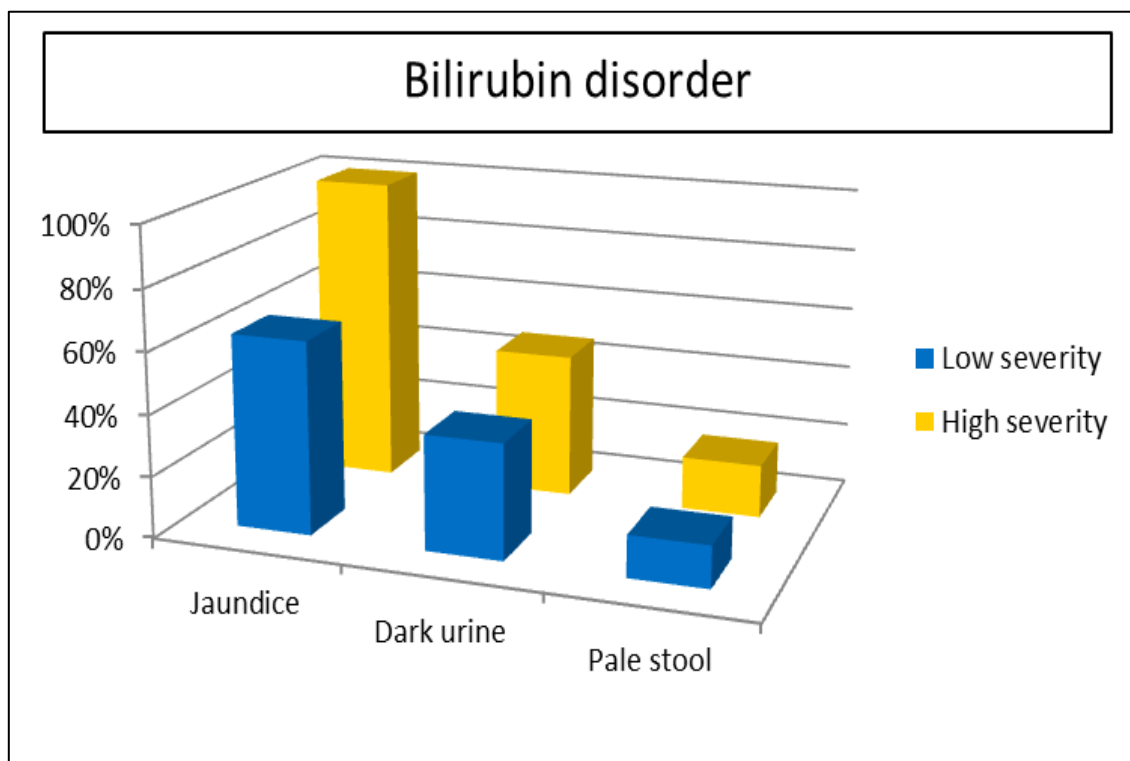


Figure 18. Frequency of bilirubin disorder classified by severity.

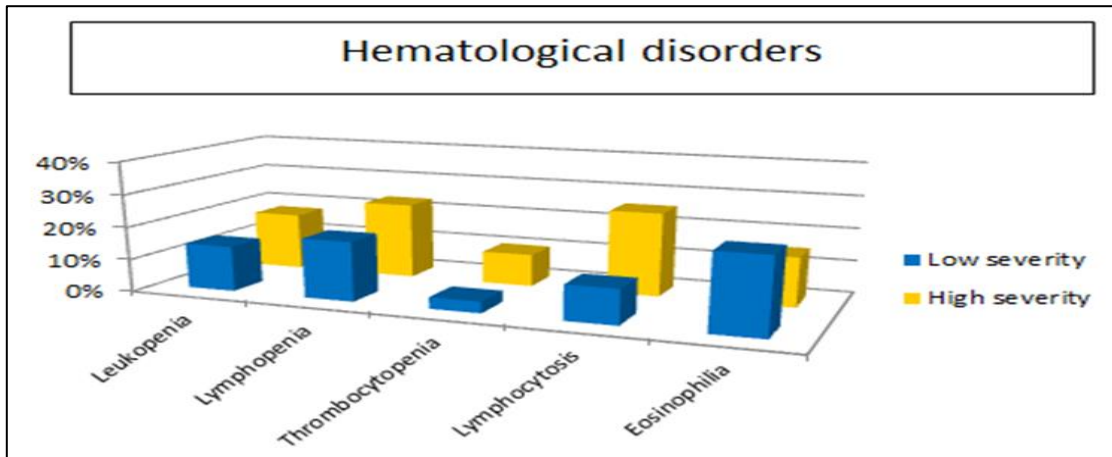


Figure 19. Distribution of hematological disorder classified by severity.

17.2 Associated diseases

HS cases showed a wide variety of underlying diseases, with significant differences in two disease categories compared to the LS cases. The HS had a significantly higher frequency of underlying infectious diseases (8% vs 2%, $p=0.0011$) and a significantly lower incidence of metabolic diseases (18% vs 7%, $p=0.0182$). Furthermore, HS cases were less likely to suffer from underlying autoimmune diseases (1.6% vs 8%, $p=0.0604$).

17.3 Concomitant medication

The number of concomitant drugs was similar in both groups, as well as the number of patients with concomitant medication. However, the types of concomitant medication were different between the groups. The HS cases more frequently took drugs for the treatment of infectious diseases (ATC code J) (15% vs 7%, $p=0.0278$). This observation coincides with the information observed in associated diseases, although the percentage of treated patients is higher than the percentage of diagnosed associated diseases, probably due to prophylaxis treatments.

17.4 Drug properties and their relation with severity

Most of the pharmacological properties were similar in the two groups. However, high values of electronegativity were more frequently found among the drugs associated with the HS cases (24% vs 12%, $p=0.0061$). HS cases also had drugs with lower number of total rings (2 vs 3, $p=0.0011$) and heterorings (1 vs 2, $p=0.0015$) in their molecular structures. In addition, HS cases showed a higher frequency of drugs with high hepatic metabolism (74% vs 61%, $p=0.0298$), as well as enterohepatic circulation (36% vs 24%, $p=0.0417$), but a lower frequency of drugs excreted mainly in parent form (19% vs 34%, $p=0.0128$). (Table 15-17).

Table 15. Physicochemical properties of the drug associated with severity in DILI.

Parameter	Low-severity (LS) n=598	High-severity (HS) n=73	p-value
Molecular weight, median g/mol	365	322	0.0996
Number of rings, mean	3	2	0.0011
Number of aromatic rings, mean	1	1	0.8791
Index aromatic/total rings, mean	0.3	0.3	0.1988
Heterorings, mean	2	1	0.0015
Fused rings, mean	1	0	0.1065
Presence of sulfur atoms, n (%)	265 (48)	30 (51)	0.7066
Presence of halogen atoms, n (%)	166 (30)	23 (39)	0.1678
High electronegativity (Pauling scale), mean	62 (12)	14 (24)	0.0061
Topological distance index, mean (range)	6572 (138-65429)	4846 (90-22763)	0.0545
Molecular polarity, mean (range)	0.67	0.67	0.9626
Volume McGowan, media (range)	2.53	2.30	0.0655
Free energy (Platts scale), mean	2.5	2.2	0.0681
Topological polar surface, mean	96.31	72.88	0.0767
Hybridization ratio, mean	0.40	0.41	0.3426
Length of chain, mean atoms	5	5	0.0760
Length of aliphatic chain, mean atoms	2	2	0.0909
Lipoaffinity, mean	3.41	3.73	0.6022

Values have been calculated based on the number of drugs with available information.

Table 16. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties associated with severity.

Parameter	Low-severity (LS) n=598	High-severity (HS) n=73	p-value
Pharmacokinetics			
Half-life, median h	3.2	5.2	0.3598
Lipophilia (LogP), median (range)	1.2 ((-6.8)-8.3)	1.3 ((-2.1)-8.3)	0.4492
Plasma protein binding (%), median	65	90	0.4035
Hepatic metabolism \geq 50%, n (%)	345 (61)	52 (74)	0.0298
\geq 50% drug excreted in parent form, n (%)	191 (34)	13 (19)	0.0128
Enterohepatic circulation, n (%)	130 (24)	23 (36)	0.0417
Reactive metabolite formation, n (%)	376 (68)	49 (74)	0.3101
Mitochondrial liability, n (%)	420 (76)	55 (83)	0.2112
BDDCS			
• 1	189 (33)	26 (38)	
• 2	158 (28)	25 (36)	0.0754
• 3	192 (34)	13 (19)	
• 4	27 (5)	5 (7)	
Pharmacodynamics			
BSEP IC ₅₀ , median μ M	608	608	0.4407
BSEP inhibitor, n (%)	226 (41)	19 (32)	0.1787

Values have been calculated based on the number of drugs with available information. Abbreviations: BDDCS, Biopharmaceutical drug disposition classification system; BSEP, bile salt export pump.

17.5 Multivariate analysis (nominal logistic regression)

In the multivariate analysis, all drug properties and host factors were analysed. However, only concomitant use of drug for treatment of anti-infectious diseases was selected as a predictor for high severity. Consumption of anti-infective agents prior to or at the time of the episode doubled the risk of progressing to a severe outcome (OR 2.00, IC: 1.35-3.47, $p=0.008$). Due to only finding one single predictor (concomitant use of anti-infectives), no further analyses of host factor – drug property interactions were performed.

18. DISCUSSION

Hepatotoxicity is considered a multifactorial pathology dependent on host, drug and environmental aspects (Kaplowitz 2005; Chen, Suzuki et al. 2015). Cellular stress and immune responses are believed to be important processes in hepatotoxicity, however the exact components involved in DILI development and phenotype variations are currently unknown. To date most DILI studies have focused on specific areas, such as causative agents or clinical presentations, with limited evaluations having been performed on multifactorial effects on DILI. Hence, the aim of this study was to use a different approach that integrates various factors, as well as their interactions, which could be involved in modulating the clinical presentation of idiosyncratic DILI.

The findings in this study demonstrate that the study approach was adequate as both host factors and drug properties were identified as important modifiers of the clinical presentation in DILI. Both host and drug-related modifiers appeared to play important roles, with none of the two categories being more important than the other. However different host factors and drug properties were identified for the different phenotypic presentations.

Although the individual effect of many of these factors is sufficient to modulate some aspects in DILI, the interaction between them could explain other observed differences and potentially increase the understanding of the underlying mechanism. An example of such an interaction between a host factor and drug property is older age and high hepatic metabolism, which appear to increase the risk of developing cholestatic DILI.

18.1 Type of liver injury

In the current study we found that patient age appear to affect the type of liver injury the patient develops. This finding confirms the results of a previous study of the Spanish DILI Registry in which younger age was found to be associated with hepatocellular liver injury and older age with cholestatic type of liver injury (Lucena, Andrade et al. 2009). The current study also found additional host factors that could modulate the pattern of injury. Treatment time and time to onset were found to be shorter in cholestatic cases than hepatocellular cases. These data are consistent with previously published findings. A study of 12 pediatric patients showed that the manifestation of cholestatic damage appeared within the first two months of treatment, whereas the manifestation of hepatocellular damage appeared up to two years after treatment initiation. However, it should be noted that the hepatocellular cases in this published study included cases induced by minocycline, which is known to have a very long latency period compared to many other drugs inducing hepatocellular liver injury (Molleston, Fontana et al. 2011). Another study of DILI cases induced by a range of causative agents showed that AC-DILI cases had a shorter time to onset compared to the cases induced by other drugs (33 vs 55 days), except for other antibiotics. In addition, cholestatic liver injury predominated among the AC-DILI cases in this study (deLemos, Ghabril et al. 2016). In contrast, troglitazone (which has now been withdrawn from most markets), mainly causing hepatocellular DILI, have been reported to have a longer latency period, from one to six months, and only 20% of DILI cases developed in less than one month from treatment initiation (Graham, Green et al. 2003).

These differences could partly be explained by different symptom manifestations. Cholestatic cases often present with jaundice and pruritus, which are easily detected (Tujios and Fontana 2011; Bjornsson and Jonasson 2013). In contrast, hepatocellular DILI cases are more frequently asymptomatic or with nonspecific symptoms, which are less obvious and subsequently could be mistaken for general

ill being. However, it should be noted that the difference in jaundice in the current study was not significantly different and that a relatively large proportion of the hepatocellular cases (62%) in fact presented with jaundice, compared to 75% of the cholestatic cases. Hence, it cannot be ruled out that cholestatic damage in DILI could require less time to develop.

Another interesting observation in this study was the higher incidence of eosinophilia and lymphopenia in cholestatic cases. Although, it is unknown whether these conditions appeared prior to the onset of the hepatotoxicity reaction or whether they were elements involved in the development of the reaction. Eosinophilia was detected in 30% of the cholestatic population, suggesting a possible relationship between the immune system and cholestatic damage, either as a predisposing element of the reaction or as part of its development. An involvement of the immune system in cholestatic DILI has been suggested in a previous study, which found that the HLA class II alleles HLA-DRB1*15 and HLA-DQB1*06 could be susceptibility enhancers in cholestatic/mixed patients, whereas the HLA-DRB1*07 and HLA-DQB1*02 appeared to play a protective role (Andrade, Lucena et al. 2004). It should be pointed out that additional studies have since determined that the aforementioned HLA alleles are associated with AC-DILI specifically (Donaldson, Daly et al. 2010; Lucena, Molokhia et al. 2011). Nevertheless, AC is known to frequently induce cholestatic type of DILI and an analysis of HLA alleles in AC-DILI has demonstrated that the HLA alleles DRB1*15:01 and DQB1*06:02 are specific risk alleles for cholestatic/mixed AC-DILI (Lucena, Molokhia et al. 2011). It has also been reported that drugs generally related to cholestatic damage are mostly drugs with immunoallergic potential. While drugs with no immunoallergic potential are mainly associated with hepatocellular damage (Kaplowitz 2005).

In relation to the immune system, the presence of previous allergic reactions to a drug differed between the hepatocellular and cholestatic groups. The highest frequency was seen among the hepatocellular cases. The mechanism of DILI is not believed to be related to that of drug allergies. However, both of these

conditions seem to depend on immune reactions as many recent studies point towards the involvement of the immune system in DILI development (Dara, Johnson et al. 2015). The reason why hepatocellular cases more frequently present a history of allergic drug reactions is currently unknown. One could hypothesize that previous stimulation of the immune system by other drugs could sensitize the liver to future drug reactions, since the liver is the organ most exposed to drugs. This sensitization could produce a more toxic response, favoring hepatocellular damage. Despite the statistically significant difference between the frequencies of prior allergic drug reactions in hepatocellular and cholestatic cases, the frequencies are relatively low in both groups. This suggests that prior drug reactions play at most a very minor role in the clinical presentation of DILI. In fact, it cannot be ruled out that the presence of prior allergic drug reactions do not influence DILI phenotype development, but is merely a statistical coincidence, in particular due to the overall infrequency of this variable.

The last host factor associated with modifying the type of liver damage was associated diseases. The current study showed that underlying cardiac and vascular diseases would favor the development of cholestatic damage. It is known that hepatic and cardiac diseases are related. Some patients may develop cardiac disorders due to previous cirrhosis (Moller and Bernardi 2013). In addition, cardiac disturbance reduces arterial perfusion and can cause secondary passive congestion in the liver by increasing venous resistance. Such congestion can subsequently induce accumulation of bile salt (Moller and Bernardi 2013; Fouad and Yehia 2014). Hepatic congestion as a consequence of heart disease is manifested in acute or chronic form. Acute hepatic congestion has been associated with direct induction of cholestasis in 1.2% of patients and chronic congestion leads to hyperbilirubinemia in 20% of patients (Levy 2013). However, other studies related to extensive ischemia derived from cardiac failure, have demonstrated a clinic profile similar to that of hepatocellular damage, with significant ALT and AST elevations, which rapidly normalizes (Seeto, Fenn et al. 2000).

On the other hand, the higher frequency of concomitant cardiovascular diseases in the DILI patients with cholestatic liver damage could be an effect of concomitant medication taken by the patient for the associated diseases. The most studied drug group for the treatment of cardiovascular diseases, with regards to hepatotoxicity, is statins. Some statins, such as atorvastatin and fluvastatin, appear to be more prone to induce cholestatic liver injury when being causative agents (Perdices, Medina-Caliz et al. 2014). - While, tempting to hypothesize that statins, such as atorvastatin and fluvastatin could enhance the development of cholestatic type of DILI when present as concomitant medications. However, the exact role concomitant medications play in DILI is currently unknown and requires further studies.

Among the drug properties, hepatocellular cases were found to be associated with drugs having a higher number of aromatic rings and consequently a higher rate of sp³/sp² hybridization ratio. There are different hypotheses about the role of these rings in hepatocellular toxicity. Some studies suggest that an association with genetic variants may increase their hepatocellular risk. For example, the C allele in the *ABCB1*11331T>C polymorphism have been found to increase the risk of hepatocellular DILI in patients taking drugs with aromatic rings (Ulzurrun, Stephens et al. 2013). It has also been suggested that these structures are more closely linked to the production of RMs due to the generation of intermediate epoxides (Stepan, Walker et al., 2011, Hughes, Miller et al., 2015).

Aromatic compounds can be oxidized to many different RMs during hepatic drug metabolism, such as epoxides, quinines, quinones, quinone imines and methides (Ortiz de Montellano and Nelson 2011; Gu and Manautou 2012). These RMs need to be neutralized using detoxification enzymes such as epoxide hydrolases or GST in order to prevent potential cell damage (Carlson 2011). This may lead to an increase in oxidized glutathione and requires an ATP dependent process to restore the reduced/oxidized glutathione balance. Inability to maintain the cellular redox balance could lead to intracellular oxidative stress and/or mitochondrial damage that may initiate signal transduction pathways that modulate cell death and survival

(Han, Shinohara et al. 2010). A reduction in cellular ATP at the cost of increased ROS formation has been observed *in vitro* in hepatocytes subjected to DILI-inducing drugs, with a higher increase in the ROS/ATP ratio associated with hepatocellular damage compared to cholestatic damage . (Zhang, Doshi et al. 2016). This suggests that hepatocytes could be exposed to a more direct form of cellular injury induced by the drug than what occurs in cholestatic DILI.

The current study showed that the presence of sulfur atoms could favor cholestatic damage, whereas halogen molecules (especially nitrogen and chlorine) would favor the development of hepatocellular damage. The role of these elements in toxicity is not clear, although both sulfur and halogens possess a high oxidizing potential, which can give rise to RMs, such as nitrenium ions derived from halogen molecules (Weber, Boll et al. 2003; Falvey 2005). Sulfur atoms are mainly found in anti-infective drugs, particularly sulfonamides and penicillins (Feng, Tang et al. 2016). These drugs are usually associated with a low rate of hepatic metabolism and short half-life, which subsequently would limit the formation of RMs. In addition, many sulfur containing anti-infectives, such as AC, tend to produce cholestatic type of DILI. Hence, it is tempting to hypothesize that halogen-containing drugs are more prone to produce a direct damage to the hepatocyte through RMs formed during hepatic metabolism, while sulfur-containing anti-infectives undergo low hepatic metabolism and subsequently are more prone to induce cholestatic DILI..

The hepatocellular cases were found to be induced by drugs with higher lipophilicity (LogP) compared to the drugs that induced cholestatic DILI. High lipophilicity could favor a drug's ability to pass through the hepatocyte cell membrane, and lead to increased intracellular drug concentration and a higher risk of potential cell damage. On the other hand, the lower lipophilicity associated with drugs causing cholestatic liver injury could indicate less diffusion and the need for transporters to enter the hepatocyte. This would limit the drug's ability to enter the hepatocyte and subsequently decrease the degree of intracellular drug exposure. As a consequence the risk of direct cell damage would also decrease, suggesting

that direct damage to the hepatocyte would induce hepatocellular type of liver damage. However, the literature on intracellular drug concentration and its effect on cell damage is scarce. – In addition, some studies evaluating the concentration of hepatocellular drugs in cellular organelles are available, but the findings are insufficient to support a role for lipophilicity in hepatocellular DILI (Pfeifer, Harris et al. 2013).

The pharmacokinetic properties of the studied drugs showed significant differences between the two liver damage groups. One of the most relevant parameters in our study is the rate of hepatic metabolism. High hepatic metabolism (>50%) were found to be related to a higher frequency of hepatocellular damage. Previous studies have shown that drugs with hepatic metabolism >50% are related to a higher frequency of elevated transaminases but not to presentation of jaundice (Lammert, Bjornsson et al. 2010). However, a recent study in 2014 did not observe this effect on the type of damage with regards to liver metabolism rate, showing similar proportions of type of damage in drugs with high and low hepatic metabolism (Vuppalanchi, Gotur et al. 2014). It is possible that the discrepancy between our study and that of Vuppalanchi *et al* is due to the higher number of cases in the BDDCS category 4 (11%), in particular nitrofurantoin. In the current study <5% of the causative drugs were classified into the BDDCS category 4. Nitrofurantoin generally produces hepatocellular type of DILI, despite having low hepatic metabolism. However, nitrofurantoin also tends to produce DILI with autoimmune features and could therefore differ in the underlying mechanism compared to hepatocellular DILI without autoimmune features (de Boer, Kosinski et al. 2017).

Other pharmacokinetic factors that differed between the study groups included half-life, enterohepatic circulation and plasma protein binding. The drugs associated with hepatocellular DILI were found to have longer half-life, higher frequency of enterohepatic circulation and a higher proportion of plasma protein binding. These three properties all indicates a longer drug exposure time in DILI patients with hepatocellular damage compared with those presenting a cholestatic

pattern. The prolonged drug exposure in the body is mainly due to the high proportion of the drug that binds to plasma proteins, such as albumin, which prevents drug degradation and elimination. Furthermore, as the drug is excreted from the liver into the small intestine a portion of the drug will be recycled through the enterohepatic circulation. These processes favor a longer exposure of the liver to the drug and subsequently a higher risk of cell damage. Hence, this would support the hypothesis of direct damage to the liver by the drug in hepatocellular DILI. Contrary, drugs associated with cholestatic damage would be eliminated from the body more quickly. However, there is an extensive literature on cholestatic cases due to drugs with long half-life, such as sex hormones and steroids (Erlinger 1997; Larrey 2000; Bjornsson and Jonasson 2013). Nevertheless, this discrepancy may be explained by the existence of several mechanisms of cholestatic damage. Cholestatic damage can be divided into pure cholestasis and cholestasis with hepatitis (Velayudham and Farrell 2003). Pure cholestasis in DILI only includes cases caused by sex hormones and steroids. For this reason, cholestasis with hepatitis is the more commonly found form of cholestatic type of liver injury in DILI and could be considered as 'normal' cholestatic injury, while sex hormone/steroids-induced DILI are less common and may be considered as an 'exception'.

In summary, the results obtained in this study suggest that drugs that induce hepatocellular damage have a lipophilic nature, which allows them to enter more easily into the hepatocyte, where they are extensively metabolized, produce secondary RMs and could potentially cause ATP depletion. The detrimental effects of these processes could be modified by host factors. One example would be age. Advanced age is associated with decreased hepatic metabolism (Le Couteur and McLean 1998; Butler and Begg 2008). This could lead to decreased generation of RMs and lower energy expenditure. Subsequently, this would limit hepatocellular damage in the elderly DILI patients, while favoring a higher frequency of cholestatic damage.

18.2 Delayed onset in DILI

In this study, we have identified factors affecting the clinical presentation of DO in idiosyncratic DILI by analyzing drug properties, host factors and their interactions using a large prospective cohort of Spanish DILI patients. The model incorporating individual drug properties and host factors revealed three independent factors that influence the likelihood of DO: hepatic metabolism (drug), daily dose (host), associated diseases (host). Less than 50% hepatic drug metabolism, a daily dose >200 mg and absence of associated diseases were all found to increase the occurrence of DO in DILI. We also explored drug-host interactions using a two-tier approach and identified several host factors that significantly modify the effect of specific drug properties on the likelihood of DO, providing hypotheses for future research pertaining to drug-host interactions in defining clinical manifestations of DILI.

The drugs associated with DO in this study were mainly antibiotics, with 22% to 80% of the corresponding DILI cases presenting DO. Among them, AC was the principal drug with DO potential, corroborating earlier findings (Lucena, Andrade et al. 2006; Aithal, Watkins et al. 2011). The fact that antibiotics appear to be more commonly associated with DO is not surprising considering that antibiotics are generally prescribed for a short time period. Nevertheless, not all antibiotics produce DO. Isoniazid and ciprofloxacin, for example, did not produce DO in any of the corresponding cases enrolled in the Spanish DILI registry. Hence, DO manifestation appears to be triggered by specific drug properties in patients with certain attributes that makes them more susceptible to this phenotype. Contrary to previous assumptions, we did not find evidence to support that DO occurs due to prolonged retention of the drug or its metabolites in the body (Kaplowitz 2004). In contrast, the PDO drugs demonstrated a tendency towards having a shorter half-life than the nPDO drugs and a similar proportion of drugs with enterohepatic circulation as the nPDO drugs. In addition, the PDO drugs were found to have significantly lower hepatic metabolism and consequently a higher proportion

excreted in parental drug form. The PDO drugs also displayed a higher number of non-aromatic as well as heterorings rings. These properties have been related to higher solubility, lower lipophilicity and lower plasma protein binding (Ritchie, Macdonald et al. 2011). The PDO drug properties in the current study therefore speak in favor of faster excretion of the drug from the body with minimal hepatocyte interaction, rather than prolonged retention.

High daily dosage was identified as an important factor influencing the likelihood of DO in the model, with 97.5% of the patients developing DO having taken a daily dose of more than 200 mg. It is difficult to say if a higher drug dosage in fact increases the risk of DO or if this is the result of the majority of the DO cases being caused by antibiotics, which are generally taken at high doses over a short time period. Although no drug overdose is required, several studies suggest that idiosyncratic DILI is associated with drug dose (Lammert, Einarsson et al. 2008; Lucena, Andrade et al. 2009; Bjornsson, Bergmann et al. 2013). It is assumed that some form of cellular stress threshold must be overcome to initiate cellular stress and DILI development, however the precise drug dose required to reaching such a threshold may vary between individuals (Han, Dara et al. 2013). High daily dose in conjunction with high lipophilicity has also been demonstrated to increase the risk of DILI development (Chen, Borlak et al. 2013). One may hypothesize that DO drugs require a higher daily dose due to their low metabolism and rapid excretion in order to reach a cellular stress threshold and induce hepatocyte damage and subsequent immune response.

Another important factor influencing the likelihood of DO was associated diseases, whereby the absence of associated diseases increased the likelihood of DO. The effect of associated diseases on DILI is largely unknown with limited studies performed to date. However, a recent DILI epidemiological study found that approximately 74% of patients had some form of comorbid conditions (Baekdal, Ytting et al. 2016). This proportion is similar to that of the current study. The negative correlation between associated conditions and DO could be a reason for the low proportion of DILI with DO in general, due to the common occurrence of associated conditions in DILI patients. The mechanism by which associated

conditions could influence DO is unclear. A possible explanation could be that patients without associated diseases may exert sound cellular adaptation mechanisms under drug-induced cellular stress, and subsequently delay the appearance of manifestations. The shorter treatment duration mostly seen in DO DILI cases would collaborate with this theory as the toxicological effects of the drug would eventually overtake the cellular defense mechanisms, resulting in symptomatic liver injury after drug cessation. Delayed DILI manifestations may also occur during longer or even chronic treatments of certain drugs. However, in such cases, manifestations would appear during the treatment and the cases would consequently be considered as having a long latency rather than DO. Further studies are, however, warranted to refine and confirm the hypothesis.

In this study, impacts of co-medications were not fully investigated due to the limited size of the DO population. However, concomitant medications may affect mechanisms involved in host response to toxic insults (i.e., cellular adaptation, injury, immune response, inflammation and repair) and could consequently influence DILI phenotypes, including DO. Previous data mining analyses have demonstrated associations between co-medications and DILI severity or reporting frequencies, suggesting possible modulations of DILI manifestations and severity by certain co-medications (Suzuki, Yuen et al. 2009).

We also investigated possible drug-host interactions influencing the delayed DILI manifestation. To date, there are no established methodologies to explore drug-host interactions in DILI. We implemented a two-tier approach to explore two-factor (a drug factor and a host factor) interactions, whereby we identified four interactions that may influence the likelihood of delayed DILI onset. Younger patients and/or females were found to be less likely to manifest delayed DILI onset when they take drugs without mitochondrial toxicity. Both elements, female sex and age, have been related to hepatocellular damage and more severe interface hepatitis (Lucena, Andrade et al. 2009; Suzuki, Barnhart et al. 2017). Sex, sex hormones, and aging are known to influence innate as well as adaptive immune responses (Bouman 2005, Shaw 2010). Differences in immune response to a specific

toxicological drug property may define latency of DILI development. Assuming that drugs without currently known mitochondrial liability are less likely to affect mitochondrial function, DILI patients induced by such drugs may have a better cellular energy supply compared with DILI patients induced by mitochondrial hazardous drugs, and subsequently more capable of counteracting toxicological effects and delay the appearance of DILI manifestations. It should be pointed out that the cellular effect of mitochondrial hazardous drugs can vary depending on individual host factors, such as genetic variations comorbid conditions in addition to sex and age (Chen, Suzuki et al. 2015). Further studies are required to delineate possible mechanisms underlying the discovered interactions.

Underlying cardiac diseases was also identified as a modifier for the effects of drugs with mitochondrial liability and drugs with high Pauling electronegativity on DO, although these interactions are difficult to explain based on our current knowledge. As our analysis assessed two-factor interactions, whether having cardiac diseases is a true effect modifier or these identified interactions were confounded by other co-occurring factors (e.g., older age, male sex, concomitant medications) remains uncertain (Strait and Lakatta 2012). New methodologies to discover multifactorial risks are needed to further address the identified interactions.

Our study has strengths. It is the first study to investigate host factors, drug properties, and their interactions influencing a DILI phenotype. The well-characterized DILI cases assessed in this study allowed identifying significant factors associated with delayed manifestation of DILI and generating interesting hypotheses pertaining to diverse latency in DILI manifestation. Our study also has weaknesses. The size of the DO population was not sufficient to assess impacts of individual comorbidities or co-medications or their interactions. In addition, our current methodology does not allow assessing multifactorial risks. Further developments of novel investigational approaches are needed to determine how host factors, drug properties, and their specific interactions play a role in diverse DILI manifestations.

18.3 Severity in DILI

The severity of reactions in drug-induced liver damage is one of the most unpredictable and important factors in DILI. Attempts have been made in developing methods to determine possible damage progression using biochemical parameters. The most widely used method today is Hy's law, which indicates that DILI cases with hepatocellular damage and jaundice have a greater risk of progressing to liver transplantation or death (Reuben 2004). A more recent study suggests that additional biochemical parameters can improve the accuracy of DILI outcome predictions (Robles-Diaz, Lucena et al. 2014). The present study aimed to clarify in more depths which factors may be related to severity.

Increased hepatic metabolism and a higher excretion rate of metabolized drugs were found to contribute to increased severity. These properties are also more frequent in hepatocellular damage in DILI as seen in the first sub-analysis of this work. It is well known that DILI fatality is predominantly associated with hepatocellular damage, with cholestatic cases being less likely to have worse outcomes (Reuben 2004; Andrade, Lucena et al. 2005). Hence, the findings of the current study appear to be more related to the type of liver damage than to the severity of liver damage. When analyzing host factors that could condition the severity, it was found that concomitant medication of ATC type J (anti-infectives) could be an outcome predictor. This would indicate that DILI patients treated for concomitant infectious diseases are more likely to develop more serious adverse reactions. This may be due to the fact that the infection itself weakens the organism and favors the onset of more serious damage, or concomitant anti-infective drugs may share some ability to increase the severity of the damage. Antibiotics are known to be a common cause of DILI (Andrade, Lopez-Ortega et al. 2008; Chalasani, Fontana et al. 2008), however, the occurrence of severe cases is low compared to their consumption (Polson 2007), besides their role as concomitant medications is unknown. These drugs could cause changes in the

body such as elimination of bacterial flora and/or release of antigens or endotoxin from the microorganisms, which may potentially increase the severity of a DILI reaction (Cani, Bibiloni et al. 2008). Previous studies have shown that an imbalance in the intestinal bacterial flora could lead to onset of liver diseases such as non-alcoholic fatty liver disease, as well as induce changes in the immune system and metabolism (Machado and Cortez-Pinto 2016; Tilg, Cani et al. 2016). It should be noted that the cohort of fatal/transplant DILI cases in the current study was small and any subdivision based on concomitant medications further reduced the number of analysed cases. Although a significant difference was detected between HS and LS cases with concomitant anti-infective treatments the number of cases involved was too low to draw any solid conclusions. Hence, the effect of concomitant anti-infective treatments on DILI severity requires further studies in independent DILI cohorts.

19. CONCLUSIONS

CONCLUSION 1: TYPES OF LIVER INJURY

- a. Within the host factors, age is the determining factor of the phenotypic expression of the damage. Hepatocellular damage predominates in young patients, whereas patients aged ≥ 60 years present a higher frequency of cholestatic damage. In addition, the history of cardiovascular disease would condition a greater susceptibility to the development of cholestatic damage.
- b. The main drug properties that modulate the expression of toxic liver damage are liposolubility, degree of binding protein, extent of hepatic metabolism and presence of enterohepatic circulation. Hepatocellular damage would be determined by drugs that have higher lipophilicity, high plasma protein binding and significant hepatic metabolism. Alternatively, cholestatic damage would be related to drugs more soluble in water, with poor protein binding and poor hepatic metabolism.
- c. Other physicochemical characteristics identified as potential modulators of the damage are the presence of rings with heteroatoms in the chemical structure, the presence of sulfur atoms and / or the hybridization rate of orbitals.
- d. The interaction between host factors and drug properties suggests that advanced age and consumption of drugs with poor hepatic metabolism increase the risk of cholestatic damage in susceptible individuals. Contrary to expectations, in young patients the risk of developing hepatocellular damage does not change depending on the rate of hepatic metabolism.

CONCLUSION 2: DELAYED INITIATION OF SYMPTOMS

- a) Drugs with potential to induce delayed onset have shorter half-life, lower hepatic metabolism and have a higher proportion excreted in parent form than drugs without delayed onset potential. These properties would be related to higher solubility, lower lipophilicity and lower plasma protein binding.
- b) Three independent factors appear to influence the likelihood of delayed symptom onset: hepatic metabolism (drug), daily dose (host) and pre-existing diseases (host).
- c) Results derived from the interactions between host factors and pharmacological drug properties suggest that the interaction between mitochondrial liability and age, sex or underlying cardiac diseases modulates the risk of hepatotoxicity with delayed onset of symptoms. Pauling electronegativity combined with underlying cardiac diseases similarly affects the probability of delayed onset.

CONCLUSION 3: SEVERITY OF LIVER DAMAGE

- a) Drugs with high hepatic metabolism and a higher rate of metabolized drug excretion seem to contribute to the increase in severity. This observation could be related to the higher frequency of hepatocellular cases, which are associated with a greater severity of the damage.
- b) The presence of infectious diseases and / or the consumption of anti-infective comedication increases the risk of developing a more severe hepatic toxicity episode.

Finally, the identification of host factor-drug property interactions may provide insight into the underlying mechanisms responsible for the heterogeneity of clinical presentations in DILI. Furthermore, the generated hypotheses in the current study should be further explored in independent DILI cohorts.

REFERENCES

- Aithal, G. P., P. B. Watkins, et al. (2011). "Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury." *Clin Pharmacol Ther* **89**(6): 806-815.
- Amidon, G. L., H. Lennernas, et al. (1995). "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability." *Pharm Res* **12**(3): 413-420.
- Andrade, R. J., S. Lopez-Ortega, et al. (2008). "Idiosyncratic drug hepatotoxicity: a 2008 update." *Expert Rev Clin Pharmacol* **1**(2): 261-276.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (2004). "HLA class II genotype influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease." *Hepatology* **39**(6): 1603-1612.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (2005). "Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period." *Gastroenterology* **129**(2): 512-521.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (2005). "Drug-Induced Liver Injury: An Analysis of 461 Incidences Submitted to the Spanish Registry Over a 10-Year Period." *Gastroenterology* **129**(2): 512-521.
- Andrade, R. J., M. I. Lucena, et al. (2002). "Chronic hepatitis C, ibuprofen, and liver damage." *Am J Gastroenterol* **97**(7): 1854-1855.
- Baekdal, M., H. Ytting, et al. (2016). "Drug-induced liver injury: a cohort study on patients referred to the Danish transplant center over a five year period." *Scand J Gastroenterol*: 1-5.
- Balaban, A. T., A. Beteringhe, et al. (2007). "Four new topological indices based on the molecular path code." *J Chem Inf Model* **47**(3): 716-731.
- Benet, L. Z., F. Broccatelli, et al. (2011). "BDDCS applied to over 900 drugs." *AAPS J* **13**(4): 519-547.
- Benichou, C. (1990). "Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting." *J Hepatol* **11**(2): 272-276.
- Bjornsson, E. S., O. M. Bergmann, et al. (2013). "Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland." *Gastroenterology* **144**(7): 1419-1425, 1425 e1411-1413; quiz e1419-1420.
- Bjornsson, E. S. and J. G. Jonasson (2013). "Drug-induced cholestasis." *Clin Liver Dis* **17**(2): 191-209.
- Bolton, J. L., M. A. Trush, et al. (2000). "Role of quinones in toxicology." *Chem Res Toxicol* **13**(3): 135-160.
- Burch, D. (2008). "Martindale - The complete drug reference, 35th edition." *Tls-the Times Literary Supplement*(5471): 12-12.
- Butler, J. M. and E. J. Begg (2008). "Free drug metabolic clearance in elderly people." *Clin Pharmacokinet* **47**(5): 297-321.
- Cani, P. D., R. Bibiloni, et al. (2008). "Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice." *Diabetes* **57**(6): 1470-1481.
- Carlson, G. P. (2011). "Comparison of styrene oxide enantiomers for hepatotoxic and pneumotoxic effects in microsomal epoxide hydrolase-deficient mice." *J Toxicol Environ Health A* **74**(6): 347-350.
- Chalasani, N., R. J. Fontana, et al. (2008). "Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States." *Gastroenterology* **135**(6): 1924-1934, 1934 e1921-1924.
- Chen, M., J. Borlak, et al. (2013). "High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury." *Hepatology* **58**(1): 388-396.

- Chen, M., J. Borlak, et al. (2016). "A Model to predict severity of drug-induced liver injury in humans." *Hepatology* **64**(3): 931-940.
- Chen, M., A. Suzuki, et al. (2015). "Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors." *J Hepatol* **63**(2): 503-514.
- Chiang, J. Y. (2009). "Bile acids: regulation of synthesis." *J Lipid Res* **50**(10): 1955-1966.
- Danan, G. and C. Benichou (1993). "Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries." *J Clin Epidemiol* **46**(11): 1323-1330.
- Dara, L., H. Johnson, et al. (2015). "Receptor interacting protein kinase 1 mediates murine acetaminophen toxicity independent of the necrosome and not through necroptosis." *Hepatology* **62**(6): 1847-1857.
- de Abajo, F. J., D. Montero, et al. (2004). "Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study." *Br J Clin Pharmacol* **58**(1): 71-80.
- de Boer, Y. S., A. S. Kosinski, et al. (2017). "Features of Autoimmune Hepatitis in Patients With Drug-induced Liver Injury." *Clin Gastroenterol Hepatol* **15**(1): 103-112 e102.
- deLemos, A. S., M. Ghabril, et al. (2016). "Amoxicillin-Clavulanate-Induced Liver Injury." *Dig Dis Sci* **61**(8): 2406-2416.
- Donaldson, P. T., A. K. Daly, et al. (2010). "Human leucocyte antigen class II genotype in susceptibility and resistance to co-amoxiclav-induced liver injury." *J Hepatol* **53**(6): 1049-1053.
- Dreifuss, F. E., N. Santilli, et al. (1987). "Valproic acid hepatic fatalities: a retrospective review." *Neurology* **37**(3): 379-385.
- Durand, F., D. Pessayre, et al. (1995). "Antituberculous therapy and acute liver failure." *Lancet* **345**(8958): 1170.
- Erlinger, S. (1997). "Drug-induced cholestasis." *J Hepatol* **26 Suppl 1**: 1-4.
- Falvey, D. E. (2005). Nitrenium Ions. *Reactive Intermediate Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.: 593-650.
- Faulkner, L., X. Meng, et al. (2014). "The importance of hapten-protein complex formation in the development of drug allergy." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **14**(4): 293-300.
- Feng, M., B. Tang, et al. (2016). "Sulfur Containing Scaffolds in Drugs: Synthesis and Application in Medicinal Chemistry." *Curr Top Med Chem* **16**(11): 1200-1216.
- Fontana, R. J., L. B. Seeff, et al. (2010). "Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: summary of a clinical research workshop." *Hepatology* **52**(2): 730-742.
- Fouad, Y. M. and R. Yehia (2014). "Hepato-cardiac disorders." *World J Hepatol* **6**(1): 41-54.
- Fountain, F. F., E. Tolley, et al. (2005). "Isoniazid hepatotoxicity associated with treatment of latent tuberculosis infection: a 7-year evaluation from a public health tuberculosis clinic." *Chest* **128**(1): 116-123.
- Graham, D. J., L. Green, et al. (2003). "Troglitazone-induced liver failure: a case study." *Am J Med* **114**(4): 299-306.
- Gu, X. and J. E. Manautou (2012). "Molecular mechanisms underlying chemical liver injury." *Expert Rev Mol Med* **14**: e4.
- Han, D., L. Dara, et al. (2013). "Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria." *Trends Pharmacol Sci* **34**(4): 243-253.
- Han, D., M. Shinohara, et al. (2010). "Signal transduction pathways involved in drug-induced liver injury." *Handb Exp Pharmacol*(196): 267-310.
- Hanley, J. A. and B. J. McNeil (1982). "The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve." *Radiology* **143**(1): 29-36.

- Hong, H., Q. Xie, et al. (2008). "Mold(2), molecular descriptors from 2D structures for chemoinformatics and toxicoinformatics." *J Chem Inf Model* **48**(7): 1337-1344.
- Hosoya, H. (2007). "Important mathematical structures of the topological index Z for tree graphs." *J Chem Inf Model* **47**(3): 744-750.
- Hunt, C. M., W. R. Westerkam, et al. (1992). "Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A." *Biochem Pharmacol* **44**(2): 275-283.
- Ingelman-Sundberg, M. and C. Rodriguez-Antona (2005). "Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1460): 1563-1570.
- Kaplowitz, N. (2004). "Drug-induced liver injury." *Clin Infect Dis* **38** Suppl 2: S44-48.
- Kaplowitz, N. (2005). "Idiosyncratic drug hepatotoxicity." *Nat Rev Drug Discov* **4**(6): 489-499.
- Kaplowitz, N. (2013). "Avoiding idiosyncratic DILI: two is better than one." *Hepatology* **58**(1): 15-17.
- Knowles, S. R., J. Uetrecht, et al. (2000). "Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes." *Lancet* **356**(9241): 1587-1591.
- Lammert, C., E. Bjornsson, et al. (2010). "Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events." *Hepatology* **51**(2): 615-620.
- Lammert, C., S. Einarsson, et al. (2008). "Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals." *Hepatology* **47**(6): 2003-2009.
- Larrey, D. (2000). "Drug-induced liver diseases." *J Hepatol* **32**(1 Suppl): 77-88.
- Le Couteur, D. G. and A. J. McLean (1998). "The aging liver. Drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis." *Clin Pharmacokinet* **34**(5): 359-373.
- Levy, C. (2013). *Cholestatic Liver Diseases, An Issue of Clinics in Liver Disease*, Elsevier Health Sciences.
- Liu, R., H. Sun, et al. (2001). "Development of quantitative structure-property relationship models for early ADME evaluation in drug discovery. 2. Blood-brain barrier penetration." *J Chem Inf Comput Sci* **41**(6): 1623-1632.
- Livertox. (2015). "Livertox." 2015.
- Lucena, M. I., R. J. Andrade, et al. (2009). "Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex." *Hepatology* **49**(6): 2001-2009.
- Lucena, M. I., R. J. Andrade, et al. (2000). "Trovafloracin-induced acute hepatitis." *Clin Infect Dis* **30**(2): 400-401.
- Lucena, M. I., R. J. Andrade, et al. (2006). "Prolonged cholestasis after raloxifene and fenofibrate interaction: A case report." *World J Gastroenterol* **12**(32): 5244-5246.
- Lucena, M. I., R. Camargo, et al. (2001). "Comparison of two clinical scales for causality assessment in hepatotoxicity." *Hepatology* **33**(1): 123-130.
- Lucena, M. I., M. Molokhia, et al. (2011). "Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA class I and II alleles." *Gastroenterology* **141**(1): 338-347.
- Machado, M. V. and H. Cortez-Pinto (2016). "Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet." *Int J Mol Sci* **17**(4): 481.
- Maria, V. A. and R. M. Victorino (1997). "Development and validation of a clinical scale for the diagnosis of drug-induced hepatitis." *Hepatology* **26**(3): 664-669.
- Medina-Caliz, I., M. Robles-Diaz, et al. (2016). "Definition and risk factors for chronicity following acute idiosyncratic drug-induced liver injury." *J Hepatol* **65**(3): 532-542.
- Mitchell, S. J. and S. N. A. P. Hilmer (2010). "Drug-induced liver injury in older adults." *Ther Adv Drug Saf* **1**(2): 65-77.

- Moller, S. and M. Bernardi (2013). "Interactions of the heart and the liver." Eur Heart J **34**(36): 2804-2811.
- Molleston, J. P., R. J. Fontana, et al. (2011). "Characteristics of idiosyncratic drug-induced liver injury in children: results from the DILIN prospective study." J Pediatr Gastroenterol Nutr **53**(2): 182-189.
- Morgan, R. E., M. Trauner, et al. (2010). "Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development." Toxicol Sci **118**(2): 485-500.
- Obach, R. S., A. S. Kalgutkar, et al. (2008). "Can in vitro metabolism-dependent covalent binding data in liver microsomes distinguish hepatotoxic from nonhepatotoxic drugs? An analysis of 18 drugs with consideration of intrinsic clearance and daily dose." Chem Res Toxicol **21**(9): 1814-1822.
- Ortiz de Montellano, P. R. and S. D. Nelson (2011). "Rearrangement reactions catalyzed by cytochrome P450s." Arch Biochem Biophys **507**(1): 95-110.
- Park, B. K., H. Laverty, et al. (2011). "Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity." Chem Biol Interact **192**(1-2): 30-36.
- Pauli-Magnus, C. and P. J. Meier (2006). "Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis." Hepatology **44**(4): 778-787.
- Perdices, E. V., I. Medina-Caliz, et al. (2014). "Hepatotoxicity associated with statin use: analysis of the cases included in the Spanish Hepatotoxicity Registry." Rev Esp Enferm Dig **106**(4): 246-254.
- Pessayre, D., B. Fromenty, et al. (2012). "Central role of mitochondria in drug-induced liver injury." Drug Metab Rev **44**(1): 34-87.
- Pfeifer, N. D., K. B. Harris, et al. (2013). "Determination of intracellular unbound concentrations and subcellular localization of drugs in rat sandwich-cultured hepatocytes compared with liver tissue." Drug Metab Dispos **41**(11): 1949-1956.
- Polson, J. E. (2007). "Hepatotoxicity due to antibiotics." Clin Liver Dis **11**(3): 549-561, vi.
- Reuben, A. (2004). "Hy's law." Hepatology **39**(2): 574-578.
- Ritchie, T. J., S. J. Macdonald, et al. (2011). "The impact of aromatic ring count on compound developability: further insights by examining carbo- and hetero-aromatic and -aliphatic ring types." Drug Discov Today **16**(3-4): 164-171.
- Robles-Diaz, M., M. Garcia-Cortes, et al. (2015). "The value of serum aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transpeptidase as biomarkers in hepatotoxicity." Liver Int.
- Robles-Diaz, M., M. I. Lucena, et al. (2014). "Use of Hy's law and a new composite algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury." Gastroenterology **147**(1): 109-118 e105.
- Roy, B., A. Chowdhury, et al. (2001). "Increased risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in individuals with glutathione S-transferase M1 'null' mutation." J Gastroenterol Hepatol **16**(9): 1033-1037.
- Schenker, S., R. R. Martin, et al. (1999). "Antecedent liver disease and drug toxicity." J Hepatol **31**(6): 1098-1105.
- Schmid, M. M., R. W. Freudenmann, et al. (2013). "Non-fatal and fatal liver failure associated with valproic acid." Pharmacopsychiatry **46**(2): 63-68.
- Seeff, L. B., B. A. Cuccherini, et al. (1986). "Acetaminophen hepatotoxicity in alcoholics. A therapeutic misadventure." Ann Intern Med **104**(3): 399-404.
- Seeto, R. K., B. Fenn, et al. (2000). "Ischemic hepatitis: clinical presentation and pathogenesis." Am J Med **109**(2): 109-113.
- Singlas, E. (1995). "[Clinical pharmacokinetics of azithromycin]." Pathol Biol (Paris) **43**(6): 505-511.

- Siramshetty, V. B., J. Nickel, et al. (2016). "WITHDRAWN--a resource for withdrawn and discontinued drugs." *Nucleic Acids Res* **44**(D1): D1080-1086.
- Stepan, A. F., D. P. Walker, et al. (2011). "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* **24**(9): 1345-1410.
- Strait, J. B. and E. G. Lakatta (2012). "Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure." *Heart Fail Clin* **8**(1): 143-164.
- Suarez-Ortega, S., A. Puente-Fernandez, et al. (2013). "[Constitutional syndrome: clinical entity or a mixed bag]." *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* **51**(5): 532-535.
- Suzuki, A., H. Barnhart, et al. (2017). "Associations of gender and a proxy of female menopausal status with histological features of drug-induced liver injury." *Liver Int*.
- Suzuki, A., N. Yuen, et al. (2009). "Co-medications that modulate liver injury and repair influence clinical outcome of acetaminophen-associated liver injury." *Clin Gastroenterol Hepatol* **7**(8): 882-888.
- Teoh, N., I. Leclercq, et al. (2003). "Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning." *Hepatology* **37**(1): 118-128.
- Tilg, H., P. D. Cani, et al. (2016). "Gut microbiome and liver diseases." *Gut*.
- Tujios, S. and R. J. Fontana (2011). "Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**(4): 202-211.
- Utrecht, J. P. (1999). "New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the "danger hypothesis" and innate immune system." *Chem Res Toxicol* **12**(5): 387-395.
- Ulzurrun, E., C. Stephens, et al. (2013). "Role of chemical structures and the 1331T>C bile salt export pump polymorphism in idiosyncratic drug-induced liver injury." *Liver Int* **33**(9): 1378-1385.
- Urban, T. J., A. K. Daly, et al. (2014). "Genetic basis of drug-induced liver injury: present and future." *Semin Liver Dis* **34**(2): 123-133.
- van der Ven, A. J., P. P. Koopmans, et al. (1991). "Adverse reactions to co-trimoxazole in HIV infection." *Lancet* **338**(8764): 431-433.
- Velayudham, L. S. and G. C. Farrell (2003). "Drug-induced cholestasis." *Expert Opin Drug Saf* **2**(3): 287-304.
- Vuppalanchi, R., R. Gotur, et al. (2014). "Relationship between characteristics of medications and drug-induced liver disease phenotype and outcome." *Clin Gastroenterol Hepatol* **12**(9): 1550-1555.
- Warner, D. J., H. Chen, et al. (2012). "Mitigating the inhibition of human bile salt export pump by drugs: opportunities provided by physicochemical property modulation, in silico modeling, and structural modification." *Drug Metab Dispos* **40**(12): 2332-2341.
- Waxman, D. J. and M. G. Holloway (2009). "Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes." *Mol Pharmacol* **76**(2): 215-228.
- Weber, L. W., M. Boll, et al. (2003). "Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model." *Crit Rev Toxicol* **33**(2): 105-136.
- Wu, C. Y. and L. Z. Benet (2005). "Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system." *Pharm Res* **22**(1): 11-23.
- Yap, C. W. (2011). "PaDEL-descriptor: an open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints." *J Comput Chem* **32**(7): 1466-1474.
- Yokoi, T. (2010). "Troglitazone." *Handb Exp Pharmacol*(196): 419-435.

Zhang, J., U. Doshi, et al. (2016). "Evaluation of multiple mechanism-based toxicity endpoints in primary cultured human hepatocytes for the identification of drugs with clinical hepatotoxicity: Results from 152 marketed drugs with known liver injury profiles." Chem Biol Interact **255**: 3-11.

QUALITY INDICATORS

(ANNEX)

The influence of drug properties and host factors on delayed onset of symptoms in drug-induced liver injury

A Gonzalez-Jimenez¹, K McEuen², M Chen², A Suzuki^{3,4}, M Slim¹, M Robles-Diaz¹, I Medina-Caliz¹, MI Lucena^{1§}, C Stephens^{1*}, RJ Andrade^{1*}

¹Unidad de Gestión Clínica del Aparato Digestivo, Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, CIBERehd, Málaga, Spain

²Division of Bioinformatics and Biostatistics, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR, USA

³Gastroenterology, Duke University, Durham, NC, USA

⁴Gastroenterology, Durham VA Medical Center, Durham, NC, USA

*These authors have jointly supervised the work (co-seniors)

§Corresponding author

Corresponding authors:

M Isabel Lucena

Facultad de Medicina, Universidad de Málaga

Boulevard Louis Pasteur 32, 29071 Málaga, Spain

Tel: (+34) 952 131 572

Fax: (+34) 952 131 568

Email: lucena@uma.es

Word count: 3411

Number of references: 31

Number of tables: 4

Number of figures: 1

Number of supplementary tables: 1

Key words: Hepatotoxicity, datamining, drug property-host factor interactions

Disclaimer: The views expressed in this manuscript do not necessarily represent those of the U.S. Food and Drug Administration

ABSTRACT

Most patients with drug-induced liver injury (DILI) manifest clinical symptoms while on therapy; however, some develop symptoms several days or even weeks after drug cessation (i.e. delayed onset, DO). Factors contributing to the DILI phenotype are currently unknown. We explored potential factors contributing to DO, by analyzing culprit drug properties, host factors and their interactions in a large patient population from the Spanish DILI Registry. Drug property of <50% hepatic metabolism, a high daily dose of >200 mg and the absence of pre-existing conditions in a patient were independently associated with DO. Drug properties of mitochondrial liability and high Pauling electronegativity were also associated with DO, but depending on specific host factors such as age (cut-off 60 years), gender, and pre-existing cardiac diseases. This study used a novel investigational approach, which raised new hypotheses on drug-host interactions that may contribute to diverse DILI manifestations.

INTRODUCTION

Drug-induced liver injury (DILI) is an important health issue. This type of adverse reaction is one of the main causes for early drug development termination and pharmaceutical regulatory actions, such as black box warnings and post-marketing drug withdrawals in Europe and the United States. The underlying mechanism of idiosyncratic DILI is still unknown. However, it is generally accepted that DILI is a complex and multifactorial process. Physicochemical drug properties such as lipophilicity, host factors such as age, sex and genetic variability, and environmental factors such as co-medications or alcohol consumption are likely involved in modulating the risks and phenotypic presentations of idiosyncratic DILI.¹⁻⁴

Due to the lack of specific symptoms and diagnostic biomarkers, clinical diagnosis of idiosyncratic DILI largely depends on the exclusion of alternative causes and the establishment of a compatible temporal relationship between drug administration and DILI development. In most cases where the reaction appears while the patient is on the drug treatment, there is an evident temporal relationship. However, in some cases the manifestation of the reaction is delayed and does not occur until several days or even months after treatment cessation. This is often referred to as delayed onset (DO), and can complicate the DILI diagnosis and its clinical management. The drug most commonly associated with DO is amoxicillin-clavulanate (AC).⁵ Cases of DILI with DO of symptoms due to other drugs, such as trovafloxacin, telithromycin and azithromycin have also been published, but are less frequent.⁶⁻⁸ Although the mechanism behind DO is unknown, it has been postulated that DO may be attributed

to slower development of immune responses to the drug and/or prolonged retention of the drug in the body.⁹ Hence, we hypothesized that drugs with extensive enterohepatic circulation may be more prone to present delayed onset in DILI.

In this study we aimed to identify potential DO modifiers by analyzing drug properties, host factors and interactions between these two groups using a large patient population from the Spanish DILI Registry prospective database. The determination of such modifiers and interactions could provide insight into the specific mechanisms behind DO of symptoms in idiosyncratic DILI.

RESULTS

To identify DILI causative drugs with and without potential to produce DO (PDO and nPDO, respectively) time to onset was compared with time of drug cessation in all the DILI cases included in the current study. Drugs were then classified into two groups, PDO and nPDO, following the definitions described in the methods below. A total of 10 PDO drugs (11 active ingredients) and 32 nPDO drugs (33 active ingredients) was identified (Supplementary table 1). The PDO and nPDO drugs were associated with 204 and 209 DILI cases, respectively. Amoxicillin-clavulanate (AC) was the most prominent drug among the PDO drugs with 141 corresponding cases, of which 79 cases (56%) were associated with DO. Of the 204 cases induced by PDO drugs, 95 (46%) presented DO, and had a latency of 2-52 days after treatment cessation. The remaining 109 cases presented their first symptoms while receiving drugs.

Drug properties associated with delayed onset potential

Drug classes

The most frequent therapeutic class of the PDO drugs was antiinfectives, especially antibacterials, (70%), followed by anti-inflammatory drugs (30%). The nPDO drugs, on the other hand, were predominantly nervous system drugs (27%), followed by cardiovascular (21%) and alimentary tract (15%) drugs.

Physicochemical properties

To identify drug properties associated with a potential to cause DO, physicochemical drug properties were compared between the PDO and nPDO drug groups. The chemical structure of the PDO drugs were found to contain a significantly higher number of total rings (3.3 ± 1.3 vs 2.3 ± 1.1 , $p=0.0343$) and heterorings (2.1 ± 1.2 vs 1.2 ± 0.8 , $p=0.0104$) than the nPDO drugs. The PDO drugs also tended to have shorter total chains (3.2 ± 1.6 vs 6.1 ± 5.4 atoms, $p=0.0876$) as well as aliphatic chains (0.6 ± 1.1 vs 2.4 ± 3.1 atoms, $p=0.0738$) in their structures. Furthermore, the PDO drugs had higher molecular weight than the nPDO drugs, although the difference did not reach statistical significance (412 ± 180 vs 328 ± 134 g/mol, $p=0.0633$) (Table 1).

Pharmacokinetic and other properties

The PDO drugs included a higher proportion of drugs with <50% hepatic metabolism (55 vs 19%, $p=0.0190$) and a higher proportion of drugs with

≥50% excretion in parent form (50 vs 6%, $p=0.0015$) than the nPDO drugs. Based on the Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System (BDDCS), we observed significant differences between the PDO and nPDO groups ($p=0.0001$). Drugs of BDDCS class 1 (high metabolism/high solubility) and 2 (high metabolism/low solubility) were more prevalent in the nPDO group (42% vs 0% and 42% vs. 20%, respectively), while drugs of class 3 (low metabolism/high solubility) predominated in the PDO group (60% vs 6%). No other physicochemical properties analyzed such as half-life, protein binding, lipophilicity (LogP) and production of reactive metabolites showed significant differences between the two groups (Table 1).

Host factors associated with delayed onset

To assess the role of host factors in DILI with DO we first compared cases with and without DO in cases induced by PDO drugs (total 204 cases). Among the cases corresponding to the PDO drugs, the DO cases exhibited higher daily dose (2004 vs 1018 mg, $p=0.0082$), more frequent jaundice (82 vs 70%, $p=0.0251$), and a lower proportion of patients with pre-existing disease conditions (53 vs 67%, $p=0.0393$). The DO cases also tended to manifest eosinophilia more frequently when compared to the cases without DO (38 vs 24%, $p=0.0615$). These differences were also detected when comparing the aforementioned two groups induced by PDO drugs as well as a third group of 209 DILI cases induced by nPDO drugs (Table 2). In addition, the cases induced by nPDO drugs were found to have longer duration of treatment (40 vs 8-9 days, $p=0.0002$) and time

to onset (49 vs 7-19 days, $p=0.0001$) compared to the cases induced by PDO drugs.

Comparing the cases with and without DO, both of which were induced by PDO drugs, no significant difference in liver injury pattern distribution was detected ($p=0.8004$). When including the cases without DO, which were induced by nPDO drugs, liver injury patterns were significantly different among the three groups group ($p=0.0001$). However, this difference did not remain significant when AC cases were excluded from the analysis, suggesting that the difference was attributed to the high number of cholestatic/mixed cases associated with AC. Similarly, the increased frequency of jaundice in DO cases was not observed when AC cases were excluded. (Table 2).

Multivariable model to predict delayed onset of DILI including drug properties and host factors

The drug properties and host factors that showed significant associations with delayed onset (total rings, heterorings, hepatic metabolism, parent drug excretion, BDDCS classification, daily dose, jaundice, eosinophilia, pre-existing diseases, liver injury pattern and severity) were then evaluated in a multiple logistic regression model to assess their effect sizes and predictive performance. Using a backward step elimination approach, three variables were found to increase the likelihood of delayed onset: absence of pre-existing diseases (OR 1.91 [95% confidence interval (CI): 1.08-3.39], $p=0.0245$), culprit drug daily dose $\geq 200\text{mg}$ (OR 2.89 [95% CI: 1.25-7.58], $p=0.0123$) and hepatic metabolism $<50\%$ (OR 23.98 [95%

CI: 10.84-63.68], $p=0.0001$) (Table 3). The calculated R^2 for this model was 0.3034 and the area under the ROC curve 0.8459 (Figure 1). The bootstrap procedure showed minimal overfitting (0.0057).

Drug-host interactions in delayed onset of DILI

Next, we sought to explore potential drug-host interactions in delayed onset of DILI. In the first exploratory analysis (screening of potential host-drug interactions), 50 of the 2684 drug-host pairs were identified as statistically significant. In the subsequent characterization analysis, four pairs were confirmed to have significant interactions in delayed onset. Three host factors, age (cut-off 60 years), gender, and pre-existing cardiac diseases, were identified as significant effect modifiers for drugs with mitochondrial liability. Pre-existing cardiac diseases were also identified as a significant effect modifier for drugs with high Pauling electronegativity (Table 4).

DISCUSSION

In this study, we have identified factors affecting the clinical presentation of DO in idiosyncratic DILI by analyzing drug properties, host factors and their interactions using a large patient population from the Spanish DILI Registry. The model incorporating individual drug properties and host factors revealed three independent factors that influence the likelihood of DO: hepatic metabolism (drug), daily dose (host) and pre-existing diseases (host). Less than 50% hepatic drug metabolism, a daily dose >200 mg and absence of pre-existing diseases were all found to increase

the occurrence of DO in DILI. We also explored drug-host interactions using a two-tier approach and identified several host factors that significantly modify the effect of specific drug properties on the likelihood of DO, providing hypotheses for future research pertaining to drug-host interactions in defining clinical manifestations of DILI.

The drugs associated with DO in this study were mainly antibiotics, with 22% to 80% of the corresponding DILI cases presenting DO (Supplementary table 1). Among the drugs with DO potential, AC was the principal drug, corroborating earlier findings.^{5,10} The fact that antibiotics appear to be more commonly associated with DO is not surprising considering that antibiotics are generally prescribed for a short time period. Nevertheless, not all antibiotics produce DO. Isoniazid and ciprofloxacin, for example, did not produce DO in any of the corresponding cases enrolled in the Spanish DILI registry. Hence, DO manifestation appears to be triggered by specific drug properties in patients with certain attributes that makes them more susceptible to this phenotype. Contrary to previous assumptions, we did not find evidence to support that DO occurs due to prolonged retention of the drug or its metabolites in the body.⁹ In contrast, the PDO drugs demonstrated a tendency towards having a shorter half-life than the nPDO drugs and a similar proportion of drugs with enterohepatic circulation as the nPDO drugs. In addition, the PDO drugs were found to have significantly lower hepatic metabolism and consequently a higher proportion excreted in parent drug form. The PDO drugs also displayed a higher number of non-aromatic as well as heterorings rings. These properties have been related to higher solubility, lower lipophilicity and

lower plasma protein binding.¹¹The PDO drug properties in the current study therefore speak in favor of faster excretion of the drug from the body with minimal hepatocyte interaction, rather than prolonged retention.

High daily dosage was identified as an important factor influencing the likelihood of DO in the model, with 97.5% of the patients developing DO having taken a daily dose of more than 200 mg. It is difficult to say if a higher drug dosage in fact increases the risk of DO or if this is the result of the majority of the DO cases being caused by antibiotics, which are generally taken at high doses over a short time period. Although no drug overdose is required, several studies suggest that idiosyncratic DILI is associated with a high drug dose.^{2,12,13} It is assumed that some form of cellular stress threshold must be overcome to initiate cellular stress and DILI development, however the precise drug dose required to reaching such a threshold may vary between individuals.^{14,15} High daily dose in conjunction with high lipophilicity has also been demonstrated to increase the risk of DILI development.¹ One may hypothesize that DO drugs require a higher daily dose due to their low metabolism and rapid excretion in order to reach a cellular stress threshold and induce hepatocyte damage and subsequent immune response.

Another important factor influencing the likelihood of DO was pre-existing diseases, whereby the absence of pre-existing diseases increased the likelihood of DO. The effect of pre-existing diseases on DILI is largely unknown with limited studies performed to date. However, a recent DILI epidemiological study found that approximately 74% of patients had some form of comorbid conditions.¹⁶ This proportion is similar to that of the

current study. The negative correlation between pre-existing conditions and DO could be a reason for the low proportion of DILI with DO in general, due to the common occurrence of pre-existing conditions in DILI patients. The mechanism by which pre-existing conditions could influence DO is unclear. A possible explanation could be that patients without pre-existing diseases may exert sound cellular adaptation mechanisms under drug-induced cellular stress, and subsequently delay the appearance of manifestations. The shorter treatment duration mostly seen in DO DILI cases would collaborate with this theory as the toxicological effects of the drug would eventually overtake the cellular defense mechanisms, resulting in symptomatic liver injury after drug cessation. Delayed DILI manifestations may also occur during longer or even chronic treatments of certain drugs. However, in such cases, manifestations would appear during the treatment and the cases would consequently be considered as having a long latency rather than DO. Further studies are, however, warranted to refine and confirm the hypothesis.

In this study, impacts of co-medications were not fully investigated due to the limited size of the DO population. However, concomitant medications may affect mechanisms involved in host response to toxic insults (i.e., cellular adaptation, injury, immune response, inflammation and repair) and could consequently influence DILI phenotypes, including DO. Previous data mining analyses have demonstrated associations between co-medications and DILI severity or reporting frequencies, suggesting possible modulations of DILI manifestations and severity by certain co-medications.⁴

We also investigated possible drug-host interactions influencing delayed DILI manifestation. To date, there are no established methodologies to explore drug-host interactions in DILI. We implemented a two-tier approach to explore two-factor (a drug factor and a host factor) interactions, whereby we identified four interactions that may influence the likelihood of delayed DILI onset. Younger patients and/or females were found to less likely manifest delayed DILI onset when they take drugs without mitochondrial liability. Both elements, female sex and age, have been related to hepatocellular damage and more severe interface hepatitis.^{2,17} Sex, sex hormones, and aging are known to influence innate as well as adaptive immune responses.^{18,19} Differences in immune response to a specific toxicological drug property may define latency of DILI development. Assuming that drugs without currently known mitochondrial liability are less likely to affect mitochondrial function, DILI patients induced by such drugs may have a better cellular energy supply compared with DILI patients induced by mitochondrial hazardous drugs, and subsequently be more capable of counteracting toxicological effects and delay the appearance of DILI manifestations. It should be pointed out that the cellular effect of mitochondrial hazardous drugs can vary depending on individual host factors, such as genetic variations and comorbid conditions in addition to sex and age.²⁰ Further studies are required to delineate possible mechanisms underlying the discovered interactions.

Underlying cardiac diseases was also identified as a modifier for the effects of drugs with mitochondrial liability and drugs with high Pauling

electronegativity on DO, although these interactions are difficult to explain based on our current knowledge. As our analysis assessed two-factor interactions, whether having cardiac diseases is a true effect modifier or these identified interactions were confounded by other co-occurring factors (e.g., older age, male sex, comedications) remains uncertain.²¹ New methodologies to discover multifactorial risks are needed to further address the identified interactions.

Our study has strengths. It is the first study to investigate host factors, drug properties, and their interactions influencing a DILI phenotype. The well-characterized DILI cases assessed in this study allowed the identification of significant factors associated with delayed manifestation of DILI and generating interesting hypotheses pertaining to diverse latency in DILI manifestation. Our study also has weaknesses. The size of the DO population was not sufficient to assess impacts of individual pre-existing diseases, co-medications or their interactions. In addition, our current methodology does not allow assessing multifactorial risks. Further developments of novel investigational approaches are needed to determine how host factors, drug properties, and their specific interactions play a role in diverse DILI manifestations.

MATERIAL AND METHODS

Study population

The current study population consisted of patients who met DILI criteria according to international consensus and were enrolled in the Spanish DILI Registry.^{22,10} The operational structure of this registry, data recording

and case ascertainment have been reported elsewhere.²³ The study protocol was approved by the local ethics committee of the coordinating centre at the Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Comité Ético de Investigación) and all subjects who took part in the study gave written informed consent.

Only cases induced by a single causative drug, which was responsible for at least three cases in the Spanish DILI Registry, were included in the current study. All cases attributed to multiple drugs, herbal and dietary supplements, biological products, or drugs with non-oral routes of administration were excluded. In addition, all cases with pre-existing liver diseases were excluded. Cases with DO were defined as those that presented first symptoms at least 48 hours after drug treatment cessation. Drugs associated with DO in at least one DILI case were classified as drugs with delayed onset potential (PDO) and those not associated with any case of delayed onset as no delayed onset potential (nPDO) (Supplementary table 1).

Drug properties

Drug property information was retrieved from the Liver Toxicity Knowledge Base (LTKB) database developed and maintained at the US Food and Drug Administration's National Center for Toxicological Research.^{24,25} This knowledge base accumulates comprehensive drug property information on US-marketed pharmaceuticals. Information on drugs not marketed in the United States was obtained from drug summary of product characteristics at the Spanish Medicines Agency (Agencia Española de Medicamentos y

Productos Sanitarios, AEMPS).²⁶ Complementary information on specific variables such as enterohepatic circulation and percentage of drug elimination in parent drug form was obtained from the DrugBank database.²⁷ Drug disposition was categorized according to the Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System (BDDCS).²⁸ Hepatic metabolism was classified in accordance with Lammert *et al.*²⁹ Lipoaffinity was determined as described by Liu *et al.*³⁰ Compound electronegativity was determined using the Pauling electronegativity scale to calculate a mean electronegativity value of all atoms for each compound. High electronegativity was defined as a mean electronegativity value ≥ 1.016 . BSEP inhibition is generally reported as a drug's IC₅₀ value, the drug dose required to inhibit 50% of BSEP activity.³¹ Drugs with BSEP IC₅₀ <300 μ M were considered BSEP inhibitors in the current study. With regards to drug properties and host factors in general, only those with available information in at least 70% of drugs or cases were included in the analyses.

Statistical analyses

Data are reported as a median with interquartile range (IQR) [25th and 75th percentiles] or an average \pm standard deviation (SD) for continuous variables and as a percentage for categorical variables. For two-group comparisons of host factors and drug properties, we used the Student's *t*-test or the Wilcoxon Rank Sum test for continuous variables and the Chi square test for categorical variables. For three-group comparisons of continuous variables, we used analysis of variance (ANOVA) with the

Tukey's HSD test, or the Kruskal–Wallis tests with the Mann–Whitney U test, for post-hoc pairwise comparisons.

All variables associated with p -values <0.05 in the univariate analyses were considered in a multiple logistic regression model using a backward stepwise approach. The Hosmer-Lemeshow test and receiver operation characteristic (ROC) curves were used to assess the predictive performance of the model. The developed model was internally validated using a bootstrapping procedure. The model was developed and assessed using the JMP statistical (JMP, SAS, Campus Drive, Cary, NC, USA) software and R software with (R-Studio package, version 1.01.136) bootstrap procedure.

To explore potential drug-host interactions influencing DO in DILI, a two-tier approach was applied. In the first tier analysis (i.e., screening), logistic regression models including a drug property, a host factor, and their interaction term were developed using the R software. A total of 2684 models were developed to assess the combinations of 61 host factors and 44 drug properties. Drug-host pairs that showed a significant interaction with a p -value <0.05 were selected for the second tier analysis (i.e., characterization of the identified drug-host interactions). Interactions with uneven parameter distributions between the two subgroups ($<10\%$ absence or presence of a specific host factor or drug property) were not included in the second tier analysis due to concerns over unstable estimates. For each of the identified pairs, a logistic regression model was developed, having delayed onset as an outcome and the drug property as a predictor for each of the two subgroups classified by the host factor. In

this second tier analysis, interactions were considered significant only when the association between delayed onset and a drug property was statistically significant in one host factor subgroup but not in the other, or when the association was statistically significant in the both subgroups but in inverse directions (i.e., pre-set roles). The models were developed using the R software (first tier) and the following characterization (second tier) using the JMP statistical software.

Study highlights

What is the Current knowledge on the topic?

Drug-induced liver injury (DILI) is a multifactorial disorder influenced by host, drug and environmental factors, with a wide range of phenotypes at presentation. Factors contributing to specific DILI manifestations are currently unknown.

What question did the study address?

This study investigated host factors, drug properties and their interactions contributing to delayed onset (DO) of DILI manifestation.

What this study adds to our knowledge

This study identified specific drug and host factors that were independently associated with delayed DILI onset: low hepatic metabolism, a high daily dose and the absence of pre-existing diseases in a patient. Drug properties of mitochondrial liability and high Pauling electronegativity were also associated with DO, but depending on the specific host factors (age, gender and pre-existing cardiac diseases).

How this might change clinical pharmacology or translational science

Specific DILI manifestations may not be explained by solely drug properties or host factors, but their interactions. This study implemented a novel investigational approach and addressed independent drug/host factors as well as drug-host interactions contributing to delayed DILI onset.

Acknowledgements:

Participating clinical centres in the Spanish DILI Registry

Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga (coordinating centre):

RJ Andrade, MI Lucena, C Stephens, M García-Cortés, M Robles-Díaz, I Medina-Cáliz, J Sanabria, B García-Muñoz, R Alcántara, I Moreno, A Gonzalez-Jimenez, A Papineau, A Ortega-Alonso, M Slim, R Sanjuán-Jiménez.

Hospital Regional Universitario de Málaga: M Jiménez-Pérez, R González-Grande.

Hospital Torrecárdenas, Almería: MC Fernández, G Peláez, M Casado, M González-Sánchez.

Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y de la Macarena , Sevilla: M Romero-Gómez, R Calle-Sanz, R Millan-Dominguez, B Fombuena, R Gallego, L Rojas, A Rojas, J Ampuero, JA del Campo, A Gil Gómez, E Vilar.

Hospital de Mendaro, Guipúzcoa: A Castiella, EM Zapata, L Zubiaurre.

Hospital Costa del Sol, Marbella (Málaga): JM Navarro, IM Mendez-Sánchez, A Chaves.

Hospital Sant Pau, Barcelona: G Soriano, C Guarner, EM Román.

Hospital Morales Meseguer, Murcia: H Hallal, E García-Oltra, JC Titos-Arcos, A Pérez-Martínez, C Sánchez-Cobarro, JM Egea-Caparrós.

Hospital de Donostia, San Sebastián: J Arenas, MI Gomez-Osua, A Gómez-García, FJ Esandi.

Hospital de Basurto, Bilbao: S Blanco, P Martínez-Odrizola.

Hospital Alto Deba Mondragón, Guipúzcoa: P Otazua.

Hospital Universitario San Cecilio, Granada: J Salmerón, A Gila.

Hospital Clínico Valladolid: JM González, S Lorenzo.

Hospital La Fe, Valencia: M Prieto, I Conde Amiel, M Garcia-Eliz, M Berenguer.

Hospital de Sagunto, Valencia: J Primo, JR Molés, A Garayoa.

Hospital de Laredo, Cantabria: M Carrascosa.

Hospital 12 de Octubre, Madrid: E Gómez- Domínguez.

Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona: E Montané, AL Arellano, M Farré, AM Barriocanal, Y Sanz, RM Morillas.

Hospital Clínic, Barcelona: M Bruguera, P Gines, S Lens, JC García.

Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife: A Aldea-Perona, M Hernández-Guerra, M Moreno-San Fiel, C Boada-Fernández del Campo.

Hospital Infanta Elena, Valdemoro, Madrid: M Tejedor, R González-Ferrer.

Hospital de Alcorcón, Alcorcón, Madrid: C Fernández, M Fernández-Gil.

Hospital Reina Sofía, Córdoba: JL Montero, M de la Mata.

Hospital Miguel Servet, Zaragoza: J Fuentes-Olmo, EM Fernández-Bonilla.

Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Albacete: JM Moreno, P Martínez-Rodenas, M Garrido.

Hospital Puerta del Mar, Cádiz: P Rendón.

Hospital Parc Taulí de Sabadell, Barcelona: M Vergara, J Sánchez Delgado.

Hospital Carlos III, Madrid: J García Samaniego, A Madejón.

Hospital de Galdakao: JL Cabriada.

Hospital Marqués de Valdecilla, Santander: J Crespo.

Hospital Virgen del Rocío: A Giraldez Gallego, M Cuaresma, R Ruíz.

Source of funding: The present study has been supported by grants of the Instituto de Salud Carlos III co-founded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional - FEDER (contract numbers: PI15/01440, AC-0073-2013) and by the Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). CIBERehd is funded by Instituto de Salud Carlos III

The funding sources had no involvement in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report or in the decision to submit the manuscript for publication.

Conflict of Interest: None

Author contributions:

AS, MIL, CS and RJA wrote the manuscript. MC, AS, MIL, CS and RJA designed the research. AGJ and KM performed the research. AGJ, KM, MC, AS, MS, MRD and IMC analysed the data.

REFERENCE

1. Chen, M., Borlak, J. & Tong, W. High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury. *Hepatology* **58**, 388-396 (2013).
2. Lucena, M. I. *et al.* Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex. *Hepatology* **49**, 2001-2009 (2009).
3. Stephens, C., Lucena M.I. & Andrade RJ. Genetic variations in drug-induced liver injury (DILI): resolving the puzzle. *Front. Genet.* **3**, 253 (2012).
4. Suzuki, A., Yuen, N., Walsh, J., Papay, J., Hunt, C.M. & Diehl, A.M. Co-mediations that modulate liver injury and repair influence clinical outcome of acetaminophen-associated liver injury. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 882-888 (2009).
5. Lucena, M.I. *et al.* Determinants of the clinical expression of amoxicillin-clavulanate hepatotoxicity: a prospective series from Spain. *Hepatology* **44**, 850-856 (2006).
6. Lucena, M.I. *et al.* Trovafloxacin-induced acute hepatitis. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 400-401 (200).

7. Brinker, A.D. *et al.* Telithromycin-associated hepatotoxicity: Clinical spectrum and causality assessment of 42 cases. *Hepatology* **49**, 250-257 (2009).
8. Martinez, M.A. *et al.* Clinical and histologic features of azithromycin-induced liver injury. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 369-376 (2015).
9. Kaplowitz, N. Drug-induced liver injury. *Clin. Infect. Dis.* **38 Suppl 2**, S44-48 (2004).
10. Aithal, G.P. *et al.* Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 806-815 (2011).
11. Ritchie, T.J., Macdonald, S.J., Young, R.J. & Pickett, S.D. The impact of aromatic ring count on compound developability: further insights by examining carbo- and hetero-aromatic and -aliphatic ring types. *Drug Discov. Today* **16**, 164-171 (2011).
12. Lammert, C., Einarsson, S., Saha, C., Niklasson, A., Bjornsson, E. & Chalasani N. Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology* **47**, 2003-2009 (2008).
13. Björnsson, E.S., Bergmann, O.M., Björnsson, H.K., Kvaran, R.B. & Olafsson, S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-

induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology* **144**, 1419-1425 (2013).

14. Pessayre, D., *et al.* Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab. Rev.* **44**, 34-87 (2012).

15. Han, D. *et al.* Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 243-253 (2013).

16. Baekdal, M., Ytting, H. & Skalshei Kjaer, M. Drug-induced liver injury: a cohort study on patients referred to the Danish transplant center over a five year period. *Scand. J. Gastroenterol.* **52**, 450-454 (2017).

17. Suzuki, A. *et al.* Associations of gender and a proxy of female menopausal status with histological features of drug-induced liver injury. *Liver Int.* Epub ahead of print, doi: 10.1111/liv.13380 (2017).

18. Bouman, A., Heineman, M.J. & Faas, M.M. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update* **11**, 411-423 (2005).

19. Shaw, A.C., Joshi, S, Greenwood, H., Panda, A. & Lord, J.M. Aging of the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 507-513 (2010).

20. Chen, M., Suzuki, A., Borlak, J., Andrade, R.J. & Lucena, M.I. Drug-induced liver injury: interactions between drug properties and host factors. *J. Hepatol.* **63**, 503-514 (2015).
21. Strait, J.B. & Lakatta, E.G. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail. Clin.* **8**, 143-164 (2012).
22. Benichou, C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J. Hepatol.* **11**, 272-276 (1990).
23. Andrade, R.J. *et al.* (2005) Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* **129**, 512-521 (2005).
24. Chen, M. *et al.* The liver toxicity knowledge base: a systems approach to a complex end point. *Clin. Pharmacol. Ther.* **93**, 409-412 (2013).
25. Hong, H., Chen, M., Ng, H.W. & Tong, W. QSAR Models at the US FDA/NCTR. *Methods Mol. Biol.* **1425**, 431-459 (2016).
26. AEMPS. (2017). "Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS." Retrieved 20/02, 2017, from <https://www.aemps.gob.es/>.

27. Wishart, D.S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* **34** (Database issue), D668-672 (2006).
28. Benet, L.Z., Broccatelli, F. & Oprea, T.I. BDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS. J.* **13**, 519-547 (2011).
29. Lammert, C., Bjornsson, E., Niklasson, A. & Chalasani, N. Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events. *Hepatology* **51**, 615-620 (2010).
30. Liu, R., Sun, H., & So, S.S. Development of quantitative structure-property relationship models for early ADME evaluation in drug discovery. 2. Blood-brain barrier penetration. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **41**, 1623-1632 (2001).
31. Warner, D.J. *et al.* Mitigating the inhibition of human bile salt export pump by drugs: opportunities provided by physicochemical property modulation, in silico modeling, and structural modification. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 2332-2341 (2012).

Figure legends

Figure 1. Receiver operation characteristic (ROC) curve for regression model of three independent delayed onset predictors: absence of pre-existing diseases, daily culprit drug dose $\geq 200\text{mg}$ and hepatic metabolism $< 50\%$. AUC: area under the curve.

Table 1: Physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs with (PDO) and without (nPDO) delayed onset potential

	PDO active ingredients N=11*	nPDO active ingredients N=33*	<i>p</i>
Physicochemical			
Molecular weight, mean g/mol \pm SD	412 \pm 180	328 \pm 134	0.0633
Total number of rings, mean \pm SD	3.3 \pm 1.3	2.3 \pm 1.1	0.0343
Number of aromatic rings, mean \pm SD	0.9 \pm 0.5	1.0 \pm 0.9	0.9199
Number of heterorings, mean \pm SD	2.1 \pm 1.2	1.2 \pm 0.8	0.0104
Length of chain, mean atoms \pm SD	3.2 \pm 1.6	6.1 \pm 5.4	0.0876
Length of aliphatic chain, mean \pm SD	0.6 \pm 1.1	2.4 \pm 3.1	0.0738
High Pauling electronegativity, n (%)	3 (21)	6 (17)	0.6963
Pharmacokinetics			
Half-life, median hours (IQR)	3.2 (1.2-12)	5.2 (2.9-16)	0.7692
Lipophilia, median LogP (IQR)	1.8 (0.1-2.9)	2.5 (0.1-3.8)	0.3747
Proportion of plasma protein binding, median (IQR)	80 (40-97)	90 (35-97)	0.7702
Hepatic metabolism \geq 50%, n (%)	5 (45)	27 (81)	0.0190
Parent drug excretion \geq 50%, n (%)	5 (50)	2 (6)	0.0015
Enterohepatic circulation, n (%)	4 (36)	11 (37)	0.9858
Reactive metabolite formation, n (%)	5 (45)	19 (59)	0.4226
Mitochondrial liability, n (%)	5 (45)	20 (62)	0.5422
BDDCS, n (%)			
class 1 (\uparrow solub / \uparrow hep met)	-	14 (42)	
class 2 (\downarrow solub / \uparrow hep met)	2 (20)	14 (42)	0.0001
class 3 (\uparrow solub / \downarrow hep met)	6 (60)	2 (6)	
class 4 (\downarrow solub / \downarrow hep met)	2 (20)	3 (9)	
Pharmacodynamics			
BSEP inhibitor, n (%)	3 (27)	17 (51)	0.1620

*44 active ingredients corresponding to 42 drug treatments. Abbreviation: BDDCS, Biopharmaceutical drug disposition classification system; solub, solubility; hep met, hepatic metabolism; \uparrow , high; \downarrow , low; BSEP, bile salt export pump. All values have been calculated based on the number of drugs with available information.

Table 2. Demographics and clinical characteristics of DILI cases with and without delayed onset (DO), induced by drugs with delayed onset potential (PDO) and drugs without delayed onset potential (nPDO)

	PDO drugs		<i>p</i> *	nPDO drugs	
	DO (95)	No DO (109)		No DO (209)	<i>p</i> **
Demographics					
Age, median years (IQR)	57 (46-70)	58 (46-75)	0.7688	57 (43-70)	0.7012
Women, n (%)	45 (47)	56 (52)	0.5679	106 (49)	0.4779
Clinical presentation					
Duration of treatment, median days (IQR)	8 [#] (6-11)	9 [#] (6-19)	0.1024	40 (27-117)	0.0002
Time to onset, median days (IQR)	19 [#] (8-30)	7 [#] (4-14)	0.4659	49 (20-97)	0.0001
Daily dose, mean mg ±SD	2004 ±1018 [#]	1681 ±1060 [#]	0.0082	371 ±609	0.0001
Jaundice, n (%)	79 (82) [#]	76 (70)	0.0251	142 (66)	0.0089
Eosinophilia, n (%)	36 (38) [#]	26 (24)	0.0615	45 (20)	0.0122
Positive autoantibodies titers, n (%)	16 (17)	24 (22)	0.3530	45 (21)	0.3185
Pre-existing diseases, n (%)	50 (53) [#]	69 (67) [#]	0.0393	194 (85)	0.0001
Pattern of liver injury, n (%)			0.8004		0.0001
Hepatocellular	40 (43)	46 (44)		145 (68)	
Cholestatic	26 (28)	32 (31)		36 (17)	
Mixed	27 (29)	26 (25)		31 (15)	
Severity, n (%)			0.3178		0.0424
Mild	17 (18)	28 (26)		65 (32)	
Moderate	71 (75)	69 (65)		111 (55)	
Severe	5 (5)	4 (4)		17 (8)	
Fatal/Transplant	2 (2)	5 (5)		10 (5)	

*comparison between two groups: DILI cases induced by PDO drugs (with and without DO)

**comparison between three groups: DILI cases induced by PDO drugs (DO and no DO) and nPDO drugs

[#]*p*<0.05 compared to cases without delayed onset caused by nPDO drugs (post-hoc pairwise comparisons)

Table 3. Predictive model for delayed onset in DILI based on independent drug properties and host factors

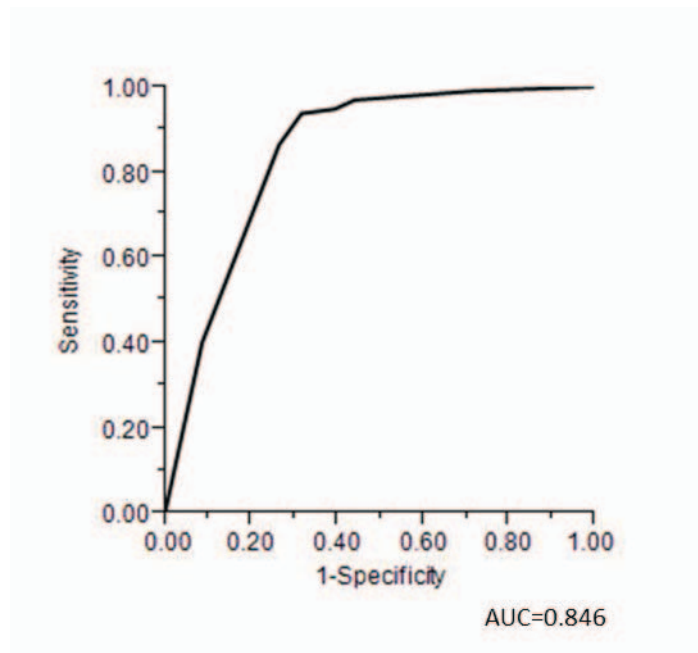
	OR	<i>p</i>	95% CI
Hepatic metabolism < 50%	23.98	0.0001	10.84-63.68
Daily culprit drug dose ≥ 200mg	2.89	0.0123	1.25-7.58
Absence of pre-existing diseases	1.91	0.0245	1.08-3.39

Table 4. Host factors modifying effects of drug properties on the likelihood of manifesting delayed onset in drug-induced liver injury

Age	Potential mitochondrial liability		OR*	95% CI	p-value
	Positive	Negative			
Age ≥60 years	48/185 (25%)	7/35 (20%)	0.713	0.27-1.66	0.4562
Age <60 years	38/142 (27%)	1/35 (3%)	0.080	0.01-0.39	0.0004
Sex	Potential mitochondrial liability				
	Positive	Negative			
Male	43/169 (25%)	7/33 (21%)	0.788	0.29-1.86	0.6014
Female	43/158 (27%)	1/37 (3%)	0.074	0.01-0.36	0.0002
Underlying cardiac diseases	Potential mitochondrial liability				
	Positive	Negative			
Presence	3/37 (8%)	3/8 (37%)	6.800	1.03-47.39	0.0266
Absence	83/290 (29%)	5/62 (8%)	0.219	0.07-0.52	0.0002
Underlying cardiac diseases	Pauling electronegativity				
	High	Low			
Presence	2/4 (50%)	4/43 (9%)	0.102	0.01-0.94	0.0531
Absence	5/51 (10%)	84/321 (26%)	3.260	1.25-8.48	0.0058

Data in the first two columns show number of cases with delayed onset that satisfy the two conditions, a host factor and a drug property (% delay onset cases based on total number of cases that satisfy the conditions).

*OR values were computed using the first column as control group



level in the LPS-treated mouse liver, primary Kupffer and RAW cells as compared with controls, whereas UBC9 mRNA level decreased minimally. Phos-tag SDS-PAGE showed that LPS increased UBC9 phosphorylation in mouse liver and primary Kupffer cells. **These results support a potential key mechanism for LPS that induces pro-inflammatory cytokines through lowering UBC9 expression, raising its phosphorylation.** **Conclusions:** The novel finding that LPS lowers UBC9 protein level has important implications since this facilitates the pro-inflammatory response. A better understanding of molecular mechanisms on how LPS treatment influences sumoylation-regulated cytokines in Kupffer cells, will open a crucial area of investigation providing new targets for therapy in alcoholic liver diseases.

Disclosures:

The following authors have nothing to disclose: Maria Lauda Tomasi, Komal Ramani, Minjung Ryou

595

A comparative analysis of the Spanish and Latin-American prospective drug-induced liver injury (DILI) networks

Fernando Bessone¹, Nelia Hernández², Adriana Sanchez Ciceron², Maria Di Pace², Gisela Gualano³, Marco Arrese⁴, Alex Ruiz⁴, Aurora Loeza del Castillo⁵, Marcos A. Giralda⁶, Enrique Carrera⁷, Maribel Lizarzábal⁸, Edgardo Mengual⁸, Javier Brahm⁹, Juan P. Arancibia⁹, Federico C. Tanno¹, Milagros B. Davalos-Moscol¹⁰, Raymundo Paraná¹¹, M.I. Schinoni¹¹, Nahum Méndez-Sánchez¹², Miguel E. Garassini¹³, Rodrigo L. Zapata¹⁴, I. Medina-Cáliz¹⁵, Andrés González-Jiménez¹⁵, Mercedes Robles Díaz¹⁵, C. Stephens¹⁵, A. Ortega¹⁵, Judith Sanabria¹⁵, Miren García-Cortés¹⁵, B. García-Muñoz¹⁵, M. I. Lucena¹⁵, Raul J. Andrade¹⁵; ¹Hospital Provincial del Centenario, Rosario, Argentina; ²Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay; ³Hospital Posadas, Buenos Aires, Argentina; ⁴Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile; ⁵Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Hospital General de México, Ciudad de México, Mexico; ⁶Hospital de Clínicas, Asunción, Paraguay; ⁷Hospital de Especialidades Eugenio Espejo, Quito, Ecuador; ⁸Hospital Universitario de Maracaibo, Maracaibo, Venezuela, Bolivarian Republic of; ⁹Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago, Chile; ¹⁰Hospital Rebagliati, Facultad de Medicina, Universidad San Martín de Porres, Lima, Peru; ¹¹Hospital Universitario Prof. Edgard Santos, Universidad Federal da Bahia, Salvador de Bahia, Brazil; ¹²Fundación Clínica Médica Sur, Ciudad de México, Mexico; ¹³Hospital Universitario de Caracas, Caracas, Venezuela, Bolivarian Republic of; ¹⁴Universidad de Chile, Clínica Alemana de Santiago, Santiago, Chile; ¹⁵Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, CIBERehd, Málaga, Spain

Background: DILI characteristics concerning phenotype and involved drugs or other toxic compounds can vary between individuals and possibly between different geographic populations. We aimed to compare all DILI cases included in the ongoing Spanish and Latin-American DILI Network that share the same inclusion criteria and operational procedures. **Material and methods:** Demographics, clinical parameters and causative agents were compared between 200 Latin-American and 867 Spanish DILI cases. **Results:** The mean age of DILI development differed between the two registries with 51 years in Latin America and 54 years in Spain ($p=0.02$). Females predominated among the Latin American cases (59%) compared to the Spanish cases (49%) ($p=0.01$). Duration of treatment and time to onset were higher in Latin American cases (127 vs 88 days, $p<0.001$) and (116 vs 80 days, $p=0.03$), respectively. Jaundice was similar (67% and 68%) between registries. Although hepatocellular damage was the most frequent type of

injury in both registries, the percentage of hepatocellular cases was significantly higher in the Spanish Registry (63% vs 54%, $p=0.03$) and the mean alkaline phosphatase value at onset was higher in the Latin American cases (2.5 vs 2.1, $p<0.001$). Severe cases (9% vs 8%) and fatal cases (liver-related death or liver transplantation) (4.6% vs 4%) did not differ. Anti-infectives ranked first in both registries, followed by nervous system and musculo-skeletal drugs in the Spanish network. Musculo-skeletal and sex hormones predominated in the Latin-American cohort. Amoxicillin-clavulanate, diclofenac, nimesulide, and nitrofurantoin were the most common causatives in Latin America, while in Spain were amoxicillin-clavulanate, antituberculosis treatments, ibuprofen and atorvastatin. Herbal and dietary supplements for bodybuilding DILI were more represented in Latin America (10% vs 6%, $p=0.05$). **Conclusions:** Phenotypic differences were found between the Latin-American and Spanish registries, with female and cholestatic/mixed type of liver injury predominating in the former cohort. In addition to genetic factors, variations in drug policies and prescription habits may account for the differences in causative agents, which, in turn, may present distinct DILI 'signatures' and explain the phenotypic variations. **Funding:** AEMPS, FIS PI12-00620.AC-0073-2013.CIBERehd-ISCIII.

Disclosures:

Fernando Bessone - Advisory Committees or Review Panels: Schering Plough, Gilead, Glaxo, MSD, Janssen; Speaking and Teaching: Bristol Myers Squibb, Janssen, Bayer, Gilead, Abbvie

Miguel E. Garassini - Advisory Committees or Review Panels: Abbvie; Speaking and Teaching: Roche, Stendal

The following authors have nothing to disclose: Nelia Hernández, Adriana Sanchez Ciceron, Maria Di Pace, Gisela Gualano, Marco Arrese, Alex Ruiz, Aurora Loeza del Castillo, Marcos A. Giralda, Enrique Carrera, Maribel Lizarzábal, Edgardo Mengual, Javier Brahm, Juan P. Arancibia, Federico C. Tanno, Milagros B. Davalos-Moscol, Raymundo Paraná, M.I. Schinoni, Nahum Méndez-Sánchez, Rodrigo L. Zapata, I. Medina-Cáliz, Andrés González-Jiménez, Mercedes Robles Díaz, C. Stephens, A. Ortega, Judith Sanabria, Miren García-Cortés, B. García-Muñoz, M. I. Lucena, Raul J. Andrade

596

The influence of drug properties and host factors on delayed onset in hepatotoxicity: An analysis of the cohort included in the Spanish DILI Registry.

Andrés González-Jiménez¹, Ayako Suzuki², C. Stephens^{1,4}, Minjun Chen³, I. Medina-Cáliz^{1,4}, Mercedes Robles Díaz^{1,4}, Martín Prieto^{5,4}, German Soriano^{6,4}, Eva Montane⁷, A. Aldea⁸, Raul J. Andrade¹, M. I. Lucena¹; ¹Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, Malaga, Spain; ²Department of Medicine, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR; ³Division of Bioinformatics and Biostatistics, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR; ⁴CIBERehd, Barcelona, Spain; ⁵Hepatogastroenterology service, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ⁶Gastroenterology service, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁷Clinical pharmacology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁸Department of Clinical pharmacology, Hospital Universitario de Canarias, Canarias, Spain

Background: Most patients with drug-induced liver injury (DILI) manifest liver injury while they are still on the drug treatments; however some manifest after the treatment is completed (i.e., delayed onset). Mechanism underlying the delayed onset is unknown. We aimed to identify drug properties and host factors which are associated with delayed onset. **Methods:** 680 Spanish DILI cases were classified into delayed onset (DO) vs. no delayed onset (NDO) according to the temporal relationship of the first DILI manifestation to the time of treatment cessation.



Drug properties (Liver Toxicity Knowledge Base, Drug Discovery Today 2011) and host factors were compared in DO vs. NDO. **Results:** Among the 680 cases, 159 cases (22%) manifested DILI with 2 to 82 days' delay after the treatment cessation (i.e., DO) while 521 (77%) manifested during the drug treatment (i.e., NDO). 57% of DO cases and 13% of NDO were Amoxicillin-clavulanate (AMOX/CA) cases. After excluding the AMOX/CA cases, DO cases had shorter treatment duration (median: 11 vs. 45 days, $p < 0.0001$) and higher daily dosage (mean: 275 vs. 150 mg, $p = 0.005$). Drugs which belong to the BDDC class 3 and 4, low metabolism & high/low solubility, were overrepresented in DO cases (31% vs. 15%, $p = 0.0011$). Drugs with hepatic metabolism $\geq 50\%$ were less prevalent in DO cases (67% vs. 84%, $p = 0.003$) also drugs with un-metabolized drug excretion $\geq 50\%$ were more prevalent in DO cases (25% vs. 9%, $p = 0.0011$). Regarding host manifestations, eosinophilia was more prevalent in DO cases (30% vs. 19%, $p = 0.036$), while positive autoantibody was more prevalent in NDO cases (25% vs. 11%, $p = 0.024$). NDO cases were more associated with chronic underlying diseases (82% vs. 60%, $p < 0.0001$). In a multivariate analysis, the absence of underlying diseases (OR: 3.2) and un-metabolized drugs excretion (OR: 3.6) were found to be independent predictors for DO. These results were consistent even when including AMOX/CA cases. In a logistic regression clustered analysis comparing 49 drugs associated with DO and 22 drugs never involved in DO, the combination of reactive metabolite formation and drug disposition (i.e., BDDCs) was significantly associated with a NDO potential ($p = 0.02$). **Conclusions:** Delayed onset was associated with drugs which have low hepatic metabolism, high daily doses, manifestations with more eosinophilia and less positive autoantibodies and less chronic underlying diseases. The absences of reactive metabolite formation and the drug disposition may partly dictate a delayed onset potential among drugs. **Funding:** AEMPS, P10-CTS-6470, PI12/00378, PI12-00620, AC-0073-2013, CIBERehd-ISCIII.

Disclosures:

Ayako Suzuki - Consulting: Novartis

Martin Prieto - Advisory Committees or Review Panels: Bristol, Gilead

The following authors have nothing to disclose: Andrés González-Jiménez, C. Stephens, Minjun Chen, I. Medina-Cáliz, Mercedes Robles Diaz, German Soriano, Eva Montane, A. Aldea, Raul J. Andrade, M. I. Lucena

597

The Clinical-Pathological Spectrum and Outcomes of Liver Injury due to Drugs and Botanicals Associated with Loss of Bile Ducts.

Herbert L. Bonkovsky², David E. Kleiner³, Jiezhun Gu⁵, Joseph A. Odin⁴, Mark W. Russo¹, Victor J. Navarro⁶, Maricruz Vega⁶, Jay H. Hoofnagle⁷; ¹The Liver Center, Carolinas Health Care System, Charlotte, NC; ²Internal Medicine—Gastroenterology & Hepatology, Wake Forest NC Baptist Medical Center, Winston-Salem, NC; ³Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, Bethesda, MD; ⁴Internal Medicine—Gastroenterology & Hepatology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY; ⁵Clinical Research Institute, Duke University, Durham, NC; ⁶Internal Medicine—Hepatology, Einstein Health Care, Philadelphia, PA; ⁷NIDDK, Liver Disease Research Branch, Bethesda, MD

Background & Aims: Loss of intrahepatic bile ducts is a complication of exposure to drugs, toxins, and other environmental factors. Our aim was to describe features of such bile duct loss due to drugs and botanicals. **Methods:** We studied all subjects who were enrolled in the US Drug-Induced Liver Injury Network [DILIN] between Sept 2004 and Sept 2014 and underwent liver biopsies [$n = 461/1296$]. Biopsies were interpreted by

the study hepatopathologist without reference to clinical information. Paucity of intra-lobular bile ducts was found in 28 (6%) and was categorized as either mild/moderate [25-50% loss, $n = 14$] or severe [$> 50\%$ loss, $n = 14$]. **Results:** The 28 subjects with bile duct loss included 14 men [5 severe] and 14 women [9 severe]. The median age was 52.5 [range 11-87] years those with severe duct loss were younger [47.4 vs 59.7 years, $p = 0.04$]. Cases were attributed to 20 different agents: 3 to amoxicillin/clavulanic acid; 3 to temozolomide; 3 to botanicals [Cactus nopal; *Artemisia annua*; unknown]; 2 to azithromycin; and 1 each due to cefalexin, cefazolin, levofloxacin, moxifloxacin, allopurinol, enalapril, hydralazine, infliximab, lenalidomide, thalidomide, montelukast, olanzapine, quetiapine, lansoprazole, omeprazole, metoclopramide and mesalazine. Median latency to onset was 35 [IQR 19-91] days. The typical clinical presentation was immuno-allergic, rather than autoimmune-like disease and was usually cholestatic or mixed, with median R-value = 2.1 [range 0.1-8.0]. In addition to bile duct paucity, hepatic pathology showed reactive bile duct injury and mild portal lympho-histiocytic inflammatory infiltrates. Eosinophils were noted in 9 biopsies, but peripheral eosinophilia at disease onset was noted in only 6 patients. 7 of 14 subjects with mild and 8 of 14 with severe injury transitioned to chronic ongoing injury [laboratory, imaging or clinical evidence of persisting liver damage > 6 months after onset]. The likelihood of dying or requiring liver transplantation within 6 months of onset was greater in those with severe bile duct loss (4/14, 29%) than in mild duct loss (0/14, 0%, $p = 0.05$) and also greater than in those without duct loss on biopsy (22/246, 8.9%, $p = 0.04$). **Conclusions:** Paucity of bile ducts is an uncommon (6%) histologic feature of acute drug-induced liver injury, can be caused by diverse agents, both drugs and botanicals, and often leads to evidence of chronic liver injury, which, when severe, may lead to premature death or liver transplantation. Pathogenesis remains imperfectly understood, but host immune reactions, perhaps influenced by genetic or environmental factors, appear likely; however, the key antigen[s] remain unknown.

Disclosures:

Herbert L. Bonkovsky - Advisory Committees or Review Panels: Recordati Rare Chemicals, Clinuvel, Inc.; Consulting: Alnylam, Inc., Clinuvel, Inc.; Grant/Research Support: Gilead Sciences

Mark W. Russo - Grant/Research Support: Merck, Salix; Speaking and Teaching: janssen, Gilead, ABBVIE, Salix

The following authors have nothing to disclose: David E. Kleiner, Jiezhun Gu, Joseph A. Odin, Victor J. Navarro, Maricruz Vega, Jay H. Hoofnagle

598

Caspase Inhibition Switched TNF- α -Induced Apoptosis to Necrosis But Not Autophagic Cell Death in Hepatocytes and Mouse Livers

Hong-Min Ni, Xiaojuan Chao, Mitchell R. McGill, Hartmut Jaeschke, Wen-Xing Ding; Pharmacology, Toxicology and Therapeutics, The University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS

Hepatocyte death (apoptosis and necrosis) and survival (such as autophagy) are integrated and play important roles in many liver diseases such as endotoxin and alcohol-induced liver injury. How these different cell death and survival pathways regulate each other remains elusive. We previously demonstrated that when the cell survival NF- κ B pathway was blocked by a general transcription inhibitor actinomycin D (ActD), tumor necrosis factor- α (TNF- α) induced apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes, which was completely suppressed by a general caspase inhibitor, ZVAD. Surprisingly, in the present study, we found that TNF- α /ActD-treated hepatocytes died by a necrotic-like cell death evidenced by abundant cellular

M30/CK18-cleavage staining, indicators of hepatocyte apoptosis. Indicators of oxidative stress, including the accumulation of 4-HNE-protein adducts and JNK phosphorylation, were also increased. In contrast, mice deficient in MLK3 were protected from ethanol-induced increases in plasma ALT/AST, pro-inflammatory cytokines and hepatic protein expression of RIP3. Ethanol-induced JNK phosphorylation and oxidative stress were also attenuated in MLK3-deficient mice. However, MLK3-deficiency did not affect ethanol-induced steatosis or hepatocyte apoptosis.

Conclusions: Taken together, these results suggest that MLK3 participates in the development of ethanol-induced oxidative stress, activation of JNK and induction of necroptotic programmed hepatocyte death. Pharmacological intervention of this pathway could be targeted as a potential therapeutic strategy to suppress necroptosis-induced inflammation and hepatocyte injury in patients with ALD.

P1097 DISTINGUISHING DRUG INDUCED AUTOIMMUNE HEPATITIS FROM IDIOPATHIC AUTOIMMUNE HEPATITIS

A. Ortega-Alonso¹, A. Castiella², M. Robles-Díaz¹, I. Medina-Caliz¹, C. Stephens¹, J. Sanabria¹, A. Gonzalez-Jimenez¹, B. Garcia-Muñoz¹, M. Garcia-Cortes¹, E.M. Zapata², P. Otazua³, S. Blanco⁴, M. Prieto⁵, F. Bessone⁶, M.C. Fernandez⁷, H. Hallal⁸, J. Primo⁹, J.M. Moreno-Planas¹⁰, M. Arrese¹¹, R.J. Andrade¹, M.I. Lucena¹.

¹Unidad de Hepatología y Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Málaga, ²Hospital de Mendaro, ³Hospital de Mondragón, Gipuzkoa, ⁴Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, ⁵Hospital La Fe, CIBERehd, Valencia, Spain; ⁶Hospital Provincial del Centenario, Rosario, Argentina; ⁷Hospital Torrecárdenas, Almería, ⁸Hospital Morales Meseguer, Murcia, ⁹Hospital de Sagunto, Valencia, ¹⁰Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Albacete, Spain; ¹¹Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, Chile
E-mail: mrobles@uma.es

Background and Aims: Drug-induced autoimmune hepatitis (DI-AIH) is a particular clinical phenotype of hepatotoxicity, poorly defined. Its prevalence in cohorts of patients with DILI is unknown. We aimed to characterize phenotypes and used drugs in DI-AIH, from a large cohort of DILI patients, and in idiopathic autoimmune hepatitis (AIH) to improve differential diagnosis between both entities.

Methods: Demographic and clinical variables in 21 patients out of 1013 included in the Spanish-Latin DILI Registry presenting with typical AIH clinical and analytical features including serum detectable titers of ANA and/or ASMA, as well as high gammaglobulin levels after the initiation of different drug therapies were compared with 51 patients diagnosed with idiopathic AIH at Mendaro and Mondragon Hospitals, Gipuzkoa, Spain.

Results: Both cohorts demonstrated similar age and gender distribution, with 38% males (mean age 58 years \pm 16) in the DI-AIH cohort. Hypertension and diabetes mellitus were more frequent in DI-AIH patients, 33% vs 12% ($p=0.023$) and 14% vs 2% ($p=0.038$), respectively. Other underlying autoimmune diseases were less frequent in DI-AIH (24% vs 33%). The more frequent drugs triggering DI-AIH and the co-medications in AIH patients were statins (19% vs 12%), NSAIDs (10% vs 12%), antibiotics (24% vs 2%) and anti-TNF (10% vs 2%). At presentation patients with DI-AIH exhibited jaundice in the 62% vs 31%, higher total bilirubin levels [6 times the upper limit of normal (\times ULN) vs $2\times$ ULN, $p=0.001$], AST ($23\times$ ULN vs $11\times$ ULN, $p=0.001$), ALT ($27\times$ ULN vs $14\times$ ULN, $p=0.001$) and GGT ($9\times$ ULN vs $5\times$ ULN, $p=0.02$). No significant differences were observed in ALP values. Advanced fibrosis (F3-F4) in liver

biopsy was observed in 18% of DI-AIH vs 25.5%. The DI-AIH group required steroid therapy less frequently than the AIH group (81% vs 93%) achieving complete response in 100% of cases vs 92% in AIH.

Conclusions: DI-AIH is more severe than idiopathic AIH at diagnosis, presenting most frequently with jaundice, but liver histology demonstrating a minor grade of fibrosis. Statins are increasingly being identified as potential triggers for DI-AIH and could be actually the unidentified trigger behind many cases of "true idiopathic" AIH.

Funding: AEMPS, PI12-00378. CIBERehd: ISCIII, AC-0073-2013

P1098 INFLUENCE OF METABOLIC RISK FACTORS IN HEPATOTOXICITY (DILI) PHENOTYPE AND OUTCOME

M. Robles-Díaz^{1,2}, I. Medina-Cáliz^{1,2}, A. Ruíz³, J. Sanabria¹, C. Stephens^{1,2}, A. González-Jiménez¹, A. Ortega-Alonso^{1,2}, B. García-Muñoz^{1,2}, M. García-Cortés^{1,2}, M. Romero-Gómez^{2,4}, G. Peláez⁵, H. Hallal⁶, G. Soriano^{2,7}, E. Román^{2,7}, S. Blanco⁸, A. Castiella⁹, E.M. Zapata⁹, J.M. Navarro¹⁰, M. Jiménez¹¹, J.M. Moreno-Planas¹², A. Aldea¹³, F. Bessone¹⁴, N. Hernández¹⁵, M. Arrese³, M.I. Lucena^{1,2}, R.J. Andrade^{1,2}. ¹UGC Aparato Digestivo. Servicio de Farmacología Clínica. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA. Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, Málaga, ²Centro de Investigación Biomédica en Red: Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain; ³Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile; ⁴UGMQ de Enfermedades Digestivas, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, ⁵Hospital de Torrecárdenas, Almería, ⁶Hospital Morales Meseguer, Murcia, ⁷Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, ⁸Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, ⁹Hospital de Mendaro, Gipuzkoa, ¹⁰Hospital Costa del Sol, Marbella. Málaga, ¹¹Hospital Regional de Málaga, Málaga, ¹²Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Albacete, ¹³Hospital Universitario de Canarias, Canarias, Spain; ¹⁴Hospital Provincial del Centenario, Rosario, Argentina; ¹⁵Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay
E-mail: imcaliz@uma.es

Background and Aims: It has been suggested that metabolic risk factors may play a role in DILI presentation. Hence, the aim of this study was to determine the influence of diabetes and dyslipidemia in the clinical profile of DILI.

Methods: 864 DILI cases included in the Spanish DILI Registry were compared according to the presence or absence of diabetes and dyslipidemia.

Results: DILI patients with ($n=121$) dyslipidemia were significantly older than those without ($n=743$), 64 vs 52 years, ($p<0.001$) and had on average a higher BMI, 27 vs 25 ($p=0.017$). Duration of treatment of the causal agent and time to DILI onset did not differ significantly between the groups. In terms of DILI severity, only four severe and fatal cases (3%) were present among the patients with dyslipidemia, while 95 (13%) were found among normolipemic patients ($p=0.009$). Persistent liver damage more than one year after DILI onset was seen in 30% of the patients with dyslipidemia and 22% of non-dyslipidemia patients. The mean value of total bilirubin at onset was lower in patients with dyslipidemia (5.4 vs $7 \times$ ULN, $p=0.018$).

Comparing diabetic ($n=103$) with non-diabetic ($n=737$) DILI patients, higher mean age (66 vs 52, $p<0.001$) and BMI (28 vs 25, $p<0.001$) were observed in the former group. Similarly, duration of treatment of the DILI causal agent and time to DILI onset were longer in the diabetic group, 158 vs 78 days ($p=0.001$) and 140 vs 71 days ($p=0.002$), respectively. No differences were found with regards to DILI severity. In the diabetic group 28% of the cases had persistent hepatic injury after one year from DILI onset versus 22% in the non-diabetic group.

In patients with both diabetes and dyslipidemia ($n=33$), duration of treatment of the causal agent and time to DILI onset were both

Comunicación C123

Valencia, 18 de Septiembre de 2015

Por la presente certificamos que la comunicación con título:

THE INFLUENCE OF DRUG PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES ON DELAYED ONSET IN HEPATOTOXICITY: AN ANALYSIS OF THE COHORT INCLUDED IN THE SPANISH DILI REGISTRY

de los autores:

Gonzalez Jimenez Andres; Suzuki Ayako; Stephens Camilla; Chen Minjun; Medina-Caliz Inmaculada; Robles-Diaz Mercedes; Montane Eva; Aldea Ana; Andrade Raul Jesus; Lucena Maria Isabel

ha sido presentada como **Comunicación en Formato CARTEL** durante el **36 Congreso de la Sociedad Española de Farmacología**, que se ha celebrado en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia los días 16, 17 y 18 de Septiembre de 2015.

Y para que conste donde convenga, firmamos la presente en fecha y lugar arriba indicados.



Secretaría Técnica
CLAVE CONGRESOS

Introducción: El carcinoma hepatocelular (CHC) está aumentando su incidencia soliendo asentar sobre un hígado cirrótico. El objetivo del estudio fue evaluar las características del CHC en pacientes no cirróticos frente al hígado cirrótico.

Métodos: estudio retrospectivo de los pacientes diagnosticados de CHC en el periodo 2010-2014.

Resultados: Se identificaron 83 pacientes con CHC, de los cuales 15 no presentaban una cirrosis hepática subyacente, representando el 18,1% (IC95%: 14,2-33%). En el grupo de pacientes sin cirrosis el 60% eran varones, la media de edad al diagnóstico fue de 65, \pm 12,7 años. La lesión subyacente en el caso de no presentar cirrosis fue la esteatosis hepática en el 40%, frente al 10,3% en los pacientes cirróticos ($p=0,004$). El 26,7% de los pacientes sin cirrosis presentaban infección crónica por virus de la hepatitis C (VHC), frente al 55,9% de los pacientes cirróticos ($p=0,041$). El 13,3% de los pacientes sin cirrosis reconoció ingesta enólica, frente al 50% en el caso de pacientes cirróticos ($p=0,009$). En los pacientes cirróticos el 39,7% presentó ascitis y el 77,9% datos de hipertensión portal. La mediana del tamaño del nódulo tumoral en los pacientes sin cirrosis fue de 55 (RIQ 17-100) mm, significativamente superior al de los pacientes cirróticos que fue de 30 (17-40) mm ($p=0,048$). Al 60% de los pacientes sin cirrosis se les realizó tratamiento activo con intención curativa. Se realizó cirugía en el 53,3%, frente al 13,2% de los pacientes con cirrosis ($p<0,001$) y radiofrecuencia en el 26,7% sin cirrosis frente al 47,1% de los cirróticos ($p=0,149$) (Tabla I).

En los pacientes cirróticos la recurrencia tras el tratamiento con intención curativa fue del 20,6% trascurrido un tiempo medio de 7,5 (5-13) meses. La recidiva de la lesión se produjo en el 10,3%. En los pacientes sin cirrosis la

recurrencia tras tratamiento con intención curativa fue de 33,3% tras un tiempo medio de 12,5 (6,2-21,7) meses. Ninguno de los pacientes sin cirrosis tuvo recidiva de la lesión inicial. El 39,7% de los pacientes cirróticos falleció en el seguimiento, frente al 26,7% de los pacientes sin cirrosis.

Conclusión: El CHC sobre hígado no cirrótico es una entidad poco frecuente, que se suele asentar sobre pacientes con esteatosis hepática. Aunque el tamaño al diagnóstico es mayor que en los pacientes cirróticos, debido a que no se realiza cribado, el 60% de los pacientes sin cirrosis, se beneficiaron de un tratamiento curativo, ya que el remanente de hígado no tumoral está funcionalmente activo, lo que permite una actitud terapéutica más intensiva.

CP099. HEPATOTOXICIDAD ASOCIADA AL CONSUMO DE HIERBAS Y SUPLEMENTOS DIETÉTICOS

Andrade Bellido, RJ¹; Medina Cáliz, I¹; Robles Díaz, M¹; Stephens, C¹; González Jiménez, A¹; Sanabria Carrera, J¹; Ortega Alonso, A¹; García Cortés, M.¹; Mirwani, S²; Thorpe, B²; Jiménez Pérez, M³; Peláez, G⁴; Navarro, JM⁵; Planas, R⁶; Prieto, M⁶; García Eliz, M⁷; Bessone, F⁸; Hernández, N⁹; Carrera, E¹⁰; Mengual, E¹¹; Cabello Porras, MR²; García Muñoz, B²; Lucena González, MI¹
¹Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA). Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Universidad de Málaga, CIBERehd. Málaga, España.
²Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA). Universidad de Málaga. Málaga, España.
³Hospital Regional Universitario de Málaga. Málaga, España.
⁴Hospital de Torrecárdenas. Almería, España.

TABLA I. RESULTADOS NUMÉRICOS DEL ESTUDIO, DATOS DE MAYOR INTERÉS

Variable	Cirróticos	No cirróticos	p
Sexo n (%)			
Varones	57 (83,8)	9 (60)	0,039
Etiología			
VHC	38 (55,9)	4 (26,7)	0,041
Alcohol	34 (50)	2 (13,3)	0,009
Esteatosis hepática	7 (10,3)	6 (40)	0,004
Tamaño tumoral: med, (RIQ)	30 (7,7-40)	55 (17-130)	0,048
Tratamiento quirúrgico n (%)	9 (13,2)	8 (53,3)	< 0,001
Tratamiento por radiofrecuencia n (%)	32 (47,1)	4 (26,7)	0,149
Resultado del tratamiento con intención curativa			
Recurrencia n (%)	14 (20,6)	5 (33,3)	0,853
Recidiva n (%)	7 (10,3)	0	0,194
Tiempo de recurrencia, meses, med, (RIQ)	7,5 (5-13)	12,5 (6,2-21,7)	0,227
Mortalidad del CHC: n (%)	29 (39,7)	4 (26,7)	0,345

were more frequently women, especially those treated with antidepressants. In addition, those treated with antipsychotics were older, and were less often visited by a GP but were more often admitted to hospital the month prior to admission. Both, those treated with antipsychotics and those treated with antidepressants more often lived in and were discharged to nursing home facilities. Furthermore, those treated with antipsychotics more often died during admission. **Conclusions:** The prevalence of psychotropic medicines prescription was high in the elderly, especially the prescription of anxiolytics or hypnotics-sedatives and antidepressants. Women were more frequently prescribed than men, especially for antidepressants, and patients treated with antipsychotics had worse outcomes.

OSTEOARTHRITIS, DRUG USE AND RISK OF CARDIAC ISCHAEMIC EVENTS: A CASE-CONTROL STUDY

C. Pontes^{1,2}; R. Morros^{2,3}; J.R. Marsal^{3,4}; F. de Abajo⁵; J.R. Castillo⁶; J. Rios⁷; X. Carné⁸; and P. du Souich⁹

¹Hospital de Sabadell - Institut Universitari Parc Taulí, Sabadell, Spain; ²Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³SIDIAP - Sistema d'Informació pel Desenvolupament de la Investigació en Atenció Primària, IDIAP Jordi Gol, Barcelona, Spain; ⁴Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁵Universidad de Alcalá - Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Spain; ⁶Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; ⁷IDIBAPS - Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁸Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; and ⁹Faculté de Médecine - Université de Montréal, Montréal, Canada

Background: Recent controversies on the safety profile of drugs used to treat osteoarthritis (OA) have led to changes in clinical guidance for management (1). The objective of the study was to describe associations between the use of different OA drug therapies and the risk of cardiac ischemic events (CIE).

Material and Methods: We conducted a nested case-control study within a cohort of patients with clinically diagnosed OA (according to ICD10 codes in the SIDIAP database of primary care records for over 5 million people in Catalonia, Spain (2)). Study was approved by the corresponding Ethic's Committee. Cases were identified in the period 2008-2012 through ICD10 codes of cardiac ischemic events (CIE) (AIM or unstable angina, fatal or not) and cross-checked with hospital discharge diagnosis; 3 controls without CIE were matched to each case by sex, age (± 5 years), area and year (± 2 years) of first diagnosis of OA. Data were linked with pharmacy invoicing information, encrypted and extracted for analysis. Exposure to NSAIDs, SYSADOAs, opioids, paracetamol and metamizole were analysed. Adjusted multivariate conditional logistic regression models were fitted to estimate odds ratio (OR) for CIE according to drug use.

Results: We studied 5663 cases and 16989 matched controls. Cases had more morbidity and cardiovascular risk factors, but similar characteristics for OA and joint involvement. Significantly increased risks (OR 95% CI) were observed related to the use of non-selective NSAIDs (1.10(95% CI 1.01 to 1.19)), in particular for diclofenac (1.16(1.07 to 1.25) and naproxen (1.14(1.01 to 1.29)), and for opioid analgesics (1.13(1.04 to 1.24)). SYSADOAs, paracetamol and metamizole showed no significant associations with CIE.

Conclusions: In patients with OA, non-selective NSAIDs (diclofenac, naproxen) and opioid analgesics are associated to an increased risk of CV events. This should be considered for the management of OA patients with a high cardiovascular risk profile.

References

1. National Institute for Health Care and Excellence. Osteoarthritis care and management in adults. National Institute for Health and Care Excellence (United Kingdom), 2014.
2. <http://www.nice.org.uk/guidance/cg177/resources/guidance-osteoarthritis-pdf> (accessed 25th January 2015).
3. Bolibar B, Fina F, Morros R et al. SIDIAP database: electronic clinical records in Primary Care as a source of information for epidemiologic research. *Med Clin (Barc)* 2012;138:617-621.

METABOLIC RISK FACTORS AFFECT CLINICAL PHENOTYPE AND OUTCOME OF HEPATOTOXICITY (DILI)

J. Sanabria-Cabrera¹; M. Robles-Díaz^{1,2}; I. Medina-Cáliz^{1,2}; C. Stephens^{1,2}; A. Ruiz³; A. González-Jiménez¹; A. Ortega-Alonso¹; M. García-Cortés^{1,2}; B. García-Muñoz¹; M. Romero-Gómez^{2,4}; M.C. Fernández⁵; H. Hallal⁶; G. Soriano^{2,7}; E. Román^{2,7}; S. Blanco⁸; A. Castiella⁹; E.M. Zapata⁹; J.M. Navarro¹⁰; M. Jiménez¹¹; J.M. Moreno-Planas¹²; A. Aldea¹³; F. Bessone¹⁴; N. Hernández¹⁵; M. Arrese¹; R.J. Andrade^{1,2}; and M.I. Lucena^{1,2}

¹Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain; ³Facultad de Medicina Pontificia. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile; ⁴Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain; ⁵Hospital de Torrecárdenas, Almería, Spain; ⁶Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain; ⁷Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁸Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Spain; ⁹Hospital de Mendaró, Gipuzkoa, Spain; ¹⁰Hospital Costa del Sol, Málaga, Spain; ¹¹Hospital Regional de Málaga, Spain; ¹²Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Spain; ¹³Hospital Universitario de Canarias, Canarias, Spain; ¹⁴Hospital Provincial del Centenario, Rosario, Argentina; and ¹⁵Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay

Background: It has been suggested that metabolic risk factors may play a role in drug-induced liver injury (DILI) presentation. Hence, the aim of this study was to determine the influence of diabetes and dyslipidemia on the clinical profile of DILI.

Material and Methods: Clinical profiles of 864 DILI cases included in the Spanish DILI Registry were compared according to the presence or absence of diabetes and dyslipidemia. Patients with hepatic underlying diseases were excluded.

Results: Comparing patients with (n = 121) and without (n = 743) dyslipidemia, the mean age was significantly higher in the former group, 64 vs 52 years (P < 0.001); 38% of the patients with dyslipidemia were treated with statins. Duration of treatment of DILI causative agents and latency did not differ between the groups. Patients with dyslipidemia had significantly better outcomes (severe and fatal cases: 3% vs 13%, P = 0.009). In the dyslipidemia group, 30% of the patients had persisting liver damage after one year from DILI onset, compared to 22% in the non-dyslipidemia group. Comparing diabetic (n = 103) with non-diabetic (n = 737) DILI patients, higher mean age (66 vs 52, P < 0.001), higher mean BMI value (28 vs 25, P < 0.001) longer duration of treatment (158 vs 78 days, P = 0.001) and latency (140 vs 71 days, P = 0.002) were found in the former group. No differences in severity were observed. Among the diabetics, 28% had persisting liver damage > 1 year from DILI onset versus 22% of the non-diabetics.

Conclusions: Dyslipidemia appears to play a protective role in DILI severity, although persistent liver damage > 1 year from DILI onset



from major conference proceedings were searched (through 11/2016). Randomized controlled trials (RCTs) and nonrandomized studies evaluating the role of UDCA in intrahepatic cholestasis of pregnancy were included. Standard forms were used to extract data by two independent reviewers. Data regarding the following in UDCA and control group were extracted- patient characteristics, biochemical parameters, rate of pruritus improvement, cesarean section, premature deliveries, still birth, fetal distress, birth weights, babies with APGAR score less than 7, NICU admission, amniotic staining, respiratory distress. Summary effect sizes were computed using Comprehensive Meta-analysis software. Publication bias was assessed by funnel plots. Heterogeneity among studies was assessed. Quality of the studies was assessed using the Newcastle- Ottawa Scale. Random effects model was used for pooling data from RCTs. **Results** 28 studies were included (12 RCTs and 16 non-randomized studies). Studies were performed worldwide- China, Chile, Italy, Sweden, Czech, Germany, UK, Finland, USA, France, Portugal, Austria, Poland, India, Lithuania. RCTs included 314 patients in UDCA group and 348 controls, while non-randomized studies included 999 patients. Mean age ranged from 26 to 33 years. Pruritus improved in patients receiving UDCA RR 1.44(1.07-1.93, p=0.01, NNT = 4). Significant decrease in ALT in patients receiving UDCA standard mean diff 1.43(0.7-2.15, p=0.0001). Significant decrease in bile acid levels were also seen. No changes in AST or total bilirubin were seen. Rate of Cesarean section was lower in UDCA group RR 0.51(0.4-0.8, p=0.00). UDCA decreased the risk of a low APGAR score, RR 0.496 (0.257-0.956, p=0.036). NICU admission lower in newborn born to mothers who were on UDCA, RR 0.56(0.36-0.87, P=0.01). No effect on rate of still birth, fetal distress, meconium staining or respiratory distress were seen. Among the non-randomized studies, pruritus was improved in 14/16 studies. Improvement in biochemical parameters was seen in 14/15 studies. 5 studies reported decreased risk of preterm delivery with UDCA. No major adverse effects were seen with UDCA. **Conclusion:** Treatment with UDCA in patients with ICP improved pruritus, ALT and bile acids. No major adverse effects were noted.

1116

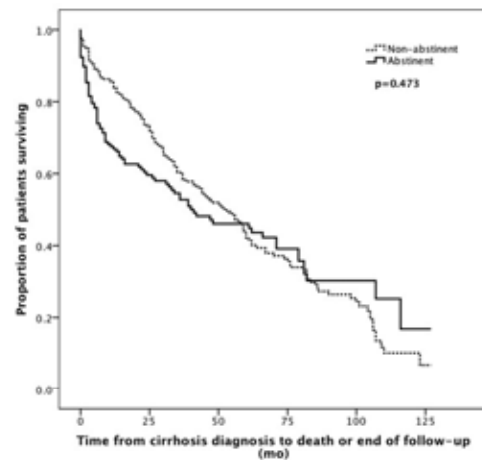
ABSTINENCE FROM ALCOHOL AND THERAPY FOR ALCOHOL USE DISORDER IN ALCOHOLIC LIVER CIRRHOSIS: AN INTERNATIONAL POPULATION-BASED STUDY

Evangelos Kalaitzakis, José Cruanes, Kristján Hauksson, Anders Håkansson, Konstantina Sargenti, Einar Björnsson

Abstinence from alcohol has been shown to be an independent predictor of survival in severe alcoholic hepatitis but its effect on survival in patients with advanced alcoholic cirrhosis is less clear. Psychosocial and pharmacological interventions are generally considered to be effective in alcohol use disorders (AUD), but data in alcoholic cirrhosis are limited. Our aim was to assess the relation of abstinence with survival in a population-based cohort of incident alcoholic cirrhosis. We also aimed to evaluate the real-life frequency of rehabilitation and pharmacological therapy for AUD and their potential effect on clinical outcome. **Methods** All patients with incident alcoholic cirrhosis in 2001-2010 residing in well-defined geographical areas in Sweden (population 0.6mi) and in Iceland (0.3mi) were retrospectively identified. Patients were followed until death, transplant or end of 2011. Data on cirrhosis severity and complications at diagnosis as well as on psychosocial factors, abstinence (ie complete alcohol exclusion) and AUD therapy during follow-up were collected. **Results** Overall, 410 patients with incident alcoholic cirrhosis were included. The majority were decompensated at diagnosis (table) and 39% remained abstinent during follow-up (median 39mo; IQR 13-60mo). Abstinence was related to older age at diagnosis but not gender, cirrhosis severity or complications, history of other substance abuse or psychosocial factors (table). In all, 13% of patients underwent alcohol rehabilitation and 9% received pharmacological therapy for AUD (5% acamprosate, 4% disulfiram, 1.5% naltrexone) but only 53% and 33% respectively remained abstinent (table). Although alcohol rehabilitation was more common among Icelandic than Swedish patients (49% vs 8%, p<0.01), the 2 groups did not differ in achievement of abstinence (table). Abstinence during follow-up was not related to survival (figure). This was also true when patients with compensated and decompensated disease at cirrhosis diagnosis were analyzed separately (p>0.05). In Cox regression analysis, older age (Hazard ratio(HR) 1.03, 95% confidence interval(CI) 1.04-1.08), higher MELD at cirrhosis diagnosis (HR 1.06, 95%CI 1.04-1.08), male gender (1.43, 95%CI 1.04-1.96) and living alone (HR 1.46, 95%CI 1.11-1.92), but not abstinence or AUD therapy (p>0.05) were related to mortality. **Conclusions** Abstinence from alcohol following cirrhosis diagnosis was achieved in 39% of patients but it did not appear to be a major predictor of survival. Only a minority of patients received pharmacological therapy or alcohol rehabilitation, which was not related to survival. Further studies are warranted to establish if uncaptured reduction in alcohol drinking may explain these findings and if they may be partly explained by the patients being "too sick to drink" due to factors not adequately accounted for in our cohort. Data in patients who were vs. those who were not abstinent from alcohol following alcoholic cirrhosis diagnosis

	All patients (n=410)	Abstinent during follow-up (n=159)	Non-abstinent during follow-up (n=251)	p-value
Age at diagnosis, yr	59 (9)	61 (9)	58 (10)	0.004
Male gender	71%	71%	70%	0.905
Other concomitant liver disease	19%	18%	20%	0.660
MELD score at diagnosis	13 (7)	14 (8)	13 (6)	0.391
Decompensated at diagnosis	61%	58%	63%	0.63%
History of other substance misuse	7%	5%	8%	0.331
Living alone	49%	48%	49%	0.856
Working/studying	25%	23%	26%	0.544
Alcohol rehabilitation therapy	13%	8%	15%	0.036
Pharmacological therapy for AUD	9%	4%	12%	0.003
Swedish patient (vs Icelandic)	88%	87%	89%	0.533

Data are presented as mean (standard deviation) or % as appropriate AUD, alcohol use disorders



Abstinence from alcohol during follow-up was not related to survival following diagnosis of alcoholic cirrhosis

1117

DATA MINING FOR POSSIBLE DRUG-HOST INTERPLAY IN CLINICAL PHENOTYPES OF DRUG-INDUCED LIVER INJURY

Andrés González-Jiménez, Minjun Chen, Kristin McEuen, Mercedes Robles-díaz, Inmaculada Medina-Caliz, Mahmoud Slim, Judith A. Sanabria, Camilla Stephens, Maria Isabel Lucena, Raul J. Andrade, Ayako Suzuki

[Background]: Drug-induced liver injury (DILI) can present with diverse clinical phenotypes even when the same agent is involved, while some drugs cause signature injury patterns (e.g., acute hepatocellular injury by acetaminophen; acute cholestasis by anabolic steroids). The diversity in clinical phenotypes associated with most of the causal drugs may be partly explained by multi-phasic interplays between drug properties and host factors (J Hep 2015; 63:503). **[Aims]** We aimed to explore and characterize drug-host interplay in initial biochemical presentations in a large well-characterized Spanish DILI patient population. **[Methods]** We analyzed 695 cases (probable or higher in the RUCAM causality assessment) enrolled in the Spanish DILI registry. Clinical information on demography, causal drugs, comorbidities, co-medications, and clinical manifestations including initial biochemical presentations, was collected at the time of study enrollment. Information on drug properties of the causal drugs was obtained from the literature as well as the Liver Toxicity Knowledge Base (CPT 2013; 93:409). Cases manifested as mixed biochemical injury pattern were excluded from this analysis. Logistic regression model (hepatocellular vs. cholesteric injury) was used to assess each host/drug factor pair along with their interaction term. Once a statistically significant interaction term was identified, separate logistic regression models were applied to determine whether a divergent relationship between liver injury and drug property exists among host factor subgroups. **[Results]** A total of 68 host factors and 71 drug properties were analyzed. Among 4828 host/drug factor pairs assessed, 26 pairs were identified as statistically significant interactions. The identified pairs included but were not limited to age-hepatic metabolism, hyperlipidemia-reactive metabolite, and allergic records-drug electronegativity. Further subgroup analyses revealed that older age (>60 years) was associated with cholesteric injury only for drugs which are not significantly metabolized in the liver (OR [95%CI]= 3.9[2.0-7.7], p=0.0001), such as amoxicillin-clavulanate, nitrofurantoin or methotrexate, but not for drugs with significant hepatic metabolism (OR [95%CI]= 1.6[0.9-2.9], p=0.09), such as isoniazid or flutamide. **[Conclusion]** Data-mining analysis using logistic regression models with an interaction term identified multiple potential combinations of host/drug factors, which may interact and modify initial biochemical presentations in

DILI. The identified interactions may aid in better understanding the heterogeneity of clinical presentations in DILI cases. Further methodological implementation to discover latent associations among multiple factors (>2 factors) are warranted. Funding: AEMPS, FEDER-P115/01440, CIBERhd-ISCIII

1144

THE UTILITY OF NAFLD FIBROSIS SCORE FOR PREDICTION OF MORTALITY AMONG PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS OF COHORT STUDY

Veeravich Jaruvongvanich, Karn Wijarnpreecha, Patompong Ungprasert

Background: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a common liver disorder worldwide. Several noninvasive diagnostic scoring systems have been developed to determine the severity of liver fibrosis and to predict long-term outcome of patients with NAFLD in lieu of liver biopsy. We conducted this systematic review and meta-analysis to investigate the role of NAFLD fibrosis score (NFS) for prediction of mortality from NAFLD. **Methods:** MEDLINE and EMBASE databases were searched through October 2016 for studies that investigated the association between high NFS and mortality. Pooled risk ratio (RR) and 95% confidence interval (CI) were calculated using a random-effects model, generic inverse variance method. The between-study heterogeneity of effect-size was quantified using the Q statistic and I^2 . **Results:** A total of five cohort studies with 5,033 NAFLD patients were identified. High NFS (score of greater than 0.675) was significantly associated with increased mortality with the pooled RR of 4.54 (95%CI 1.85 to 11.17). The statistical heterogeneity was high with I^2 of 88% ($P_{\text{heterogeneity}} < 0.01$) (Figure 1). **Conclusions:** High NFS is associated with increased risk of mortality among patients with NAFLD. This scoring system may be considered as an alternative to liver biopsy for prediction of mortality outcome.

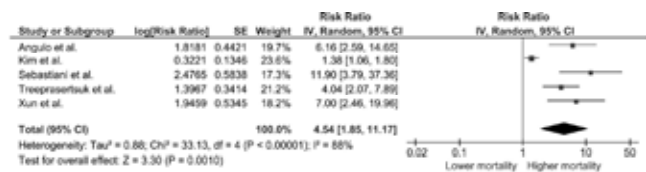


Figure 1 Forest plot of the included studies assessing the association between high NFS and mortality. A diamond data marker represents the overall OR and 95% CI for the outcome of interest. NFS: Nonalcoholic fatty liver disease fibrosis score

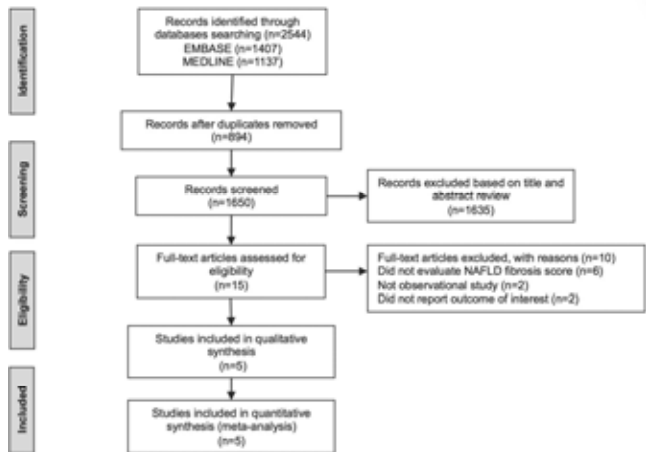


Figure 2 Search methodology and selection process

1145

HEPATIC LIPID COMPOSITION IS ASSOCIATED WITH LIVER FIBROSIS SEVERITY AND PREDICTS CLINICAL OUTCOMES

Ceen-Ming Tang, Jane Collier, Jonathan Booth, Lai Mun Wang, Kenneth Fleming, Stefan Neubauer, Eleanor Barnes, Jeremy Cobbold, Michael Pavlides

Background and aims: Hepatic steatosis is associated with liver fibrosis progression and is becoming increasingly prevalent. Previously, we established that *in vivo* analysis of hepatic lipid composition is feasible using proton magnetic resonance spectroscopy (^1H MRS). The aim of this study was to evaluate the relationship between hepatic lipid composition, liver fibrosis, and patient clinical outcomes. **Methods:** Patients ($n=228$) with mixed liver disease etiologies were recruited to have ^1H -MRS prior to clinically indicated liver biopsy. 17 patients did not have ^1H -MRS data available, and 21 spectra were excluded due to low signal-to-noise ratio. A control group of healthy volunteers was also included. MR spectra were analysed for hepatic lipid content (HLC; percentage of fat / water signal), and for the saturation index (SI; percentage of saturated / total lipid content). Fibrosis was staged histologically using the Ishak staging system, and categorized as early (F0-2), bridging (F3-4) and advanced (F5-6). Patients were followed up for liver related mortality and decompensation through retrospective review of the electronic patient records. To examine the effect of SI on clinical outcomes, patients were divided into three groups according to their SI: low ($SI < Q_1$), intermediate ($Q_1 > SI < Q_3$), and high ($SI > Q_3$). **Results:** The mean patient age was 52.0 ± 12.4 . A slight majority were men ($n=111$, 58.4%), and liver disease

etiologies included NAFLD ($n=75$, 39.5%) and viral hepatitis ($n=47$, 24.7%). 165 out of 190 patients underwent successful liver biopsy, and were staged as early ($n=90$, 54.5%), bridging ($n=28$, 17.0%), and advanced ($n=47$, 28.5%) fibrosis. The mean SI increased progressively from healthy controls (77.1%) to early (82.2%), bridging (83.6%), and advanced (84.6%) fibrosis, demonstrating a significant trend for higher content of saturated fat in more advanced stages of fibrosis (test for trend, $p < 0.0001$) (Figure 1). Follow-up data were available for 151 patients, with a mean follow-up time of 36 ± 16 months. A high SI ($> 85.82\%$) compared to intermediate SI (79.12 - 85.81%) and low SI ($< 79.11\%$) groups was associated with increased death (logrank test for trend, $p = 0.0458$), as well as decompensation and death (logrank test for trend, $p = 0.0399$) (Figure 2A, 2B). In patients with advanced fibrosis, there was a trend for increased risk of death amongst individuals with a higher SI (Figure 2C). There was no correlation between total HLC and clinical outcomes. **Conclusions:** This study suggests that saturated fat may be hepatotoxic as it demonstrates that there is an increased risk of decompensation and death amongst individuals with a higher SI, which may be independent of the level of fibrosis.

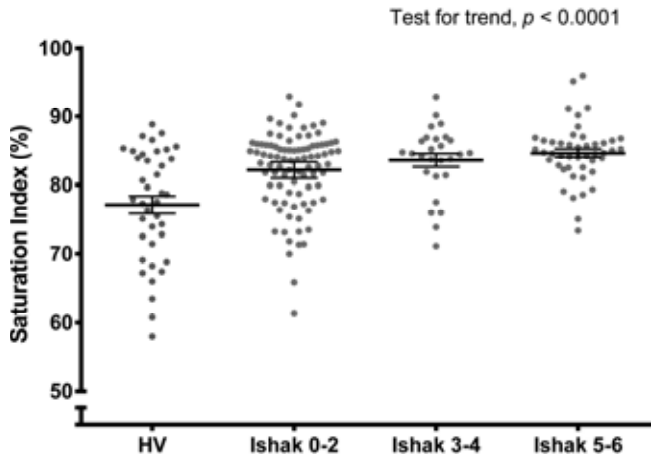


Figure 1: Relationship between saturated fat and fibrosis. Data shown are mean with standard error of the mean (SEM).

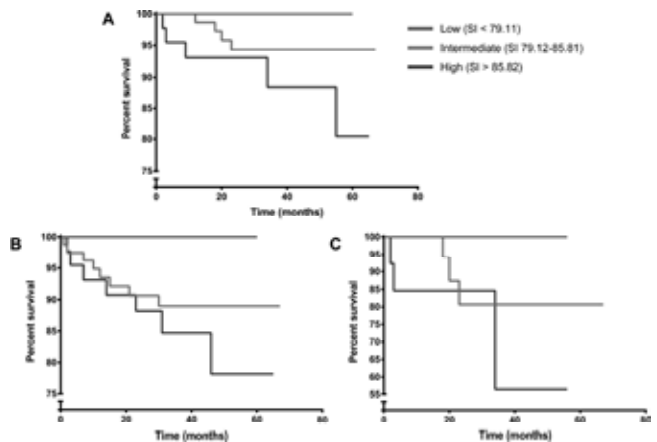


Figure 2: Kaplan-Meier curves of saturation index versus (A) death in all patients; (B) death and decompensation in all patients; (C) death in patients with advanced fibrosis.

Sal1476

HIGH RATE OF PROGRESSION TO CIRRHOSIS IN CHRONIC HEPATITIS B (CHB) PATIENTS WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER (FL)

Jie Li, Kevin T. Chung, Pauline Nguyen, An K. Le, Joseph Hoang, Mindie H. Nguyen

Background & Aims CHB is one of the leading causes of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide. Fatty liver is another common chronic liver disease. However, the prevalence of concurrent fatty liver and its effect on liver cirrhosis and HCC development in CHB patients is unclear. Our goal was to evaluate the prevalence of concurrent fatty liver and the effect of fatty liver on cirrhosis and HCC development in CHB patients. **Methods** We conducted a retrospective study on a cohort of consecutive HBV-infected patients at a U.S. medical center from 2000 to 2016. FL is defined with hepatic steatosis on US or CT/MRI. Cirrhosis was diagnosed via histology or clinical criteria. HCC diagnosis was confirmed either by histology or AASLD noninvasive criteria. **Results** Our study included 1,610 adult CHB patients. The majority were male 941 (58.4%) and with the mean age of 46 ± 14 years. Most patients (76%) were Asian. Among those patients, concurrent fatty liver (FL) was found in 526 patients (32.7%) and 67.1% of these were male. CHB patients with concurrent FL were older (47.8 ± 13.0 vs. 44.6 ± 14.8), more overweight (27.4% vs. 22.4%) or more likely to be obese (39.8% vs. 23.5%), and had increased BMI (25.5 ± 4.1 vs. 23.3 ± 4.0), waist circumference (36.0 vs. 33.7), higher anti-HBe seropositivity (77.7% vs. 71.1%), Glucose (115.3 ± 45.9 vs. 105.7 ± 31.8), ALT level (44 vs. 38), Triglyceride (150.9 ± 106.9 vs. 93.4 ± 57.5) compared with non-FL patients at baseline ($P < 0.01$ in all cases). In addition, the prevalence of metabolic factors, such as hypertension (35.7% vs. 21.9%), hyperlipidemia (20.5% vs.

AASLD Abstracts



FRI-448

The characterization of esophagogastric varices associated with oxaliplatin administration

N. Hattori¹, R. Shigefuku¹, T. Watanabe¹, N. Matsumoto¹, H. Nakano¹, H. Ikeda¹, K. Matsunaga¹, C. Okuse¹, M. Suzuki¹, F. Itoh¹. ¹St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Japan
E-mail: tsunamasa@gmail.com

Background and Aims: Oxaliplatin (L-OHP) is a key drug for chemotherapy in colorectal carcinoma. Although L-OHP is one of the cause of sinusoid obstruction syndrome (SOS) and portal hypertension (PH), the frequency and severity underlying the development of PH caused by L-OHP are not yet completely revealed in Japan. The aim of this study is to retrospectively elucidate the characteristics of patient status treated with L-OHP, and of their esophagogastric varices (EGV).

Methods: This study included a total of 180 patients with colorectal carcinoma, who were treated with chemotherapy including L-OHP as the first line treatment between October 2010 and January 2016. The SOS and PH caused by L-OHP was incorporated as platelet counts decreased more than 20% of pre-chemotherapy or spleen size detected by computed tomography (CT) increased more than 10% in longest length compared to those of pre-chemotherapy, and an appearance of EGV in CT or endoscopic findings.

Results: Of 180 patients with colorectal carcinoma treated with L-OHP, thrombocytopenia accounted for 102 cases (56%), splenomegaly for 61 cases (34%), and EGV for 7 cases (4%). In cases with an appearance of EGV, the median duration of chemotherapy was 8.3 (3–17) months, the median number of treatment session was 15.7 (8–29) times, and the median durations from the commencement of L-OHP to the varices treatment intervention was 20.8 (0–47) months. Moreover, platelet counts were decreased from $27.2 \pm 7.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ at pre-chemotherapy to $9.8 \pm 2.9 \times 10^4/\mu\text{L}$ at appearance of EGV ($P = 0.0007$), and spleen size was increased from 9.7 ± 1.6 cm to 13.1 ± 1.5 cm ($P = 0.0002$). There were 2 cases with ruptured esophageal varices (EV) underwent endoscopic variceal ligation, 3 cases with unruptured EV underwent endoscopic injection sclerotherapy, and 2 cases with unruptured gastric varices underwent balloon-occluded retrograde transvenous obliteration. There was no variceal rupture related death, and 4 dead cases due to primary disease, 3 cases with EGV still alive under treatment intervention.

Conclusions: All cases of PH caused by L-OHP showed marked thrombocytopenia and splenomegaly. Even if the treatment duration was less than 1 year, there is a possibility of varication after a lapse of more than 3 years since the commencement of L-OHP. We speculate that SOS induced by L-OHP has a long lasting effect in liver. Therefore, all cases underwent chemotherapy including L-OHP need to be monitored for varication on regular gastroscopy even after completion of chemotherapy.

FRI-449

Drug-induced liver injury: presentations, causes and outcomes: an Egyptian study

O. Alhadad¹, M. Elsabaawy¹, E.A. Sameea¹, A. Roshdy², A. Shaban¹, M. Salama¹. ¹Hepatology Department, National Liver Institute, Menoufiya University; ²Epidemiology and Preventive Medicine Department, National Liver Institute, Menoufiya University, Shebin El Kom, Egypt
E-mail: eabdelsameea@liver-eg.org

Background and Aims: Drug-induced liver injury (DILI) is frequent cause of liver injury and acute liver failure and is the most common rationale for elimination of approved drugs from markets.

Methods: In this prospective study; liver injury was defined based on levels of alanine aminotransferase more than 3-fold and/or alkaline phosphatase levels more than 2-fold the upper limit of normal. Drug history along with liver biopsy whenever feasible and Causality assessment using Roussel Uclaf Causality Assessment Method (RUCAM) were the diagnostic prerequisites after exclusion of other

etiologies of acute liver injury either: viral, biliary, hemodynamic, or malignancy. Cases were followed up over one year with complete data registry.

Results: DILI occurred due to one drug in 93.3% of cases, and by two drugs in 6.7% of cases. In order of frequency the incriminated drugs were: Diclofenac (31 cases, 41.3%), amoxicillin-clavulanate (14 cases, 18.7%), halothane toxicity (8 cases, 10.7%), ibuprofen (4 cases, 5.3%), Khat (3 cases, 4%), and tramadol (3 cases, 4%), Sofosbuvir with ribavirin (2 cases, 2.7%), and acetyl salicylic acid (2 cases, 2.7%). Forty four cases (58.7%) were males and fifty six cases (74.7%) having background of HCV related chronic liver disease. Thirty two cases (42.7%) presented with hepatocellular injury, while 23 cases (30.7%) were with cholestasis, and 20 cases (20.7%) with mixed pattern of injury. one case received transplant (0.75%), 7 cases died (9.3%), 23 cases (30.6%) developed liver decompensation (hepatic encephalopathy and ascites), and forty four cases showed complete resolution (58.7%). In patients with complete resolution; 23 cases were having hepatocellular injury (52.3%). In univariate analysis; chronic liver disease ($p < 0.001$), cholestasis ($p < 0.001$), age ($p = 0.004$), absence of eosinophilia (0.031) and low prothrombin concentration ($p = 0.001$) were independent risk factors for DILI bad outcome. Multivariate analysis; only advanced age ($p < 0.001$), and low prothrombin concentration ($p = 0.001$) as predictors of unfavorable outcomes.

Table 1: Frequency of received hepatotoxic drugs among studied group of patients.

Studied variables	Total (n = 75)	
	No	%
Amoxicillin Clavulanic acid	14	18.7
Halothane	8	10.7
Diclofenac	31	41.3
Interferon & sofosbuvir & ribavirin	1	1.3
Chemotherapy (indoxan, vincristin)	2	2.7
Acetyl salicylic acid	2	2.7
Khat	3	4
Tramadol	3	4
Ibuprofen	4	5.3
Sofosbuvir + ribavirin	2	2.7
Carbimazole	1	1.3
Tenoxicam	1	1.3
Metimazole	1	1.3
Hormonal therapy (progesterone)	1	1.3
Carbamazepine	1	1.3

Table 2: Factors associated with outcome among studied group of patients (n = 75).

Variables	P-value	OR*	95% CI	
			Lower	Upper
Age	<0.001	1.113	1.055	1.174
Prothrombin concentration	0.001	0.943	0.912	0.975

Conclusions: Diclofenac is the most common offender in DILI occurrence in an Egyptian cohort. Age and prothrombin concentration were the only predictors of DILI unfavorable outcomes.

FRI-450

Influence of host characteristics and pharmacological properties on type of liver injury in hepatotoxicity

A. Gonzalez-Jimenez¹, M. Chen², K. McEuen², C. Stephens¹, I. Medina-Caliz¹, M. Robles-diaz¹, M. Slim¹, M.I. Lucena¹, A. Suzuki³, R. Andrade¹. ¹IBIMA, H. Virgen de la Victoria, Universidad de Malaga, CIBERehd, Malaga, Spain; ²Division of Bioinformatics and Biostatistics, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR; ³Department of Medicine, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, United States
E-mail: kolidri@gmail.com



POSTER PRESENTATIONS

Background and Aims: The clinical course of drug-induced liver injury (DILI) is typically categorized as hepatocellular, cholestatic, or mixed. This categorization is important for the diagnosis of causative drugs and the assessment of possible clinical outcomes. Here we aimed to evaluate host and pharmacological factors that were associated with the development of liver injury pattern.

Methods: 564 DILI cases classified according to biochemical parameters as having hepatocellular and cholestatic type of liver injury were selected out of 692 cases enrolled in the Spanish DILI registry. Univariate analyses and logistic regressions (R software) were performed to compare the pharmacological properties of causative drugs and host factors between the two groups (hepatocellular vs cholestatic injury).

Results: Of the study cohort, 437 (77%) cases had hepatocellular and 127 (23%) cholestatic type of liver damage. Seven parameters were identified as being best predictors for liver injury pattern by using the logistic regression analysis. Parameters increasing the risk of hepatocellular damage included: age < 60 years (Odds ratio or OR = 2.06; $p = 0.0029$), previously known allergic records (OR = 2.61; $p = 0.0493$), >50% hepatic metabolism (OR = 1.70; $p = 0.0417$), entero-hepatic circulation (OR = 4.94; $p < 0.0001$) and causative drugs with a chemical double/single bond ratio >0.5 (OR = 2.04; $p = 0.0285$). In contrast, presence of co-medications for cardiac disease and causative drugs with a higher number of heterorings (OR = 0.68, $p = 0.0270$) were found to decrease the risk of a hepatocellular injury pattern (OR = 0.47, $p = 0.0030$). Interaction between older age (≥ 60 y) and culprit drugs with low hepatic metabolism, but not high hepatic metabolism, increase the risk of cholestatic damage (OR = 3.49, $p = 0.0001$).

Conclusions: Host factors and pharmacological properties seem to play a complementary role in the prediction of injury pattern in DILI. The pharmacological properties facilitating hepatocellular damage seem to be related with increased drug exposure or hepatocyte damage. A high drug metabolism could be associated with an increased possibility of generating reactive metabolites.

Funding: AEMPS and ISCIII-FEDER (P115/01440, AC-0073-2013, CIBERehd)

FRI-451

Liver progenitor cells significantly contribute to hepatocyte pool in chronic liver injury and cirrhosis: a kinetic study in mice

R. Manco¹, L.-A. Clerbaux¹, I. Leclercq¹. ¹Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

E-mail: rita.manco@uclouvain.be

Background and Aims: Self-renewal of mature hepatocytes supports homeostasis and regeneration of adult liver. Recent studies indicate that liver progenitor cells (LPC) are recruited upon injury as a facultative reservoir for generation of hepatocytes, although only a small number of mature hepatocytes were shown to derive from LPC *in vivo*. Models used for these studies do not recapitulate long lasting chronic hepatocellular damage and fibrosis seen in human chronic liver disease and cirrhosis. Our aim is therefore to follow the dynamics of ductular reaction (DR) and the LPC's fate during chronic liver injury in mice.

Methods: We used tamoxifen-inducible Osteopontin-Cre (OPN-Cre^{ERT2}) mice crossed with yellow fluorescent protein (YFP) reporter mice to follow the fate of LPC and biliary cells with an efficiency >85%. Long-term chronic injury was induced by repeated carbon tetrachloride (CCl₄) injections 3x/week for 4, 6, 8, 16 and 24 weeks, resulting in chronic fibrosis and eventually cirrhosis.

Results: After 4 weeks CCl₄, DR is minimal with few ck19⁺/YFP⁺ positive cells in periportal area and LPC-derived hepatocytes (traced as YFP⁺ hepatocytes) are inconspicuous. After 6 weeks, DR is similar in intensity but small foci of YFP⁺ hepatocytes adjacent to portal area are readily seen; these have a median size of 3,010 μm^2 . As fibrotic disease increases in severity, the DR is negligible while patches of YFP⁺ hepatocytes become larger (median size of 3,850 μm^2 and

7,040 μm^2 at 8 and 16 weeks, respectively) and extend to into the parenchyma. In the cirrhotic liver (24 weeks CCl₄) some regenerative nodules are entirely composed of YFP⁺ hepatocytes. The number of YFP⁺ hepatocytes does not rise accordingly to the size of the patches as they represent $4.2 \pm 2.4\%$ of the lobule area in 6 weeks' samples, increases up to $11.5 \pm 3.8\%$ in 8 weeks' samples and stabilizes around 5% thereafter, suggesting that not all YFP⁺ hepatocytes expand into growing patches. At 6 weeks, YFP⁺ hepatocytes are significantly smaller cells than YFP⁻ native hepatocytes (750 vs. 981 μm^2) but in 16 weeks' samples YFP⁺ and YFP⁻ hepatocytes have the same size (996 and 1,001 μm^2).

Conclusions: Our data demonstrate a significant contribution of LPC-driven regeneration in a model of chronic liver injury leading to cirrhosis. The kinetic study supports that when DR is present, LPC differentiate into small hepatocytes, some of these subsequently increase in number and in size. Clonality studies are ongoing to test this hypothesis.

FRI-452

Benzo[a]pyrene and ethanol exert a high toxicity potential in steatotic HepaRG cells: possible role of low NDUFA4L2 expression

S. Bucher¹, D. Le Guillou¹, K. Begriche¹, C. Coulouarn¹, B. Fromenty¹.

¹INSERM U991, Université de Rennes 1, Rennes, France

E-mail: simon.bucher@univ-rennes1.fr

Background and Aims: In non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), progression of fatty liver to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) could be favored by different xenobiotics including ethanol and some environmental pollutants such as benzo[a]pyrene (BaP). However, the mechanisms involved in NAFLD aggravation are not precisely determined. We wished to assess the toxicity of ethanol (EtOH), BaP or the combination of the two molecules (EtOH + BaP) in steatotic HepaRG cells (SHC) in comparison with non-steatotic cells (NSHC).

Methods: To this end, SHC and NSHC were treated for 14 days with these molecules and investigations were performed at the end of the treatment to determine cell viability, triglycerides accumulation, mitochondrial function, ROS production and genome-wide expression profiling. Notably, we have recently shown that HepaRG cells incubated with some fatty acids could be a valuable model to study drug-induced hepatotoxicity in the context of NAFLD [1]. In most experiments, EtOH concentration was 25 mM whereas BaP concentrations were 1 or 2.5 mM. These BaP concentrations were significantly below the EC₅₀ determined for BaP in NSHC cultured without EtOH.

Results: We showed that EtOH + BaP is more toxic in SHC when compared to NSHC and that this toxicity is higher compared to EtOH, or BaP alone. The toxicity mediated by EtOH + BaP in SHC was associated with low cytochrome P450 3A4 expression and activity, a relatively high formation of the toxic BaP metabolite 7,8-dihydroxy-7,8-dihydro-BaP, elevated ROS and interleukin 6 (IL-6) production as well as high rate of mitochondrial fatty acid oxidation. Interestingly, the latter effect was associated with lower triglyceride levels in SHC. Furthermore, our microarray data and recent data [2] suggested that these cellular and mitochondrial effects could be linked to the profound suppression of NDUFA4L2 expression, which plays a major role in respiratory chain function and ROS production.

Conclusions: Our results suggest that the co-exposure of EtOH and BaP could be particularly deleterious for fatty liver and could participate to the progression toward NASH, in particular by promoting ROS generation at the mitochondrial level. We plan to perform investigations to determine whether the collapse of NDUFA4L2 expression induced by EtOH + BaP is the main mechanism responsible for its high toxicity potential.

References

- [1] Michaut *et al.*, *Toxicol Appl Pharmacol* 2016.
- [2] Lai *et al.*, *Clin Cancer Res* 2016.



Premio a la Mejor Comunicación en Formato Cartel

**THE INFLUENCE OF DRUG PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES ON DELAYED ONSET IN
HEPATOTOXICITY: AN ANALYSIS OF THE COHORT INCLUDED IN THE SPANISH DILI
REGISTRY**

**A. González Jiménez, A. Suzuki, C. Stephens, M. Chen, I. Medina Cáliz, M. Robles Díaz,
E. Montané, A. Aldea, R.J. Andrade, M.I. Lucena**

36 Congreso de la Sociedad Española de Farmacología

celebrado en Valencia del 16 al 18 de Septiembre de 2015

M.ª José Alcaraz
Presidenta C. Organizador

M.ª Dolores Barrachina
Presidenta C. Organizador

M.ª Jesús Sanz
Presidenta C. Científico