



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

**HEPATOTOXICIDAD QUIMIO-INDUCIDA EN NIÑOS
ONCOLÓGICOS. ANÁLISIS DE FACTORES
INMUNOGENÉTICOS ASOCIADOS
(HLA, POLIMORFISMOS IL-10 Y GENOTIPO KIR)**

Tesis doctoral presentada por Emilia Urrutia Maldonado para optar al
Grado de Doctor en Medicina.

Dirigida por la Doctora Esther Ocete Hita
Granada 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Emilia Urrutia Maldonado
ISBN: 978-84-1306-603-5
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63652>

A mis padres, gracias por tanto.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

AUTORIZACION PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

DRA ESTHER OCETE HITA, PROFESORA ACREDITADA TITULAR DE PEDIATRÍA DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA.

CERTIFICA: Que Doña Emilia Urrutia Maldonado, licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi investigación el trabajo de investigación titulado: **“HEPATOTOXICIDAD QUIMIO-INDUCIDA EN NIÑOS ONCOLÓGICOS. ANÁLISIS DE FACTORES INMUNOGENÉTICOS ASOCIADOS (HLA, POLIMORFISMOS IL-10 Y GENOTIPO KIR).**

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el tribunal que se designe al efecto, por lo que: **AUTORIZO** la presentación de dicho trabajo como Tesis, para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente certificación en Granada a 12 de mayo de 2020.

Fdo Doctora Esther Ocete Hita

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora, la doctora Esther Ocete, su paciencia, y sobre todo su estímulo continuo a pesar de todo lo que ha ido sucediendo en este tiempo, con sus implicaciones personales y laborales. También quiero agradecer a mi tutora la doctora Ángela Ruiz y al doctor Gil Montoya, coordinador del programa de doctorado, su cercanía y su buena disponibilidad siempre.

A mis compañeras de trabajo, que han soportado estoicamente mi reducción de jornada para poder acabar este trabajo y me han ayudado a continuar cuando me desanimaba. Especialmente a Maria José Moreno, que me inculcó el amor por esta profesión tan difícil, pero tan apasionante. A Puri Romera, mi enfermera, que con tanto cariño e interés me guardaba las muestras de los pacientes...sin ella creo que no habría acabado aún.

A mis pequeños pacientes y sus padres, que no dudaron en participar en este estudio si con ello podían ayudar a cualquier otra persona en el futuro...qué gran lección de vida me dáis continuamente...

A mi hijo y mi marido, que lo son todo...me gustaría que alguna vez leyeran esto y pensaran que ha merecido la pena el tiempo que he dejado de dedicarles todos estos meses.

A mi hermano, espero que esté orgulloso de su hermana mayor.

Y por último a mis padres, a los que tengo tanto que agradecer...Por su esfuerzo diario, su cariño y apoyo incondicional, y su tiempo, hoy soy lo que soy. Son los mejores padres, y los mejores abuelos que se pueden tener. Gracias por estar siempre.

Publicaciones y comunicaciones científicas relacionadas con la tesis:

- Publicaciones:

1. Urrutia-Maldonado E, Alés-Palmer M, Muñoz De Rueda P, Peláez-Pleguezuelos I, Ocete-Hita E. *The relation between activator and inhibitor killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) and hepatotoxicity in oncological treatment*. *Minerva Pediatr*. 2019 Jun 28. DOI: 10.23736/S0026-4946.19.05544-0. [Epub ahead of print]

2. Emilia Urrutia Maldonado, Ana Abril Molina, María Alés Palmer, Jose María Gómez Luque, Paloma Muñoz de Rueda, Esther Ocete Hita. *Lesión hepática inducida por quimioterapia en niños*. *An Pediatr*. 2019;91(4):256-263. DOI: 10.1016/j.anpedi.2019.01.003

3. Ocete-Hita E, Urrutia-Maldonado E, Alés Palmer ML, Trujillo L, Jose M Gómez Luque. *Pharmacogenetics and Chemotherapy- Associated Hepatotoxicity in Children*. *J of Pharmacol & Clin Res*. 2017; 2(4): JPCR.MS.ID.555592.

- Comunicaciones a Congresos:

4. Emilia Urrutia Maldonado, Maria Luisa Alés Palmer, Alba Henares Rodriguez, María José Moreno García, Esther Ocete Hita. *Hepatotoxicidad Quimio-inducida en pacientes pediátricos con leucemia Linfoblástica aguda*. 64 Congreso de la AEP, celebrado en Valencia del 2 al 4 de junio de 2016.

5. Emilia Urrutia Maldonado; Maria Luisa Alés Palmer; Olga Escobosa Sánchez; María José Moreno García; Esther Ocete Hita. *Relación entre los polimorfismos de los receptores de tipo inmunoglobulina de las células natural killer (kirs) y la hepatotoxicidad inducida por quimioterapia*. XII Congreso de la SEHOP, celebrado en Jerez de la Frontera del 30 de mayo al 1 de junio de 2019.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	XVII
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 EL HÍGADO. GENERALIDADES Y CONCEPTOS	4
2.1.1 Reacciones de biotransformación hepáticas	4
2.1.2 Hepatotoxicidad	6
2.1.2.1 Tipos de hepatotoxicidad.....	6
2.1.2.2 Mecanismos fisiopatológicos.....	7
2.1.2.2.1 Colestasis.....	8
2.1.2.2.2 Apoptosis inducida por ácido biliar.....	9
2.1.2.2.3 Daño hepático por neutrófilos y macrófagos.....	9
2.1.2.2.4 Toxicidad mitocondrial.....	10
2.1.2.2.5 Mecanismos inmunológicos.....	10
2.1.2.2.5.1 Sistema inmune innato.....	10
2.1.2.2.5.2 Sistema inmune adaptativo.....	11
2.1.2.3 Clasificación Clínica.....	12
2.1.2.4 Factores de riesgo.....	14
2.1.2.5 Diagnóstico.....	17
2.1.2.6 Tratamiento.....	18
2.1.2.7 Sistemas de detección y registro.....	18
2.2 RESPUESTA INMUNE. INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA	20
2.2.1 Linfocitos T	21
2.2.1.1 Estructura y genética del receptor de los linfocitos T (TcR).....	21
2.2.1.2 Correceptores CD4 y CD8 y moléculas accesorias.....	22
2.2.1.3 Transducción de señales en el linfocito T.....	23
2.2.2 Natural Killer (NK)	24
2.2.2.1 Función citotóxica.....	24
2.2.2.2 Función secretora.....	25
2.2.2.3 Receptores NK específicos de antígenos HLA.....	25
2.2.2.3.1 Receptores NK tipo KIR.....	25
2.2.2.3.1.1 Variabilidad en los receptores KIR.....	26
2.2.2.4 Transducción de señales en las células NK.....	26
2.2.3 Citoquinas	27
1.2.3.1 Interleuquina-10.....	28
1.2.3.2 Factor de Necrosis Tumoral Alfa.....	29
1.2.3.3 Factor de Crecimiento Transformante β	29
1.2.3.4 Interleuquina- 6.....	29
1.2.3.5 Interferón Gamma.....	30
2.2.4 Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)	30
2.2.4.1 Moléculas de Clase I.....	31
2.2.4.2 Moléculas de Clase II.....	32
2.2.4.3 Función de las moléculas de clase I y clase II.....	32
2.2.4.4 Polimorfismo y poligenia.....	33
2.2.4.5 HLA y hepatotoxicidad.....	33

2.3 HEPATOTOXICIDAD Y QUIMIOTERAPIA.....	35
2.3.1 Leucemia linfoblástica aguda.....	36
2.3.1.1 Epidemiología.....	36
2.3.1.2 Fisiopatología.....	36
2.3.1.3 Pronóstico y grupos de riesgo.....	38
2.3.1.4 Tratamiento.....	39
2.3.1.5. Hepatotoxicidad en el tratamiento de la LLA.....	42
2.3.1.5.1 Epidemiología y manifestaciones clínicas.....	42
2.3.1.5.2 Grados de hepatotoxicidad en protocolos actuales.....	42
2.3.1.5.3 Principales citostáticos implicados.....	43
2.3.1.5.3.1 Antimetabolitos.....	43
2.3.1.5.3.2 Agentes alquilantes.....	48
2.3.1.5.3.3 Antibióticos antitumorales.....	48
2.3.1.5.3.4 Alcaloides de la vinca.....	49
2.3.1.5.3.5 Otros.....	49
2.3.2 Linfoma linfoblástico.....	49
2.3.3 Histiocitosis.....	50
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
3.1 HIPÓTESIS.....	54
3.2 OBJETIVOS.....	54
3.2.1 Principal.....	54
3.2.2 Secundarios.....	54
4. PACIENTES Y METODOLOGIA.....	56
4.1 DISEÑO.....	57
4.2 SUJETOS Y ÁMBITO DE ESTUDIO.....	57
4.2.1 Criterios de inclusión.....	57
4.2.2 Criterios de exclusión.....	57
4.2.3 Recogida de datos.....	57
4.2.3.1 Establecimiento de causalidad.....	58
5. VARIABLES DEL ESTUDIO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	61
5.1 VARIABLES DEL ESTUDIO.....	62
5.2 ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	62
6. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	65
6.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	66
6.2 CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS.....	66
7. RESULTADOS.....	68
7.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LOS CASOS.....	70
7.1.1 Sexo.....	73
7.1.2 Edad.....	73
7.1.3 Diagnóstico principal.....	73
7.1.4 Número de episodios de hepatotoxicidad.....	74
7.1.5 Fase del tratamiento.....	74
7.1.6 Quimioterápico atribuido a la hepatotoxicidad.....	75
7.1.7 Síntomas.....	75

7.1.8 Función hepática.....	76
7.1.9 Tipo de daño hepático.....	78
7.1.10 Tiempo de detección de la hepatotoxicidad.....	78
7.1.11 Atribución de causalidad.....	79
7.1.12 Gravedad del daño hepático.....	79
7.1.13 Pruebas de imagen.....	80
7.1.14 Consecuencias de la hepatotoxicidad en el tratamiento.....	80
7.2 CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO CONTROL.....	82
7.3 ESTUDIO DEL HLA.....	83
7.3.1 Estudio en el total de la muestra.....	85
7.3.2 Análisis en los casos y controles.....	87
7.4 ANÁLISIS DEL GENOTIPO KIR.....	89
7.4.1 Estudio en el total de la muestra.....	89
7.4.2 Análisis en los casos y controles.....	90
7.5 INVESTIGACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LAS CITOQUINAS.....	96
7.5.1 Análisis de polimorfismos de la IL-10 en casos y controles.....	96
7.5.2 Análisis de polimorfismos del Factor de Necrosis Tumoral alfa en casos y controles.....	97
7.5.3 Análisis de polimorfismos del Factor de Crecimiento Transformante β	98
7.5.4 Análisis de polimorfismos de la IL-6.....	99
7.5.5 Análisis de polimorfismos del Interferón Gamma.....	100
8. DISCUSIÓN.....	102
9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	108
9.1 DERIVADAS DEL DISEÑO.....	109
9.2 DERIVADAS DEL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS.....	109
10. CONCLUSIONES.....	111
11. BIBLIOGRAFÍA.....	115
12. ANEXOS.....	133

ABREVIATURAS

6-MP Mercaptopurina.

ABC Proteínas transportadoras ATP dependientes (Adenosine Triphosphate-Binding Cassette).

ALT (GPT) Alanino Aminotransferasa.

ANA Anticuerpos Antinucleares.

APAP Ácido para-acetil aminofenol (Acetaminofeno. Paracetamol).

APC Célula Presentadora de Antígeno.

APS Asparaginasa nativa de E. coli.

AR Alto Riesgo.

ARA-C Citarabina.

ASMA Anticuerpos Antimúsculo Liso.

AST (GOT) Aspartato Aminotransferasa.

ATIC 5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa.

ATP Adenosin Trifosfato.

BSEP Bomba Exportadora de Sales Biliares.

BT Bilirrubina Total.

CDR Regiones Determinantes de Complementariedad.

CFM Ciclofosfamida.

CIOMS Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (Council for International Organizations of Medical Sciences).

CMH Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

CONS Consolidación.

CYP Citocromo P 450.

DHFR Dihidrofolato Reductasa.

DILI Lesión Hepática Inducida por Drogas (Drug-Induced Liver Injury).

DNR Daunorrubicina.

DOXO Doxorrubicina.

DS Desviación estándar.

EMR Enfermedad Mínima Residual.

FA Fosfatasa Alcalina.

GCDC Ácido glico-quenodesoxicólico.

GGH Gamma Glutamil hidrolasa.

GPX1 Glutation peroxidasa 1.

GST Glutation S-transferasa.

GWAS Estudio Amplio de Asociación Genómica (Genome-wide association study).

HD ARA-C Citarabina a altas dosis.

HD-MTX Metotrexato a altas dosis.

HLA Antígeno Leucocitario Humano (Human Leucocyte Antigen).

HTLV Virus Linfotropo de Celulas T Humanas.

HTX Hepatotoxicidad.

IC Intervalo de confianza.

ICAM-1 Molécula de Adhesión Intercelular.

IFN Interferon.

IFO Ifosfamida.

IL Interleuquinas.

ILTs Transcritores similares al de las Inmunoglobulinas. (Immunoglobulin like transcripts).

Ind.A Inducción Fase A.

Ind.B Inducción Fase B.

ITAM Motivos de Activación del Inmunoreceptor.

ITIM Receptores de Tirosina con Motivo Inhibidor (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs).

ITPA Pirofosfatasa de Trifostato de Inosina.

KIRs Receptores de Células Natural Killer similares al de las Inmunoglobulinas (killer cell Ig-like receptors).

LCR Complejo del Receptor de Leucocitos (leukocyte receptor complex).

LLA Leucemia Linfoblástica Aguda.

LMA Leucemia Mieloblástica Aguda.

LN Límite Normal.

LSN Límite Superior de la Normalidad.

MDR Proteína Resistente a Múltiples Drogas.

MMPN Metilmeracptopurina nucleótido.

MRP Proteínas Relacionadas con la Resistencia a Múltiples Fármacos.

MTHFR Metil Tetrahidrofolato Reductasa.

NADPH Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

NAT N-Acetiltransferasa-AcetilCoA.

NCI Instituto nacional del Cáncer de Estados Unidos.

NK Natural Killer.

NO-HTX No hepatotoxicidad.

OATP Polipéptidos Transportadores de Aniones Orgánicos.

OMS Organización Mundial de la Salud.

OR Odds Ratio.

PAMP Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

PEG-ASP Asparaginasa Pegilada de E. coli.

PPTM Poro de Permeabilidad Transitoria Mitocondrial.

PRED Prednisona.

RAF Reacción Adversa a Fármacos.

RAG Genes de Activación de la Recombinación.

RE Riesgo Estándar.

REIND Reinducción.

RI Riesgo Intermedio.

ROS Especies Reactivas al Oxígeno.

RUCAM Método de Evaluación de Roussel UCLAF (Roussel Uclaf Assessment Method).

SEHOP Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas

SNP Polimorfismos de un Único Nucleótido.

SOD Superóxido Dismutasa.

SSO Oligonucleótidos de Secuencia Específica.

TcR Receptor de células T.

TG Tioguanina.

TGF Factor de Crecimiento Transformante.

TGN Tioguanina nucleótidos.

TIT Triple Intratecal.

TNF Factor de Necrosis Tumoral.

TPH Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos.

TPMT Tiopurin S-Metiltransferasa.

TS Timidilato sintetasa.

VCR Vincristina.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipo de lesión hepática.....	13
Tabla 2. Polimorfismos enzimáticos y hepatotoxicidad.....	16
Tabla 3. HLA I y II asociados con la hepatotoxicidad.....	16
Tabla 4. Citoquinas, quimiocinas y sus funciones.....	20
Tabla 5. Organización génica del CMH.....	31
Tabla 6. Translocaciones más frecuentes en la LLA.....	37
Tabla 7. Fármacos usados en cada fase del tratamiento de la LLA en niños, según esquema SEHOP-PETHEMA 2014.....	41
Tabla 8. Grados de hepatotoxicidad según el National Cancer Institute of United States (NCI).....	43
Tabla 9. Tratamiento del linfoma linfoblástico.....	50
Tabla 10. Características epidemiológicas y clínicas de los casos.....	70
Tabla 11.1. Características de los casos graves.....	79
Tabla 11.2. Características de los casos graves.....	80
Tabla 12. Características epidemiológicas de los controles.....	82
Tabla 13. Tabla de contingencia del HLA-DRB*0101.....	87
Tabla 14. Tabla de contingencia del HLA-DQB*05.....	88
Tabla 15. Tabla de contingencia para la variable “todos los KIRs”	91
Tabla 16. Tabla de contingencia y regresión logística de genotipo KIR K2DS2.....	91
Tabla 17. Tablas de contingencia de la presencia de KIRs activadores e inhibidores en casos y controles.....	92
Tabla 18. Tabla de contingencia de la presencia de KIRs activadores e inhibidores en casos y controles.....	93
Tabla 19. Tabla de contingencia del estudio de ligandos KIR en casos y controles.....	93
Tabla 20. Tabla de contingencia y regresión logística del estudio del complejo KIR-ligando en casos y controles.....	94
Tabla 21. Distribución de homocigotos/heterocigotos para los alelos KIR2DL2/KIR2DL3 en casos y controles.....	95
Tabla 22. Tabla de contingencia de la distribución de homocigotos/heterocigotos para los alelos KIR3DL1/KIR3DS1 en casos y controles.....	95

Tabla 23. Tabla de contingencia de fenotipos IL-10 en casos y controles.....	96
Tabla 24. Tabla de contingencia de genotipos y fenotipos TNF- α en casos y controles...	97
Tabla 25. Tabla de contingencia de genotipos y fenotipos TGF- β en casos y controles...	98
Tabla 26. Tabla de contingencia de genotipos y fenotipos IL-6 en casos y controles.....	99
Tabla 27. Tabla de contingencia de fenotipos IFN- γ en casos y controles.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transportadores de sales biliares en hígado humano y colangiocitos.....	5
Figura 2. Mecanismos de hepatotoxicidad.....	8
Figura 3. Papel de la respuesta inmune del huésped en la patogénesis de DILI.....	11
Figura 4. Factores de riesgo potenciales involucrados en la patogénesis de DILI.....	14
Figura 5. Estructura del receptor TcR.....	22
Figura 6. Interacción de los correceptores con las moléculas MHC.....	23
Figura 7. Transducción de señales en el linfocito T.....	24
Figura 8. Estructura de los receptores tipo KIR y señales de activación e inhibición.....	27
Figura 9. IL-10, su receptor y células del sistema inmunitario relacionadas.....	28
Figura 10. Estructura de las moléculas HLA clase I y II.....	33
Figura 11. Esquema de tratamiento SEHOP-PETHEMA.....	40
Figura 12. Metabolismo de la Mercaptopurina.....	44
Figura 13. Metabolismo intracelular del metotrexato.....	46
Figura 14. Edad del grupo de estudio.....	73
Figura 15. Diagnóstico principal.....	73
Figura 16. Número de episodios de hepatotoxicidad por caso.....	74
Figura 17. Fase del tratamiento en los episodios de hepatotoxicidad.....	74
Figura 18. Fármacos implicados en los casos de hepatotoxicidad.....	75
Figura 19. Síntomas acompañantes de los episodios de hepatotoxicidad.....	75
Figura 20. Valores de AST.....	76
Figura 21. Valores de ALT.....	76
Figura 22. Valores de FA.....	77
Figura 23. Valores de bilirrubina total.....	77
Figura 24. Tipo de daño hepático.....	78
Figura 25. Tiempo en días de detección de DILI.....	78
Figura 26. Atribución de causalidad según escala CIOMS.....	79
Figura 27. Consecuencias de los episodios de DILI en el tratamiento.....	81
Figura 28. Distribución de los HLA-A en el total de la muestra.....	83
Figura 29. Distribucion de los HLA-B en el total de la muestra.....	83
Figura 30. Distribución de los HLA-C en el total de la muestra.....	84
Figura 31. Distribución de los HLA-DRB en el total de la muestra.....	84

Figura 32. Distribución de los HLA-DQA en el total de la muestra.....	85
Figura 33. Distribución de los HLA-DQB en el total de la muestra.....	85
Figura 34. Distribución de los HLA-DPA en el total de la muestra.....	86
Figura 35. Distribución de los HLA-DPB en el total de la muestra.....	86
Figura 36. Genotipo KIR en el total de la muestra.....	89
Figura 37. Genotipos KIR encontrados en los casos y en los controles.....	90

1. RESUMEN

1. RESUMEN

La lesión hepática inducida por fármacos debida a quimioterapia es una causa importante de morbilidad en enfermos oncológicos aunque sus manifestaciones clínicas son poco conocidas. Por otro lado, se conoce que niños con el mismo tumor e igual tratamiento tienen toxicidades diferentes, lo que hace pensar en la posibilidad de que existan factores genéticos individuales que influyan en la aparición de efectos secundarios como la hepatotoxicidad. El objetivo de este estudio es determinar las características (formas de presentación, gravedad y tipo de lesión) de la hepatotoxicidad por quimioterapia en niños tratados por cáncer, así como estudiar la posible influencia de los factores inmunogenéticos (HLA, polimorfismos de citoquinas y genotipo KIR) en la lesión hepática inducida por citostáticos en esta población.

Pacientes y método: Se incluyó en el estudio a un total de 22 enfermos oncológico en los que, tras descartar otras causas de aumento de transaminasas (infecciosa, metabólica, autoinmune o hereditaria), se concluye, según la escala de causalidad CIOMS, que se trata de un episodio posible, probable o definido de lesión hepática por fármacos.

Resultados: Todos los niños tuvieron más de un episodio de hepatotoxicidad, en total se analizan 98 episodios. Mercaptopurina y metotrexato fueron los fármacos implicado con mayor frecuencia. El patrón histológico de daño predominante fue hepatocelular. Solo 2 episodios fueron clasificados de graves. Con respecto a la influencia de los factores inmunogenéticos en la aparición de hepatotoxocidad, en el análisis de los polimorfismos KIR encontramos que el genotipo K2DS2 es cuatro veces más frecuente en el grupo de niños que presentan hepatotoxicidad, por lo que podría tratarse de un factor de riesgo para padecer DILI. Además, el genotipo K2DS2 ligado a su ligando C1 parece favorecer la aparición de hepatotoxicidad.

Conclusiones: La hepatotoxicidad idiosincrásica por quimioterapia es frecuente, la tendencia es a la recidiva con la reexposición y, aunque no suele ser grave supone retrasos en los tratamientos y reducción en las dosis recibidas de quimioterápicos. La elevada frecuencia hace aconsejable establecer algoritmos de seguridad estandarizados con controles estrictos de enzimas hepáticas durante los períodos de quimioterapia de alto riesgo. No hemos podido poner de manifiesto relación entre el HLA y los polimorfismos de la citoquinas con la aparición de hepatotoxicidad. El genotipo KIR podría ser factor factor de riesgo para la susceptibilidad a la hepatotoxicidad inducida por quimioterapia.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN:

Actualmente estamos asistiendo a un creciente interés de los pediatras, farmacólogos clínicos, agencias reguladoras e industria farmacéutica por conocer la seguridad, eficacia y calidad de los fármacos que van a ser usados en la infancia. Es llamativa la escasa información, con validez científica, sobre la que se sustentan actualmente muchas de las prescripciones. Precisamente los pediatras necesitan en su ejercicio diario asegurar una mínima toxicidad farmacológica y que al mismo tiempo el niño no se vea privado de los posibles beneficios de los medicamentos que pueda necesitar. Estudios recientes, que analizan las prescripciones realizadas en centros hospitalarios, ponen de manifiesto la magnitud del empleo de fármacos sin indicación en ficha técnica para su uso en pediatría (generalmente debido a la ausencia de alternativas terapéuticas registradas) o su empleo de una forma distinta a la contemplada en la licencia de comercialización: empleo de dosis diferentes a las recomendadas, en distintos grupos de edad, por vías diversas o para una indicación no aprobada, que llega a alcanzar cifras de un 90% en neonatos ingresados en unidades de cuidados intensivos (1). Este problema se acentúa en pacientes pediátricos oncológicos en los que los protocolos internacionales incluyen sistemáticamente medicamentos de uso pediátrico no autorizado (hasta en un 87% de los niños, según los estudios realizados) (2), añadiéndose la problemática de su administración, que no se realiza de acuerdo con una formulación y/o dosificación específicas. A esto se suma que los datos farmacocinéticos relativos a citostáticos en pacientes pediátricos son limitados o están confinados a unos pocos estudios. También se añade la rápida aparición de nuevos agentes antineoplásicos, cuyos mecanismos de acción, farmacodinamia, e interacciones son en ocasiones poco conocidos, lo que ha motivado un aumento de la preocupación por identificar su espectro de toxicidades. El vacío existente sobre datos de eficacia y seguridad de muchos fármacos en el niño, causa cierta preocupación acerca del proceso de registro de fármacos y el establecimiento de sus indicaciones en pediatría.

La incidencia de las reacciones adversas a medicamentos en pediatría se ha establecido recientemente en 15,1 reacciones por 1000 niños (3). Representan el 2% de las admisiones de un hospital pediátrico, similar a las del paciente adulto, y de ellas sólo un pequeño porcentaje (menos del 8%) cursan con afectación hepática, que puede ir desde un ligero aumento de las transaminasas hasta una hepatitis fulminante. Las referencias bibliográficas en la literatura con respecto a este problema de salud son aún escasas, aunque recientemente se ha descrito algunas series más extensas en población pediátrica en relación a hepatotoxicidad atribuida a distintos medicamentos (4, 5).

Dentro del grupo de niños oncológicos, la hepatotoxicidad inducida por el propio tratamiento es una complicación frecuente. Esta forma de toxicidad inducida suele aparecer de forma idiosincrásica, y establecer una causalidad puede llegar a ser muy complejo debido a varios factores: por un lado los pacientes suelen recibir tratamiento con combinaciones de quimioterápicos y fármacos de soporte potencialmente hepatotóxicos de forma simultánea; por otro los periodos de latencia entre la exposición y la alteración de la función hepática pueden ser extremadamente variables. Otras circunstancias, como la necesidad de transfusiones, las infecciones y la malnutrición pueden contribuir al daño hepático. También las referencias bibliográficas en este grupo

de pacientes son escasas, pese a ser esta toxicidad causa de morbilidad y origen de retrasos en la administración de tratamientos (6,7).

La toxicidad hepática puede presentarse con manifestaciones clínicas y patológicas que virtualmente evocan cada variedad de enfermedad hepática conocida, y cuya intensidad puede oscilar desde elevaciones asintomáticas de las enzimas hepáticas hasta insuficiencia hepática fulminante. La forma de presentación más común es un cuadro clínico que simula la hepatitis vírica aguda, con ictericia, náuseas, astenia y malestar o dolor abdominal. Dado que, a menudo, no se dispone de material histológico para etiquetar la lesión hepática, se ha propuesto una clasificación basada en la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) sérica y de la fosfatasa alcalina (FA) expresadas en múltiplos del límite superior de la normalidad y la relación entre ambas. Esta clasificación, aunque refleja de forma imperfecta algunos patrones específicos (ej. lesiones vasculares, crónicas, neoplasias, etc), exhibe una buena correlación, en general, con la lesión hepática subyacente y es excelente a efectos pronósticos (8).

En condiciones habituales de práctica clínica, el proceso de atribución de causalidad se sustenta en la sospecha de hepatotoxicidad junto con la pertinente exclusión de causas específicas, seguidos de la minuciosa búsqueda de exposición a tóxicos, una secuencia temporal compatible y el análisis del potencial hepatotóxico de los agentes identificados. La lista de fármacos capaces de producir hepatotoxicidad se incrementa constantemente y prácticamente cualquier fármaco en uso debe ser considerado responsable potencial. En ciertos casos la imputabilidad del medicamento es particularmente difícil debido a que hay un retraso considerable entre su interrupción y la aparición de la enfermedad hepática. El ejemplo típico es la amoxicilina –ácido clavulánico que puede originar hepatitis varias semanas tras la interrupción del ciclo terapéutico, pero dicha particularidad ha sido comunicada también con otros agentes, incluyendo citostáticos.

La disponibilidad de marcadores moleculares de toxicidad hepática aplicables a la práctica clínica parece aún lejana. Por ello, el diagnóstico de hepatotoxicidad continúa siendo un desafío para el clínico. Los avances futuros en materia de hepatotoxicidad idiosincrásica requerirán un mayor conocimiento de los factores genéticos y ambientales que hacen a un individuo único en su respuesta anormal a un fármaco. Las investigaciones en las bases genéticas de la hepatotoxicidad idiosincrásica requerirán la identificación de un amplio número de sujetos afectados y el uso de DNA-tecas para la caracterización de polimorfismos en un único nucleótido, que diferencien a esta población de los sujetos expuestos que no desarrollan toxicidad. Con respecto a la población oncológica, estos estudios se han convertido en prioritarios, puesto que con el aumento global de la supervivencia (9) todos los esfuerzos se dirigen a la minimización de la toxicidad, y a la creación de tratamientos personalizados según el riesgo individual de toxicidad de cada paciente.

2.1. EL HÍGADO. GENERALIDADES Y CONCEPTOS

El hígado, órgano más voluminoso del cuerpo humano, desarrolla funciones esenciales en el organismo, entre las que destacan la producción de bilis, la síntesis proteica y la regulación de la glucosa plasmática. Pero la función fundamental es actuar como centro detoxificador para múltiples tóxicos, tanto producidos de forma endógena como exógenos. Es de hecho el primer órgano que se pone en contacto con los nutrientes y xenobióticos absorbidos por vía enteral a través de la vena porta, mientras que por la arteria hepática le llegan otros productos del metabolismo y las sustancias que penetran en el organismo por una vía distinta a la enteral (10).

2.1.1 REACCIONES DE BIOTRANSFORMACIÓN HEPÁTICAS:

La función de biotransformación de fármacos y toxinas que precisan ser metabolizadas por el huésped, tanto para conseguir su efecto farmacológico como para su posterior eliminación, tiene lugar en 3 etapas:

- **Reacciones de fase I:**

El sustrato se transforma mediante oxidación, reducción o hidrólisis por la acción de la super familia de enzimas que componen el citocromo P450 (CYP). Estas enzimas, compuestas por una apoproteína y un grupo hemo, se encuentran en la membrana citoplasmática, mitocondrial y del retículo endoplasmático del hepatocito (11, 12). La reacción más común catalizada por el CYP es una mono-oxigenación del sustrato: previa transferencia de electrones de NADPH, el grupo Hem se une a un átomo de oxígeno, que posteriormente transfiere a la molécula metabolizada en forma de grupo hidroxilo. El resultado de las reacciones en esta fase es la generación de un grupo hidroxilo, que permite posteriormente a la sustancia en cuestión participar en la reacciones de Fase II (10, 11). Cada enzima está codificada por un gen que recibe la misma denominación, escrita en cursiva. Se conocen más de 300 componentes de esta superfamilia de genes. En el ser humano se han relacionado con el metabolismo de las drogas y hormonas, principalmente, las familias CYP 1, 2 y 3.

- **Reacciones de fase II:**

Completan el metabolismo de aquellas sustancias que tras la fase 1 no son lo suficientemente hidrófilas, mediante conjugación con un grupo polar hidrosoluble como el ácido glucurónico, sulfato, acetato, glicina, glutatión o grupo metilo (12). Estas reacciones son catalizadas por transferasas o conjugasas. Como consecuencia se produce un descenso en la actividad farmacológica y un aumento en la excreción. Dos de las familias más importantes de enzimas de fase II son: La glutatión S-transferasa (GST) y la N-acetiltransferasa-acetilCoA (NAT) (13). Las modificaciones en esta fase pueden ser las únicas requeridas en el metabolismo de algunas sustancias, pero la mayoría precisan que las reacciones de fase 2 estén precedidas o seguidas por la oxidación de fase 1. Compuestos que precisan glucuronidación son por ejemplo: APAP, Doxorubicina y Ciclofosfamida (11,12).

- **Reacciones de fase III:**

Dependientes de la acción de distintas familias de proteínas transportadoras (14):

- Proteínas de la *membrana basolateral* (sinusoidal): determinan la cantidad de fármaco y/o metabolitos que llegan a la membrana canalicular. Están representadas por la superfamilia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) (15) que facilitan el transporte de sales biliares conjugadas, esteroides, glucurónidos y cationes orgánicos. Numerosos citostáticos como metotrexato o irinotecán, además de otros fármacos, son sustratos de estos transportadores (16).

- Transportadores de la *membrana apical o canalicular*: responsables del aclaramiento hepático de los fármacos, así como de la secreción de sales biliares y otros constituyentes de la bilis (17). Son proteínas dependientes de ATP, denominadas ABC transportadoras o ATP-binding-cassette. Las más importantes son (18, 19):

- MDR1 (ABCB1 ó Glucoproteína-P1): proteína más estudiada, se expresa en la superficie luminal de los enterocitos, en la membrana canalicular de los hepatocitos y en la membrana apical luminal de las células epiteliales ductales del páncreas y renales tubulares, y es responsable de la excreción biliar de fármacos bipolares catiónicos.
- MRP2 (ABCC2): proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos.
- BSEP (ABCB11, bile salt export pump): bomba de expulsión de sales biliares.

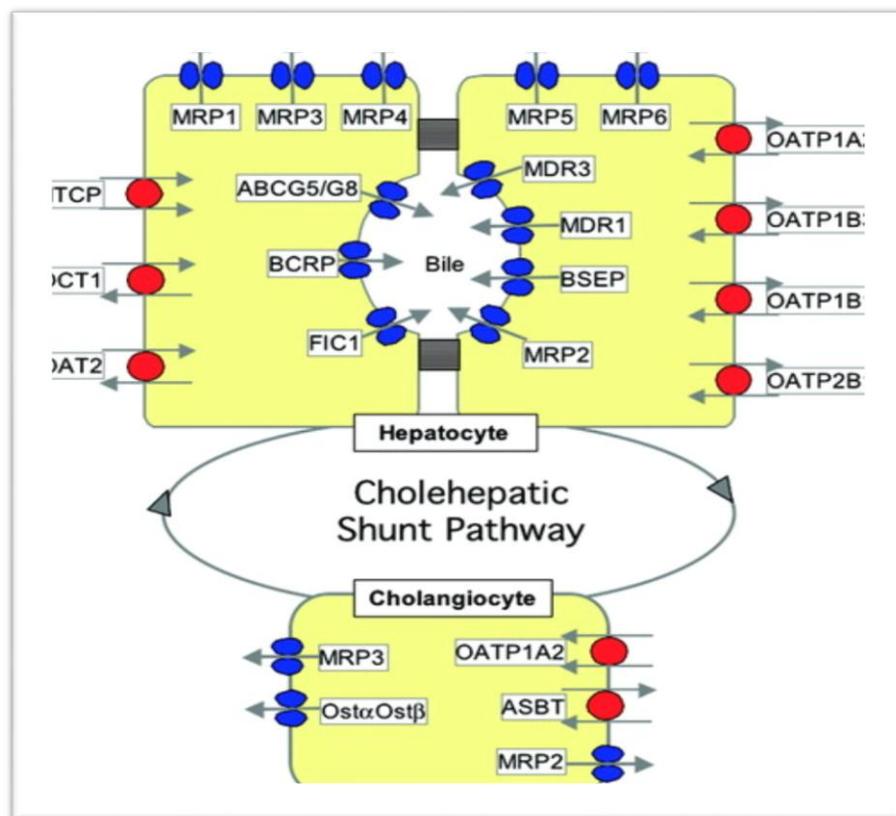


Figura 1. Transportadores de sales biliares en hígado humano y colangiocitos. Tomado de Pauli Pauli-Magnus C, *Hepatology* 2006 (18)

2.1.2. HEPATOTOXICIDAD.

La OMS denomina *Droga* a “cualquier sustancia o producto que es usado con la intención de modificar o explorar el funcionamiento fisiológico o cambiar el estado patológico del receptor”. Se incluyen en esta definición todos los fármacos existentes y los remedios naturales. *Reacción adversa a drogas* (RAF) se considera a toda reacción detectada, peligrosa o no placentera, que resulta de una intervención relacionada con el uso de productos medicinales; estas reacciones predicen riesgos para una administración futura y hacen necesaria su prevención o un tratamiento específico, una alteración de la dosis e incluso la retirada definitiva del producto (20).

El hígado tiene como función principal la desintoxicación. No es por tanto de extrañar que, al jugar un papel clave en el proceso de metabolización de los fármacos, sea con frecuencia un órgano diana de las posibles reacciones adversas que estos pueden causar (12). Se considera como *reacción adversa hepatotóxica* toda lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos, a las dosis habitualmente empleadas para el tratamiento profiláctico o terapéutico. La hepatotoxicidad, así definida, tiene especial transcendencia por su potencial gravedad, constituyendo una de las causas más frecuentes de retirada de medicamentos en Europa y Estados Unidos (21).

2.1.2.1 Tipos de hepatotoxicidad

La reacción hepatotóxica por fármacos puede ser de tipo intrínseco o predecible (por ejemplo el paracetamol a dosis supratrapéuticas) o idiosincrática o inesperada (22, 23). Sin embargo no siempre es fácil distinguir y separar estos dos conceptos. Las características de ambos tipos de hepatotoxicidad son:

- **Hepatotoxicidad Intrínseca:**

Las drogas con hepatotoxicidad intrínseca producen lesión hepática de forma previsible, dependiente de la dosis. Salvo el paracetamol o acetil para aminofenol (APAP), hay pocas sustancias de uso habitual con estas características. La administración de 4 gr/día de APAP, dosis máxima recomendada, produce una elevación de la alanino aminotransferasa (ALT) tres veces mayor del nivel superior de la normalidad (LSN) en el 44 % de voluntarios sanos (24, 25). Sin embargo a dosis bajas se ha demostrado seguro y no relacionado con daño hepático clínicamente relevante.

- **Hepatotoxicidad Idiosincrática o inesperada** (26):

Este tipo de reacciones son impredecibles, específicas de especie y no existe relación constante entre la dosis, vía de administración o duración del tratamiento y la aparición o severidad de la reacción. Se distinguen dos tipos de mecanismos para estas reacciones (6):

a) Idiosincrasia metabólica:

Está condicionada por un metabolismo alterado del fármaco, que puede provocar la ausencia de metabolización de un precursor determinado o bien la génesis de una mayor cantidad de metabolitos tóxicos en el paciente frente a otros individuos. El daño se debe a la acción directa del fármaco o de su metabolito tóxico sobre la diana hepatocitaria (27). El periodo de latencia varía de semanas a meses, y la recurrencia tras la reexposición puede variar de días a semanas tras la misma. Los signos de hipersensibilidad están ausentes.

b) Idiosincrasia inmunoalérgica:

Se debe a una respuesta inmune contra el hepatocito. Se postula que el fármaco es transformado mediante los citocromos, oxidasas, peroxidasas y sintetasas en un metabolito reactivo, el cual se une bien a la enzima que lo generó o bien a otra proteína plasmática formando un neoantígeno que actúa como diana a la respuesta inmune. Dicha respuesta se caracteriza por la producción de anticuerpos que reconocen bien a la proteína nativa, a la modificada o a otras proteínas celulares. El periodo de latencia entre el consumo del fármaco y la aparición de los síntomas va de una a cinco semanas aproximadamente, y la recurrencia tras la reexposición al fármaco es precoz. Entre los signos clínicos de hipersensibilidad están el rash, eosinofilia, fiebre, artritis, artralgias, adenopatía y leucocitosis. Son fármacos ejemplo de este tipo de toxicidad el diclofenaco, α -metildopa, hidralacina, nitrofurantoina, estatinas o agentes anti-TNF- α (28).

La mayoría de las veces no existe una clara distinción entre un mecanismo metabólico y una reacción de hipersensibilidad ya que ambos suelen estar implicados al mismo tiempo aunque con variable intensidad (29).

2.1.2.2 Mecanismos fisiopatológicos

Tanto los medicamentos como los remedios naturales son capaces de producir efecto tóxico en cada una de las etapas de su metabolismo. Sus efectos patológicos posibles son muy diversos, descartados aquellos con efecto tóxico directo responsables de hepatotoxicidad directa y por tanto de uso muy restringido en la práctica clínica. A continuación se repasan los mecanismos etiopatogénicos propuestos para explicar los distintos tipos de alteración hepática como: colestasis, citolisis hepática debida a mediadores inflamatorios o por toxicidad mitocondrial y mecanismos inmunológicos.

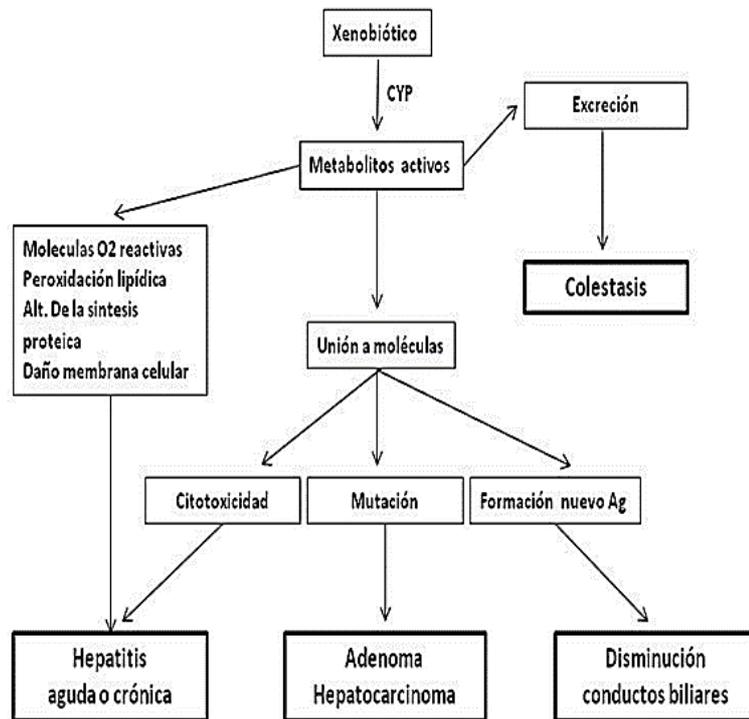


Figura 2: Mecanismos de hepatotoxicidad. Adaptado de Piñeiro-Carreiro et al (13)

2.1.2.2.1 Colestasis:

La colestasis inducida por fármacos se caracteriza por la alteración del flujo biliar y la retención de ácidos biliares con efecto citotóxico, responsables de daño hepático agudo y crónico, con resultado final de fibrosis biliar y cirrosis (19). En algunos casos resulta de la inhibición del transporte de la bilirrubina o sales biliares sin datos de inflamación o necrosis, en cuyo caso se denomina colestasis simple. Lo más frecuente es que la colestasis se asocie a lesión más o menos extensa de colangiocitos, provocada por la excreción en la bilis de metabolitos tóxicos resultantes de la biotransformación hepática (30.) Sin embargo la lesión idiosincrática de tipo colestático se ha relacionado con mecanismos inmunoalérgicos, causantes del daño en el epitelio biliar y asociados a síntomas de alergia como eosinofilia o rash (31). Los síntomas asociados a colestasis son: ictericia, prurito y elevación de FA. El aumento de FA consume grupos fosfato con la consiguiente disminución de la concentración de ATP. Una disminución prolongada de ATP en los colangiocitos puede producir una ductopenia progresiva, que aparecen el 1% de los pacientes con DILI con colestasis.

La mayoría de las drogas que causan colestasis son sustrato de los transportadores de la membrana apical o canalicular del hepatocito (ATP binding cassette) (19). Pertenecen a este grupo de transportadores las proteínas asociadas a resistencia múltiple a drogas 2 y 3 (ABCC2 y ABCB4) que tienen un papel importante en la excreción ductal de varias sustancias (figura 1). Variaciones en los genes que codifican estas proteínas transportadoras dan lugar

a un transporte alterado de determinadas drogas, pudiendo ser responsables de la susceptibilidad de algunos individuos a sufrir daño hepático progresivo relacionado con el uso frecuente de estas sustancias (32). Estudios realizados en pacientes con colestasis inducida por fármacos y DILI han identificado cuatro mutaciones diferentes en genes codificantes de la familia de transportadores (32, 33). Estos datos sugieren que la presencia de determinados polimorfismos en los péptidos transportadores puede tener efectos farmacodinámicos en las sustancias que son sustratos de ellos y favorecer la aparición de DILI de tipo colestático, tras la exposición a dichas sustancias.

2.1.2.2.2 Apoptosis inducida por ácido biliar:

La retención de los componentes de la bilis dentro del hepatocito durante la colestasis está asociada con apoptosis celular (34), que puede tener lugar por dos vías: activación del receptor de muerte celular FAS (35) o por alteración mitocondrial que se comentará posteriormente. Entre los complejos y multifactoriales mecanismos de apoptosis hepatocítica relacionada con colestasis, es conocida la especial hepatotoxicidad de los ácidos biliares hidrofóbicos, como los ácidos glico-quetodesoxicólico (GDC) y desoxicólico, y como estos se acumulan en el hígado en enfermedades hepáticas colestáticas. La hepatotoxicidad intrínseca de moléculas hidrofóbicas es evidente en los niños que tienen una mutación en la bomba exportadora de sales biliares de la membrana canalicular. La incapacidad para secretar ácidos biliares en la bilis provoca, en estos pacientes, lesión hepática, cirrosis y muerte por insuficiencia hepática (36).

2.1.2.2.3 Daño hepático inducido por neutrófilos y macrófagos:

En algunos eventos fisiopatológicos, como sepsis, trauma tisular, etc, se produce inflamación con reclutamiento de macrófagos y neutrófilos en los sinusoides hepáticos (37). La función principal de los neutrófilos y macrófagos es la de destruir los microorganismos invasores, así como fagocitar las células muertas y restos celulares, sin embargo la liberación de mediadores tóxicos puede agravar la lesión hepática inicial. La toxicidad por fármacos es capaz de activar los neutrófilos y células de Kupffer, ya sea de forma directa o mediante la activación del complemento. Las células de Kupffer liberan mediadores citotóxicos como sustancias reactivas del oxígeno (ROS) y proinflamatorios como citocinas y quimiocinas (38). El factor C5a y algunas citoquinas preparan y activan los neutrófilos para su reclutamiento a nivel vascular intrahepático. Si son estimulados quimiotácticamente, los neutrófilos se extravasan y adhieren a los hepatocitos e inducen muerte celular necrótica mediante la liberación de ROS y proteasas. Las moléculas de adhesión de neutrófilos (integrinas β_2 , especialmente CD11b/CD18) y ICAM-1 en las células endoteliales y hepatocitos son esenciales para la migración de los neutrófilos desde el sinusoides, su extravasación y para la producción de ROS. Las citoquinas pueden inducir la formación de moléculas de adhesión hepática y quimioquinas, que a su vez están también moduladas por el estrés oxidativo.

2.1.2.2.4 Toxicidad mitocondrial

Los mecanismos más conocidos de toxicidad mitocondrial son: la depleción de DNA mitocondrial, la inhibición de la β -oxidación de ácidos grasos y la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial (39)

La mitocondria es la principal fuente de producción de energía en forma de ATP mediante fosforilación oxidativa. La cadena respiratoria mitocondrial produce también el anión superóxido (O_2^-), un radical libre altamente reactivo y citotóxico formado por la reducción parcial del oxígeno. La eliminación de este radical es efectuada por la enzima mitocondrial superóxido dismutasa (SOD), codificada por el gen SOD2, y contribuye a reducir el estrés oxidativo transformando el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y O_2 . La catalasa y glutatión peroxidasa 1 (GPX1) forman parte del sistema antioxidante de defensa celular y catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno a agua (40). Si los mecanismos de defensa antioxidante se ven comprometidos o se produce un incremento en el estrés oxidativo mitocondrial, ésta se constituye en un regulador crítico de la muerte celular mediante la oxidación de grupos sulfidrilos proteicos o la activación de vías de señalización mitocondrial de muerte celular. La disfunción mitocondrial y el daño oxidativo se encuentran íntimamente involucrados en la patogénesis de DILI, como se manifiesta mediante estudios recientes que demuestran que determinados polimorfismos (rs4880) de la SOD condicionan la aparición de hepatotoxicidad ligada a la administración de asparaginasa en adultos con leucemia linfoblástica aguda (41).

La mitocondria tiene también un importante papel en la muerte programada celular hepática o apoptosis celular. La apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM), permite la liberación de citocromo C que a su vez puede activar a otros factores pro-apoptóticos (42, 43). Este mismo mecanismo puede causar muerte celular directa, dependiendo del número de mitocondrias afectadas. Si la apertura del poro transicional ocurre en la totalidad, o la mayoría, de las mitocondrias del hepatocito, se produce una depleción de ATP suficiente para causar muerte celular; en cambio, si solo son algunas mitocondrias las afectadas, las restantes conservan su capacidad para producir energía y así evitar la muerte celular aguda, aunque las afectadas desencadenen el mecanismo de apoptosis descrito anteriormente.

2.1.2.2.5 Mecanismos inmunológicos:

En la etiopatogénesis de DILI influyen alteraciones tanto a nivel del sistema inmune innato como adaptativo.

2.1.2.2.5.1 Sistema Inmune Innato:

El sistema inmune innato es un modulador esencial tanto en la extensión como en la intensidad del daño hepático una vez iniciado (27). El estrés celular origina señales que estimulan en el organismo la participación de células del sistema inmune innato, especialmente células de Kupffer y Natural killer (NK). Se

activan simultánea de 2 cascadas: una proinflamatoria, con la producción de citoquinas como TNF (Factor de Necrosis Tumoral), INF γ , FasL (Fas ligando), y otra antiinflamatoria motivada por ciertas prostaglandinas que juegan un papel hepatoprotector. Del balance en la producción de estos mediadores dependerá que la lesión inflamatoria inicial se resuelva (“adaptación”) o bien progrese a un daño hepático manifiesto. Si la producción de citoquinas antiinflamatorias es baja, el umbral para la aparición de daño hepático disminuye, y a la inversa (44). Estos hallazgos indican la importancia que podría tener la existencia de variantes alélicas defectivas de determinadas citoquinas inmunorreguladoras en la susceptibilidad a presentar DILI, probablemente como consecuencia de la incapacidad de adaptarse una vez iniciada la cascada de eventos que conducen a la lesión hepática.

2.2.2.5.2 Sistema inmune adaptativo:

- Hipótesis del hapteno (19):

Los fármacos, habitualmente con tamaño insuficiente para actuar como antígenos, se comportan como haptenos que al unirse a proteínas hepáticas, como los enzimas del sistema CYP, forman aductos Xe-CYP con capacidad para desencadenar una respuesta del sistema inmunológico. Estos aductos pueden ser fagocitados por los macrófagos (APC) que posteriormente presentan la molécula externa, o fragmentos de esta, a las células T helper mediante las moléculas de clase II del complejo mayor de compatibilidad. Dependiendo del genotipo HLA del huésped se puede producir una activación intensa de células T que condiciona un daño del hepatocito (figura 3), o la no activación del sistema adaptivo inmune que permite una adecuada tolerancia al fármaco.

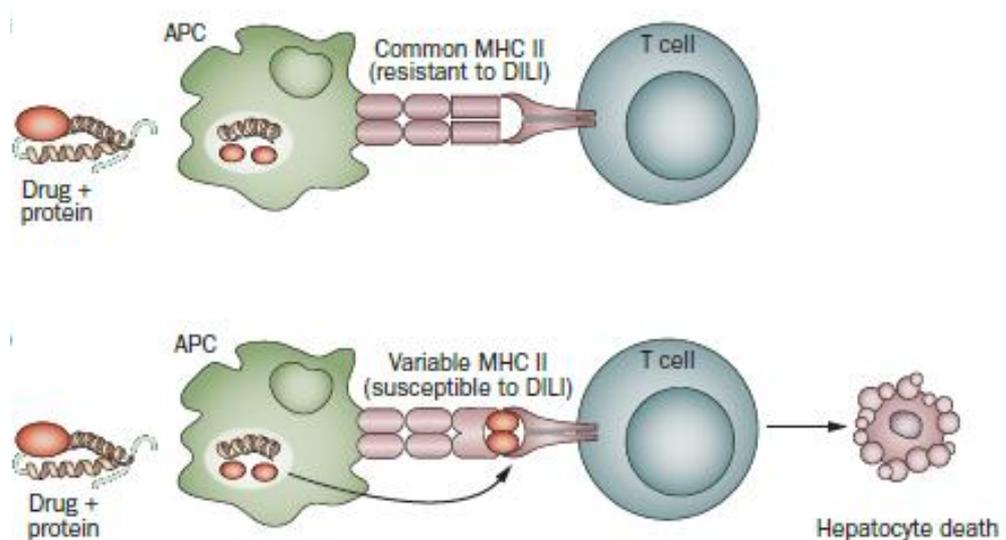


Figura 3: Papel de la respuesta inmune del huésped en la patogénesis de DILI. Tomado de Tujios S, Fontana RJ. *Gastroenterology and Hepatology* 2011 (19)

La haptización aislada de una proteína podría ser insuficiente para desencadenar una respuesta inmune, siendo necesaria la coexistencia de una infección o proceso inflamatorio hepático concomitante. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes no es posible demostrar una situación de base predisponente, ni muchos pacientes con tratamientos prolongados, durante los que presentan infecciones intercurrentes y diversas condiciones que cambian su situación inmune, desarrollan DILI. Son necesarios más estudios que incluyan los conocimientos existentes sobre todas las circunstancias metabólicas, expresión del genoma y del microbioma humano, para obtener más información (45).

- Variaciones genéticas de la inmunidad del huésped:

La asociación entre DILI y determinados genotipos HLA se ha establecido para varias sustancias por mecanismos diferentes a los descritos en el apartado anterior, y aunque aún se desconocen los mecanismos subyacentes. Teniendo en cuenta los datos conocidos hasta el momento, todo parece indicar que las variaciones genéticas en la inmunidad del huésped pueden jugar un papel crítico en la patogénesis de DILI (18). En distintos estudios se ha podido determinar relación entre alelos HLA clase II y lesión hepática tipo colestásica o mixta (46): el alelo HLA-DRB1*1501 se relaciona con una mayor susceptibilidad a DILI de tipo colestático causada por amoxicilina-clavulánico (46, 47), y portadores HLAB*5701 tienen 80 veces más riesgo de DILI asociado al uso de flucloxacilina (48).

Uno de los objetivos de este trabajo es hallar asociaciones entre polimorfismos HLA y mayor riesgo de DILI asociado a quimioterápicos, por lo que este tema se desarrollará de forma más detallada posteriormente.

- Autoimmune like DILI:

Algunas moléculas como metildopa, nitrofurantoina y minociclina, pueden causar una lesión hepática de tipo autoinmune, dando lugar a una forma de DILI indistinguible de una hepatitis autoinmune espontánea, pudiéndose hallar infiltración de células plasmáticas, aumento de inmugobulinas y presencia de autoanticuerpos ANA y ASMA (49).

2.1.2.3 Clasificación clínica:

Las manifestaciones clínicas asociadas a DILI no son específicas. No hay un patrón clínico, ni histopatológico o analítico, que nos ayude para establecer el diagnóstico etiológico, siendo los síntomas clínicos que a menudo presenta el paciente con DILI inespecíficos y similares a los que aparecen en las enfermedades hepáticas por otras etiologías: malestar general, anorexia, náuseas y vómitos. La forma más frecuente de presentación es similar a una hepatitis aguda, icterica o anictérica (50). En algunas ocasiones el paciente puede presentar síntomas de hipersensibilidad como rash cutáneo, fiebre y eosinofilia, aunque esta forma de presentación es poco frecuente y habitualmente asociada a DILI de tipo colestático (13, 27). El curso clínico es variable

pudiendo producir desde elevaciones sub-clínicas transitorias de transaminasas a enfermedad hepática crónica o fallo hepático fulminante.

El patrón anatómo-patológico es variable e inespecífico, por lo que la biopsia hepática no es estrictamente necesaria para poder establecer el diagnóstico de DILI, reservándose para aquellos casos de mala evolución o con etiología no aclarada, en los que es preciso excluir otras enfermedades y llegar a un diagnóstico específico (51)

Dada la diversidad de términos que existía hasta el momento para definir las reacciones adversas a fármacos, con la consiguiente imposibilidad de comparar los datos de los distintos registros de farmacovigilancia y farmaindustria, en 1986 se constituyó The Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) (52-54) un grupo de trabajo formado por expertos que en 1989 publicó el consenso alcanzado para denominar las lesiones hepáticas provocadas por fármacos y los criterios diagnósticos necesarios para cada tipo de lesión. Este comité decidió basar el diagnóstico de lesión hepática en una serie reducida de valores bioquímicos, disponibles en la mayoría de los centros, concluyendo que el diagnóstico de lesión hepatotóxica debe establecerse si se produce una de las siguientes condiciones (54,55):

- Aumento de ALT superior a dos veces el límites superior de la normalidad (>2xLSN)
- Aumento > 2xLSN de la bilirrubina directa
- Elevación, de forma simultánea, de la aspartato aminotransferasa (AST), FA y bilirrubina total (BT), siempre que en alguno de ellos el valor sea superior a 2x LSN.

De forma consensuada se decidió también que incrementos aislados de AST, FA o BT, aun alcanzando valores superiores a 2N o incrementos de ALT entre N y 2N, deben ser considerados solo como hallazgos analíticos anormales y no necesariamente indicadores de lesión hepática.

Desde ese momento los tipos clínicos de DILI quedaron definidos en tres: Lesión hepatocelular, colestática o mixta, si cumplían los criterios que se recogen en la tabla 1. La proporción entre el valor de ALT y el de FA, expresado como **R** es un indicador útil para distinguir los distintos tipos de lesión.

TIPO DE LESION	CRITERIOS
Lesión hepatocelular	ALT > 2 x LSN ó R* ≥ 5
Lesión colestática	↑ FA > 2 x LSN ó R* ≤ 2
Lesión mixta	↑ ALT > 2 x LSN y ↑FA y 2 < R* < 5

Tabla 1: Tipo de lesión hepática. R* = ALT/FA

En 2011 un Grupo de Trabajo Internacional de Expertos constituido por clínicos y científicos, realizaron una revisión de los criterios diagnósticos de DILI, estableciendo el valor de ALT en >5 veces el LSN para el diagnóstico de esta patología (51). En el trabajo publicado por Molleston et al. en el mismo año (DILI Prospective Study) (56) se establece el mismo umbral para el diagnóstico de DILI en pediatría: > 5 veces el LSN de ALT o AST o > 5 veces el LSN del valor basal previo a la droga. Sin embargo, en una revisión posterior de una serie de casos, realizada por Mansi et al. (2015) se establece un nivel > de 3 veces el LSN para el diagnóstico en niños (57). Esto muestra la necesidad aún de unificar criterios a nivel internacional para la población pediátrica.

Desde el punto de vista evolutivo, CIOMS definió como lesión hepática aguda aquella en la que las alteraciones analíticas tienen una duración inferior a 3 meses y lesión crónica si duran más de 3 meses. Estos conceptos se han revisado posteriormente, sobre todo en los casos de colestasis en los que la recuperación es más lenta. La propuesta del DILI working group, publicada en 2011, establece como lesión hepática aguda la de duración inferior a 3 meses en los casos de lesión hepatocelular o mixta y 6 meses en las formas colestáticas. Si las alteraciones hepáticas duran más de lo referido, se usa el término de lesión persistente y cuando superan el año se denomina lesión hepatotóxica crónica (51).

Otras definiciones estandarizadas y consensuadas por CIOMS incluyen:

- Lesión hepática grave: Si hay, en orden ascendente de gravedad, ictericia, actividad de protrombina <50 % y encefalopatía hepática.

- Lesión hepática fulminante: Si aparecen de forma rápida, días o pocas semanas, signos encefalopatía y alteraciones graves de coagulación.

En ausencia de datos histológicos se deben de evitar los términos hepatitis, necrosis hepática, enfermedad crónica hepática y cirrosis (56, 58).

2.1.2.4 Factores de riesgo relacionados con la hepatotoxicidad.

La lesión hepática asociada a fármacos se considera una enfermedad compleja, multifactorial, en la que la susceptibilidad del individuo a padecerla depende de la combinación de factores ambientales, las propiedades del fármaco y las características genéticas o adquiridas del individuo (59).

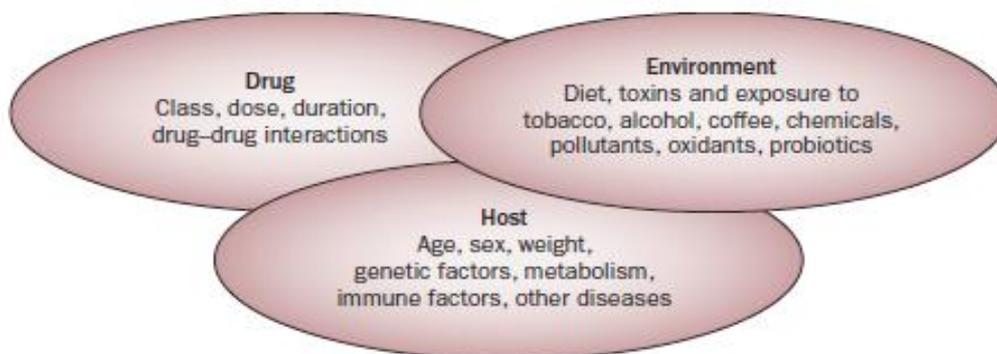


Figura 4. Factores de riesgo potenciales involucrados en la patogénesis de DILI. Tomado de Tujios S, Fontana RJ. *Gastroenterology and Hepatology* 2011 (19)

Los principales factores de riesgo detectados son los siguientes:

1. **Edad:** se ha descrito mayor riesgo de hepatotoxicidad a mayor edad, aunque en algunos estudios no ha podido ser demostrado (60,61). La disminución de la función renal, el menor volumen de distribución o alteraciones en el metabolismo oxidativo junto a una prescripción más frecuente, el uso concomitante de múltiples fármacos y los efectos indirectos de enfermedades intercurrentes podrían predisponer a la toxicidad (62). La toxicidad hepática de la isoniacida (63) se incrementa linealmente con la edad. Sin embargo el riesgo de hepatotoxicidad por ácido valproico es mayor en menores de 10 años (64). Esto supondría que la influencia de la edad es fármaco dependiente. El fenotipo tóxico también podría relacionarse con este factor, siendo la colestasis característica en mayores de 60 años (61).
2. **Sexo:** se ha comprobado que las mujeres tienen más riesgo para presentar hepatotoxicidad con ciertos fármacos, como el diclofenaco, tetraciclinas y nitrofurantoína, pero no para DILI en general (65, 66). Según el registro español, un 89% de los casos de hepatotoxicidad de evolución fulminante se dieron en mujeres, en las que también es más frecuente la lesión hepatocelular (67, 68).
3. **Enfermedad hepática previa:** no se ha asociado con un incremento del riesgo de DILI para la mayoría de los fármacos, constituyendo una excepción los pacientes con hepatopatía crónica que son tratados con metotrexate y los pacientes con hepatitis B y C crónica (69), especialmente si están coinfectados por VIH (70).
4. **Comorbilidad:** la diabetes puede influir en el riesgo de mortalidad y cronicidad de DILI, pero no aumenta la probabilidad de presentarla (71). También se ha relatado un mayor riesgo de DILI en pacientes con psoriasis tratados con metotrexate con respecto a los tratados con el mismo fármaco por artritis crónica (72), aunque este estudio podría estar limitado por factores de confusión.
5. **Interacción farmacológica:** teóricamente algunos fármacos y xenobióticos pueden modular el potencial hepatotóxico de otras drogas, bien por inducción o inhibición de su metabolismo a través del CYP 450, o por competición a nivel de los transportadores de membrana (73). Sin embargo la evidencia al respecto es aún insuficiente.
6. **Genética** (74, 75): los factores genéticos determinan la actividad de la metabolización de fármacos, la efectividad de los factores protectores del huésped y la regulación de la respuesta inmune. Los estudios genéticos han mostrado en adultos asociaciones significativas en casos de DILI:
 - Genética asociada al metabolismo de los tóxicos: Los distintos polimorfismos genéticos de los CYP u otras enzimas relacionadas con el sistema de detoxificación hepático, provocan una variabilidad individual en el metabolismo de los fármacos que puede conducir a la aparición de DILI por disminución o incremento de la actividad del enzima. En la

siguiente tabla se enumeran algunos los polimorfismos más conocidos hasta la actualidad y los fármacos con los que se relacionan (74).

Fármaco	Alelo HLA
Flucloxacilina	B*57:01
	A*02:01
Amoxicilina-Clavulánico	DRB1*15:01-DQB1*06:02
Lumiracoxib	DRB1*15:01-DQB1*06:02
Lapatinib	DRB1*07:01-DQA1*02:01
Ximegalatran	DRB1*07:01-DQA1*02:01
Ticlopidina	A*33:03
Terbinafina	A*33:01
Fenofibrate	A*33:01
Ticlopidina	A*33:01

Tabla 2: Polimorfismos enzimáticos y hepatotoxicidad. Adaptada de Larrey et al, (74).

- Otros determinantes genéticos: Los GWAS (Genome-wide association study) realizados sobre grupos de pacientes con DILI inducida por un fármaco específico (amoxicilina-clavulanico (76), ximegalatran, lapatinib (77) o lumiracoxib (78)) han identificado determinados polimorfismos de HLA I y II asociados significativamente (79). Se muestran en la tabla siguiente:

Polimorfismo enzimático	Fármaco
- Deficiencia en CYP2D6	• Perhexilina
- Deficiencia en CYP2C19	• Tetrabramato
- Deficiencia en NAT2	• Sulfamidas, dihidralacina
- Deficiencia en sulfoxidación	• Clorpromacina
- Deficiencia en glutation sintetasa	• Acetaminophen
- Deficiencia en GSTasab tipo T	• ¿Tacrina?
- Deficiencia en detoxificación de metabolitos reactivos.	• Halotano, fenitoína, amineptino, sulfamidas, carbamacepina

Tabla 3: HLA I y II asociados con la hepatotoxicidad. Adaptada de Ortega-Alonso 2016 (80)

También se ha descrito la implicación de determinados polimorfismos de citoquinas, como la IL-10 (IL-10-627, IL10-1082G/A, bajo productor de IL-10) (81, 82) y de

los receptores asociados a antígenos de las células NK (KIR) en el desarrollo de DILI. Se postula que podrían provocar una mayor extensión e intensidad de las lesiones una vez desencadenadas, lo que se conoce como “Hipótesis de la señal de peligro” (82), iniciándose una respuesta inflamatoria que no se ve frenada por alteraciones a este nivel. Tanto la asociación con los polimorfismos de HLA como IL-10 y KIR se desarrollaran más extensamente con la descripción de la respuesta inmune.

2.1.2.5 Diagnóstico. Escalas clínicas de causalidad.

Establecido el diagnóstico de lesión hepática, es fundamental conocer la etiología. La amplia variedad de agentes capaces de producir un cuadro clínico indiferenciable de DILI dificulta el diagnóstico y, en muchas ocasiones, nos lleva a establecer una etiología errónea. Sólo con un adecuado nivel de sospecha, y la realización de una historia clínica detallada en la que consten todos los preparados, farmacológicos o naturales, así como los datos de posible exposición a tóxicos ambientales y su relación temporal con el cuadro clínico del paciente, podremos establecer un diagnóstico cierto de DILI (11, 13)

El diagnóstico de DILI debe ser realizado mediante la aplicación de *escalas clínicas* que de forma objetiva permitan establecer la causalidad o no del fármaco sospechoso. Para ello se realiza un estudio secuencial desde la sospecha clínica inicial, recogiendo en la anamnesis todos los antecedentes de ingesta de posibles hepatotóxicos y su relación temporal con la enfermedad. Es fundamental descartar cualquier enfermedad capaz de producir alteraciones hepáticas, como infecciones por virus hepatotropos (VHB, VHA, VHC, CMV, VEB); enfermedades metabólicas como la enfermedad de Wilson, o el déficit de α -1 antitripsina; enfermedades autoinmunes, etc (anexo II).

Una de las escalas más utilizadas es la propuesta por CIOMS (53, 54) (anexo I) también denominada RUCAM (Roussel Uclaf Assessment Method). Dicha escala se basa en un sistema de puntuación estandarizado según diferentes criterios: cronológicos, evolutivos, factores de riesgo, fármacos concomitantes, exclusión de causas no farmacológicas, información previa de hepatotoxicidad del fármaco y reexposición. Finalmente el resultado se traslada a distintas categorías según la puntuación obtenida:

- Definida o altamente probable (> 8 puntos)
- Probable (6-8 puntos)
- Posible (3-5 puntos)
- Improbable (< 2 puntos)
- Excluida (< o igual 0 puntos).

En la práctica clínica se buscan escalas menos complejas, como la desarrollada y probada por María y Victorino (M&V) (83). Las distintas escalas han sido analizadas y comparadas sin definirse una evidente superioridad de ninguna de ellas. Se defiende la necesidad de desarrollar una escala informatizada con una base de datos que permita la incorporación de nuevos criterios de susceptibilidad (genética) y que pueda aplicarse clínicamente de forma sencilla, incluyendo a la población pediátrica (84).

2.1.2.6 Tratamiento.

Salvo en el caso de la intoxicación por paracetamol, en el que el tratamiento con N-acetil-cisteína contrarresta sus efectos lesivos, para el resto de tóxicos ingeridos de forma aguda o crónica no existe tratamiento específico. El tratamiento principal consiste en el cese, lo antes posible, de la administración del xenobiótico, por lo que el diagnóstico precoz es indispensable. El uso de corticoides no está indicado de forma generalizada, utilizándose solo en el caso de lesión hepática grave en el contexto de una reacción de hipersensibilidad multisistémica. El único tratamiento posible en casos de fracaso hepático grave es el trasplante hepático (13).

2.1.2.7 Sistemas de detección y registro.

No existe en la actualidad métodos sensibles para detectar la probabilidad de hepatotoxicidad idiosincrática en la fase de desarrollo de los medicamentos. Los ensayos clínicos realizados en un número limitado de pacientes sanos, sin factores de riesgo conocidos y durante un corto periodo de tiempo, no permiten prever lo que ocurrirá cuando el medicamento sea comercializado y administrado a la población general (85). La única forma de acercarnos al problema es mediante el análisis conjunto de los casos aparecidos en una población y en un tiempo determinado, con la ayuda de distintos tipos de registro, cada uno con ventajas e inconvenientes según sus características. Los más utilizados son:

- Programas de notificación espontánea:

Son sistemas “pasivos” en los que de forma voluntaria u obligatoria se declaran las sospechas de RAF. En España funciona desde 1983 el *Programa de Notificación Espontánea de Reacciones Adversas*, también denominado “tarjeta amarilla”, siendo el eje fundamental del Sistema Español de Farmacovigilancia (85). Los datos obtenidos por los centros nacionales de al menos 95 países, entre ellos España, se envían a VigiBase, la base de datos del Centro de Monitorización de Uppsala, dependiente de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que actualmente contiene los datos de más de 4 millones de RAF (86). Estos sistemas han permitido conocer nuevos riesgos y describir determinados síndromes asociados a fármacos, sin embargo está demostrado que las cifras registradas son muy inferiores a las reales, estimándose que la notificación no alcanza más del 10%, en el mejor de los casos, cuando se comparan con los datos obtenidos en los escasos estudios prospectivos existentes (87).

- Sistemas de registro intensivo de DILI:

Son sistemas diseñados para aumentar la capacidad de detección de RAF mediante la búsqueda activa, habitualmente en pacientes ingresados, y creando una red de profesionales motivados. Mediante este sistema se consiguen cifras de incidencia más elevadas, aunque no totalmente representativas de la población general. Ejemplos de este sistema de detección son:

1. SPANISH DILI REGISTRY (Grupo español para el estudio de las hepatopatías asociadas a medicamentos, <http://www.spanishdili.uma.es/index.php/es>): se creó en 1994 mediante una red multidisciplinar a la que se han ido incorporando progresivamente numerosas Unidades Clínicas de Hospitales de todo el territorio

nacional participando activamente en la identificación de casos y en la recolección de muestras de sangre de sujetos afectados (68, 84).

2. Proyecto PAIDOSHAM (Grupo español de trabajo sobre la hepatotoxicidad en la infancia, <http://www.paidosham.es>): constituye una red activa de especialistas motivados en la detección y comunicación de incidencias de hepatopatías tóxicas con la creación de un registro en la edad pediátrica activo desde 2008 (88-90).
3. DILIN (Drug-Induced-Liver Injury Network. EEUU): estudio observacional, prospectivo, puesto en marcha en 2003 con el objetivo de crear un registro de los episodios de DILI en niños y adultos y una base de muestras para posteriores estudios de esta patología. Se desarrolla por un acuerdo de cooperación entre el Instituto Nacional de Salud, nueve centros clínicos y un centro coordinador en EEUU (91).

- **Registros intensivos selectivos:**

Consisten en registros limitados al ámbito asistencial, generalmente hospitalario, en determinados grupos de pacientes o servicios diana, con riesgo elevado de hepatotoxicidad. Se establecen una o varias señales de alerta en los resultados analíticos realizados a los pacientes de los servicios diana, en los casos que se activan las alertas tanto los pacientes como sus historias son revisados de forma específica para valorar la presencia o no de DILI. Son válidos para mejorar y aumentar la detección de casos, pero solo en su ámbito asistencial y en los servicios clínicos diana (51).

2.2 SISTEMA INMUNE. INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA.

El sistema inmune se encarga de la defensa del organismo frente a agentes patógenos extraños a él. Existe una inmunidad innata, que supone la primera línea de defensa y responde de forma rápida e inespecífica, y una inmunidad adaptativa que desarrolla respuestas más versátiles. El *sistema inmune innato* está constituido por *factores solubles*: proteínas de fase aguda, citoquinas, quimiocinas y el complemento; y por *componentes celulares*: neutrófilos, monocitos/macrófagos y los linfocitos citolíticos naturales (NK, natural killer) (92). El *sistema inmune específico o adaptativo (adquirido)* está compuesto por los linfocitos T y B y sus moléculas efectoras. La siguiente tabla recoge las principales citoquinas y quimiocinas:

FACTOR	EFFECTOS BIOLÓGICOS	CÉLULA PRODUCTORA
IL-1	Proinflamatorias. Inducen síntesis de reactantes de fase aguda	Macrófagos
IL-2	Proliferación de linfocitos T. Activación y proliferación de NK. Proliferación de linfocitos B.	Linfocitos T
IL-3	Factor de crecimiento de mastocitos; factor estimulante de múltiples colonias.	Linfocitos T
IL-4	Factor de crecimiento de linfocitos T; potencia la síntesis de IgE; potencia la diferenciación de linfocitos B; crecimiento de mastocitos.	Linfocitos T
IL-5	Potencia la diferenciación de eosinófilos; potencia la síntesis de inmnglobulinas; potencia la síntesis de IgA	Linfocitos T
IL-6	Proinflamatorias. Inducen la síntesis de reactantes de fase aguda. Estimula secreción de Ig.	Linfocitos T, macrófagos, fibroblastos, endotelio
IL-7	Potencia el crecimiento de células pre-T.	Células estromales
IL-8	Proteína activadora de neutrófilos; factor quimiotáctico de linfocitos T y de neutrófilos.	Linfocitos T, macrófagos y epitelio
IL-9	Actúa con la IL-4 e induce la producción de IgE, crecimiento de mastocitos.	Linfocitos T
IL-10	Inhibidor de la síntesis de citoquinas; suprime la función de los macrófagos; potencia el crecimiento de linfocitos B; inhibe la producción de IL-12; suprime la inflamación en la superficie de la mucosa.	Linfocitos T y macrófagos
IL-12	Inductor de diferenciación Th 1. Estimula actividad citotóxica de LT y NK.	Monocitos y macrófagos.
IL-13	Potencia la síntesis de IgE; potencia el crecimiento de linfocitos B; inhibe la activación de los macrófagos; produce hiperreactividad de las vías respiratorias	Linfocitos T
IL-17	Induce la síntesis de IL-1 β y de IL-6, importante en las infecciones fúngicas.	Linfocitos T
IL-18	Estimula actividad citotóxica de LT y NK.	Macrófagos
IFN- γ	Activa a macrófagos. Aumenta la expresión de MHC 1 y 2. Incrementa la presentación antigénica	Linfocitos T
TGF- β	Inhibe proliferación de LT y LB. Promueve cambio de isotipo a Ig A. Inhibe a los macrófagos.	Linfocitos T, macrófagos y otros tipos celulares.
RANTES	Quimiocina para monocitos, linfocitos T y eosinófilos.	Linfocitos T
MIP-1 α	Quimiocina para linfocitos T; potencia la diferenciación de linfocitos T CD4+.	Células mononucleares, endotelio.
Eotaxinas 1, 2 y 3	Quimiocina para eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2.	Epitelio, endotelio, eosinófilos, fibroblastos, macrófagos
IP-10	Quimiocina para linfocitos T activados, monocitos y linfocitos NK.	Monocitos, macrófagos, endotelio.

Tabla 4: citoquinas, quimiocinas y sus funciones (93)

El reconocimiento de los patógenos por el sistema inmune innato está facilitado por receptores en los macrófagos, células NK y neutrófilos que reconocen unidades determinadas del patógeno denominadas *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMP) (94). Este reconocimiento conduce a la producción de citoquinas y quimiocinas que inician la inflamación y reclutan células inflamatorias, inducen una respuesta de fase aguda y activan el sistema inmune adaptativo (92).

El *sistema inmune adquirido* se caracteriza fundamentalmente por la *especificidad de antígeno y el desarrollo de la memoria inmunológica* (95) producida por la expansión y maduración de linfocitos T y linfocitos B específicos de antígeno. La inmunidad específica se divide en humoral y celular:

- *La inmunidad humoral* es mediada por los *linfocitos B* que producen anticuerpos (inmunoglobulinas), encargados de neutralizar las toxinas liberadas por los patógenos, opsonizar microorganismos para facilitar su captación por las células fagocíticas, activar el complemento produciendo la citólisis del patógeno, y dirigir las células NK para matar las células infectadas a través de la citotoxicidad mediada por anticuerpos.
- *La inmunidad celular* depende de los linfocitos T (96) que destruyen las células infectadas por virus (94) y células cancerosas, activan los macrófagos para matar los patógenos intracelulares, y administran las señales necesarias para la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B y la formación de células B de memoria.

2.2.1 LINFOCITOS T

Existen dos tipos de células T: las células T citotóxicas (TCD8+) o Tc que destruyen células diana infectadas, y las células T helper (TCD4+), que a su vez pueden ser TH1 y TH2, y que activan principalmente macrófagos y células B.

Las células efectoras poseen una vida limitada por lo que una vez eliminado el antígeno, experimentan muerte celular programada o apoptosis. Algunas de estas, las llamadas *células de memoria* (95), persisten constituyendo una memoria inmunológica que garantiza una respuesta más rápida y efectiva en un segundo encuentro con el patógeno. Los linfocitos T tienen en su membrana celular un receptor (TcR) encargado de reconocer el antígeno asociado al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de las Células Presentadoras de antígeno (APC).

2.2.1.1 Estructura y genética del Receptor de las células T (TcR)

El receptor de la célula T (TcR) está formado por una colección de proteínas de membrana, unas involucradas en el reconocimiento del antígeno (región variable V) y otras con función estructural o de transmisión de señal al interior celular (región constante C). El TcR es monovalente (tiene un solo sitio de unión al antígeno) y nunca se secreta, a diferencia de las inmunoglobulinas.

Existen dos tipos de TcR alternativos. Los linfocitos T que expresan TcR α - β se denominan células T-2 y representan la mayoría de los linfocitos T. Los linfocitos T que expresan TcR γ - δ se denominan células T-1 y son minoritarios (menos del 5% de los linfocitos) (96).

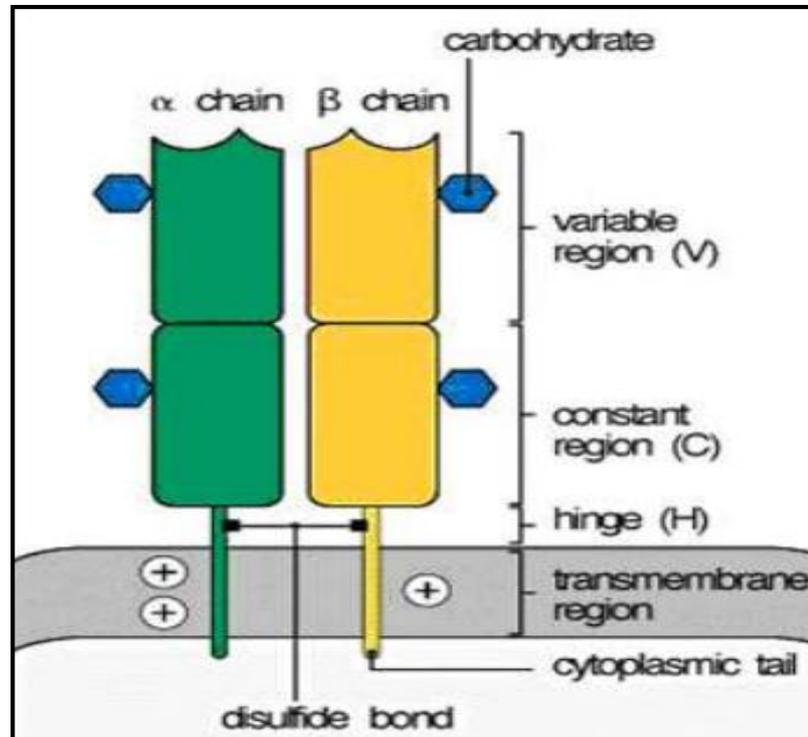


Figura 5. Estructura del receptor TcR. Reproducido de Murphy K et al (97)

Los genes del receptor se organizan en diferentes segmentos genéticos: V, J, D y C. La recombinación VDJ se produce entre segmentos génicos localizados en el mismo cromosoma y es la responsable de la *diversidad estructural de los receptores*, y por tanto, de la *especificidad* de estos. Cuando los dominios V (variables) de las dos cadenas se emparejan crean un solo sitio hipervariable en el extremo que constituye el sitio de unión al antígeno. Hay tres regiones hipervariables que determinan la *especificidad* del receptor hacia el antígeno y forman una superficie complementaria a él llamada **región determinante de complementariedad** o CDR (CDR1, CDR2 y CDR3). La diversidad estructural de los receptores T se debe enteramente a la diversidad generada durante este proceso de **reordenamiento génico** mediante un complejo de enzimas codificadas por los genes RAG1 y RAG2 (genes de activación de la recombinación).

2.2.1.2. Correceptores CD4 y CD8 y moléculas accesorias

Todos los linfocitos T con TcR α - β expresan de modo alternativo y excluyente las proteínas CD4 o CD8, que se conocen como correceptores del linfocito T. (98, 99). Ambas son glicoproteínas de membrana que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. El hecho de que un linfocito T exprese CD4 o CD8 no es trivial, ya que le permitirá interactuar con unas células específicas, determinando su función:

- Linfocitos T CD4: reconocen CMH de clase II - péptido, y están especializadas en activar otras células inmunitarias efectoras, células B o macrófagos, para que actúen contra los antígenos que han capturado.
- Linfocitos T CD8 reconocen complejos de MHC de clase I - péptido, y se activan para destruir células diana que exhiben péptidos extraños derivados de agentes patógenos citosólicos.

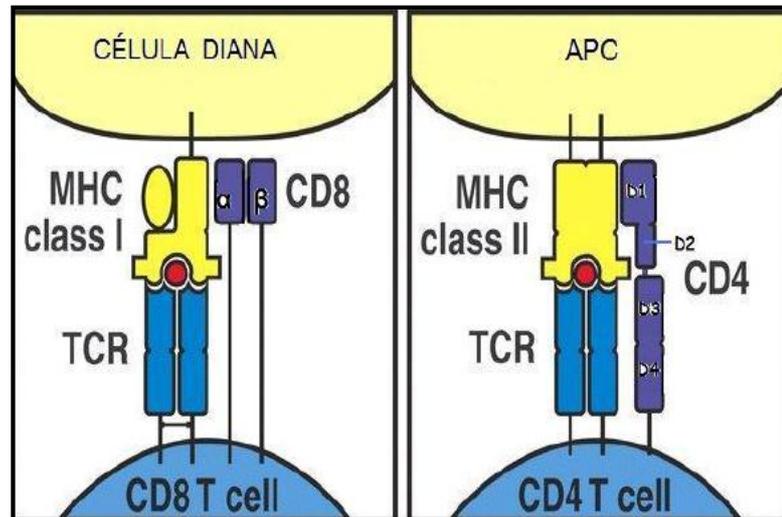


Figura 6: Interacción de los correceptores con las moléculas MHC. Reproducido de Murphy K et al (97)

Además, en la activación de los linfocitos T intervienen una gran colección de moléculas de superficie (también llamadas moléculas accesorias) que tienen fundamentalmente dos acciones: promover y aumentar el contacto-adhesión entre el linfocito T y la APC (sinapsis inmunológica) y/o participar en la transducción de señales durante la activación de los linfocitos T. Podemos destacar, entre otras (100):

- CD28: en todas las células T helper (y en algunas citotóxicas), transmite la segunda señal de activación.
- CD45: contribuye en la activación celular.
- Integrinas linfocitarias: principalmente el heterodímero CD18/CD11a.
- CD2: contribuye en la activación celular.

2.2.1.3 Transducción de señales en el linfocito T.

Los linfocitos T reciben la primera señal de activación a través del receptor de antígeno (TcR) desde las células APCs. Para que esta señal sea completa debe haber entrecruzamiento de receptores. La segunda señal puede ser de varios tipos (100):

- A través de CD28 (cuyos ligandos en la APC son CD80 y/o CD86) y que es la habitual en los linfocitos T CD4 (también en algunos CD8).
- A través de moléculas solubles: la IL-2 sintetizada por un linfocito T helper se une a su receptor en los linfocitos T citotóxicos
- A veces, se producirán las 3 señales sobre la misma célula.

En el momento en que la señalización haya sido completa, se producirá la cascada de transducción de señales.

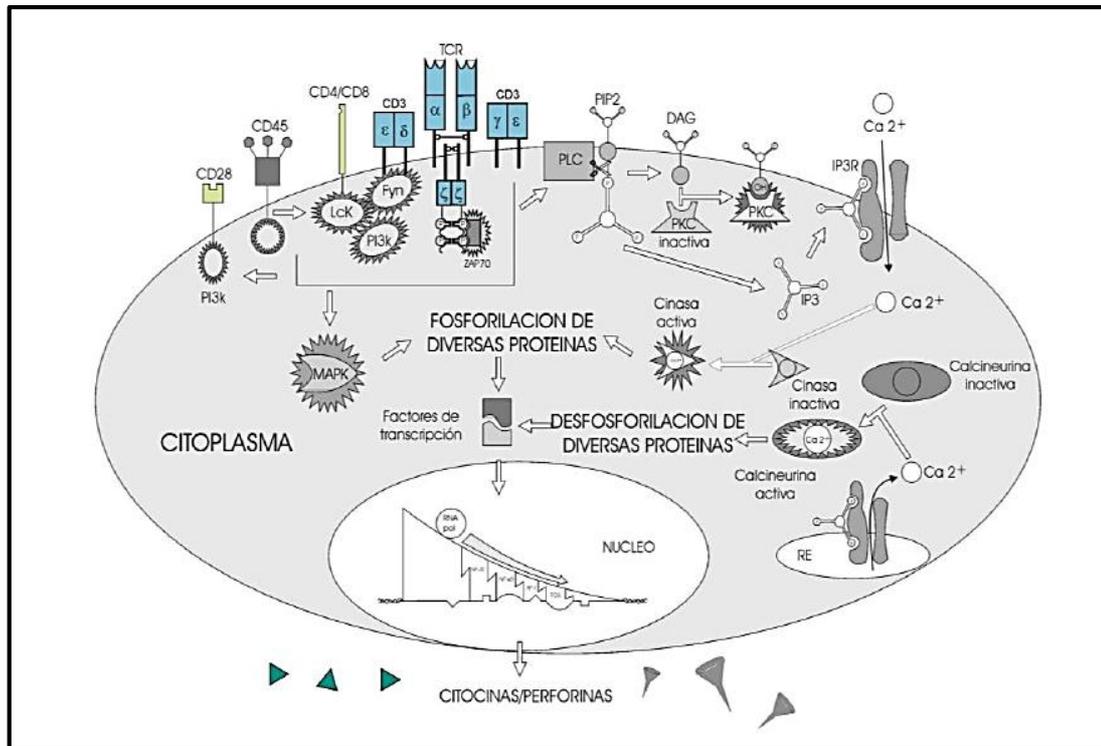


Figura 7: Transducción de señales en el linfocito T. (Reproducido de Regueiro J.R., López C., González S. & Martínez E.) (100)

Una vez que se ha iniciado la cascada de señales se producirá la activación de los factores de transcripción (NFκB, NFAT, AP-1 y Junos) que actuarán en los cromosomas de las células T, teniendo lugar una nueva transcripción génica que termina en la diferenciación, proliferación y acciones efectoras de las células T (96).

2.2.2 CÉLULAS NATURAL KILLER (NK).

Las células NK constituyen la tercera estirpe de células de tipo linfoide que participan tanto en la inmunidad innata como en los mecanismos de defensa adquirida. Su función esencial es identificar y destruir células tumorales o infectadas, fundamentalmente por virus (células blanco). Además, por su capacidad secretora tanto de citoquinas como quimiocinas, intervienen en la regulación del sistema inmune (101). Carecen de TcR y, en su mayoría, expresan en la superficie las moléculas Fc γ R-III (CD16) y CD56 que, junto con otros marcadores, definen este grupo celular.

2.2.2.1 Función citotóxica.

Para ejercer esta acción se requiere el reconocimiento de las células blanco a través de diferentes tipos de receptores de membrana, más la acción de ciertas citoquinas y moléculas de adherencia facilitadoras de la interacción celular (102). Dichos receptores pueden ser de **activación** o actuar como **activadores** o **inhibidores** según el

ligando presente en la célula diana y el balance neto entre señales activadoras e inhibitoras (103). La lisis se puede realizar:

- *Lisis natural*: sin necesidad de un periodo de sensibilización previa.
- *Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o ADCC*: implica la presencia de anticuerpos que son reconocidos en su extremo Fc por los receptores CD16 de las células NK.

2.2.2.2 Función secretora.

Esta función se activa por distintos estímulos, como la interacción con las células blanco, la acción de IL-2 (104) e IL-12 o por activación directa, por ejemplo por anticuerpos frente a las moléculas CD16, CD69 o CD80. Entre las sustancias sintetizadas y secretadas destacan **citoquinas** como el TNF-alfa, IFN-gamma, IL-3, GM-CSF y M-CSF y **quimiocinas** tales como MIP-1alfa, MIP-1beta y RANTES de gran importancia en los fenómenos inflamatorios.

2.2.2.3 Receptores NK específicos de antígenos HLA.

Las células NK poseen una variedad de receptores cuya función es el reconocimiento e interacción con moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad clase I (HLA-I). Estos receptores son un grupo heterogéneo de glicoproteínas que pertenecen a distintas familias de moléculas y se expresan en células NK y en ciertos linfocitos T (105).

- Receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas:
 - KIRs (*killer cell Ig-like receptors*): receptores de antígenos HLA-I.
 - ILTs (*immunoglobulin like transcripts*).
- Receptores tipo lecitina:
 - CD94/NKG2.

Los receptores de las células NK están altamente especializados en el reconocimiento de moléculas HLA clase I, y de las distintas combinaciones de receptores KIR y ligandos HLA se derivan distintos fenotipos que son importantes a nivel de estudio adaptativo y pronóstico clínico, y que condicionan la resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas, inflamatorias y cáncer (101, 106).

2.2.2.3.1 Receptores NK tipo KIR.

Son receptores implicados en la inhibición de la lisis celular al interactuar específicamente con determinadas moléculas HLA de clase I de la célula diana. Para su denominación se añade a la palabra KIR los sufijos 2D y 3D que indican el número de los dominios de inmunoglobulina que poseen, y la letra L (*long*) o S (*short*) según que la cola citoplasmática de estas moléculas sea larga o corta respectivamente. Son los receptores que presentan la mayor variabilidad y diversidad genética de las células NK (107). Los genes que codifican estos receptores se encuentran agrupados en una región denominada *leukocyte receptor complex* (LRC), situada en la región cromosómica 19q13.4 (108).

La distribución de estos receptores en las células NK no es homogénea y cada clon NK puede expresar uno o varios tipos de estos receptores. Se aprecian claras diferencias en la expresión de estos receptores cuando se estudian distintos individuos y hay indicios de que el repertorio de receptores está regulado, durante el desarrollo, por factores genéticos (109, 110).

2.2.2.3.1.1 Variabilidad en los receptores KIR

- *Variabilidad en el contenido genético: haplotipos.*

El primer nivel en la variabilidad genética de los KIR reside en el diferente número de genes y copias de los mismos que pueden expresarse en cada individuo (110, 111). Esta variabilidad es consecuencia de la estructura de la región LCR y está relacionada con la elevada homología de los genes KIR en gran parte de sus secuencias nucleotídicas (80-90%). Esta circunstancia convierte esta región en una zona muy susceptible de presentar recombinaciones no homólogas durante la meiosis que genera fenómenos de duplicación, delección y conversión génica (111).

El conjunto de genes codificados en la línea germinal, en cada individuo, en cada uno de los cromosomas homólogos, conforman el haplotipo KIR. Se han identificado al menos 30 haplotipos diferentes, clasificados en dos grandes grupos: haplotipos A y B.

- Los haplotipos A constan de 9 genes (KIR3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2) (112) presentando un perfil claramente inhibitorio, ya que de éstos solo KIR2DS4 es potencialmente activador (113). La variabilidad entre distintos haplotipos A se consigue gracias a diferentes combinaciones de polimorfismos alélicos de los loci que incluye.
- Cualquier variación por exceso respecto a esta dotación génica de los haplotipos A se considera un haplotipo B, con mayor heterogeneidad génica, y puede incluir regiones centroméricas y teloméricas de haplotipos A. Esto se debe a que muchos de los haplotipos B se generan por procesos de recombinación a nivel de la región intergénica entre KIR3DP1 y KIR2DL4. En los haplotipos B hay una mayor presencia de receptores activadores (114).

- *Variabilidad alélica: polimorfismos.*

Esta familia de receptores presenta una extensa variabilidad polimórfica que da lugar a la aparición de múltiples variantes alélicas para cada gen (115). Estas modificaciones pueden influir en la expresión de los receptores, en la unión a los ligandos y en su funcionalidad (107, 109).

2.2.2.4 Transducción de señales en las células NK:

Tanto los receptores KIR, los ILT y los receptores tipo lecitina pueden ejercer acciones inhibitorias como activadoras dependiendo de la cola citoplasmática de dichas moléculas y de las quinasas con las que se asocien (112, 115):

- Las colas citoplasmáticas largas generalmente contienen dos motivos inhibitorios de tirosina denominados ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs), que transducen señales inhibitorias a la célula NK. La acción inhibitoria previene de la destrucción de las células normales del huésped que expresan moléculas de histocompatibilidad reconocidas por estos receptores. Cuando una célula deja de expresar estas moléculas puede ser destruida por la célula NK al no ser frenada su actividad. Los receptores de este grupo son los denominados KIR2DL (KIR2DL1, 2, 3 y 5), KIR3DL (KIR3DL1, 2, 3), ILT-2, NKG2A y NKG2B (115).

- Las colas citoplasmáticas cortas poseen un residuo de aminoácido cargado positivamente en su región transmembrana (motivo activador ITAM) que les permite asociarse con moléculas de señalización (homo o heterodímeros de CD3 ξ y/o Fc ϵ RI- γ u homodímeros de DAP-12 o DAP-10) capaces de generar una señal de activación. Estos receptores son KIR2DS (KIR2DS1, 2, 3, 4 y 5) y KIR3DS1.
- El receptor KIR2DL4 tiene capacidad inhibitoria y activadora al poseer un tallo intracitoplasmático con un residuo mediante el que interacciona con Fc ϵ RI- γ y un motivo ITIM inhibitor (114-116)

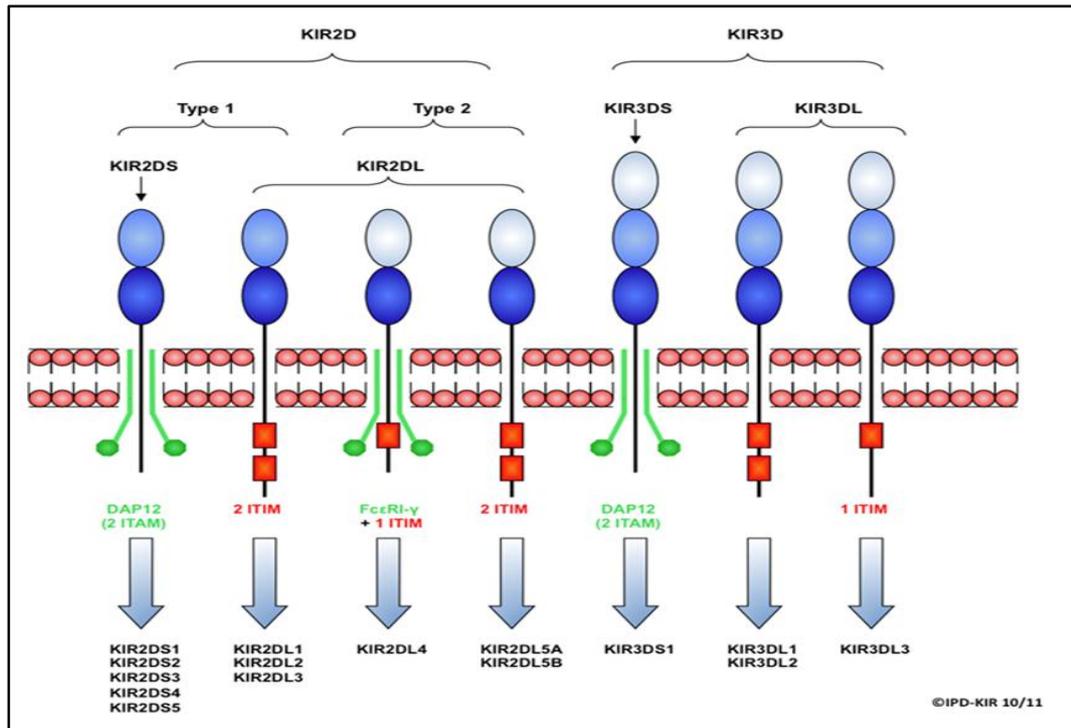


Figura 8: Estructura de los receptores tipo KIR y señales de activación (verde) e inhibición (rojo). Tomado de Vilches C, Parham (116)

2.2.3 CITOQUINAS.

Las citoquinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular que actúan mediando interacciones complejas entre células de linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Se sintetizan fundamentalmente por los linfocitos en respuesta a estímulos antigénicos o inflamatorios (116). Actúan uniéndose a receptores específicos de la misma célula que las produce (acción autocrina), de células cercanas (acción paracrina) o de células distantes (acción endocrina). Bajo este término se incluyen las interleuquinas (IL), linfoquinas, interferones y monoquinas. Sus funciones son muy variadas, pero se pueden clasificar en las siguientes categorías:

- Diferenciación y maduración de células del sistema inmunitario
- Comunicación entre células del sistema inmunitario
- En algunos casos, ejercen funciones efectoras directas.
- Estimuladores de colonias.

2.2.3.1 Interleuquina 10.

La interleuquina 10 (IL-10) es una citoquina de tipo II que forma parte de la familia que incluye a IL-19, IL-20, IL-22, IL-26 e IL-29. Estas citoquinas tienen una organización génica similar y se unen a receptores con una estructura parecida. Sin embargo, llevan a cabo actividades biológicas muy diferentes. La IL-10 es producida por distintas células del sistema inmunitario, pero también se observa en células epiteliales, queratinocitos de la piel y ciertas células tumorales.

Sus funciones biológicas principales son disminuir y regular la respuesta inflamatoria producida por las células dendríticas y los macrófagos, así como reducir las respuestas adaptativas de las células T CD4+. Esta citoquina es un potente inhibidor de la presentación antigénica, ya que reduce la expresión del complejo principal de histocompatibilidad de tipo II (MHC II) y de las moléculas accesorias de coestimulación CD80 y CD86 en células dendríticas. El efecto global es la inhibición de la maduración de dichas células, lo que causa una reducción de las citoquinas proinflamatorias interferón gamma (IFN- γ), IL-4 e IL-5 producidas por los linfocitos T (117). La IL-10 también inhibe la producción de otros mediadores inflamatorios como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) producidos por macrófagos (118). También puede promover la activación de las células B y estimular la proliferación de células NK, por lo que su actividad no es siempre inhibitoria (119).

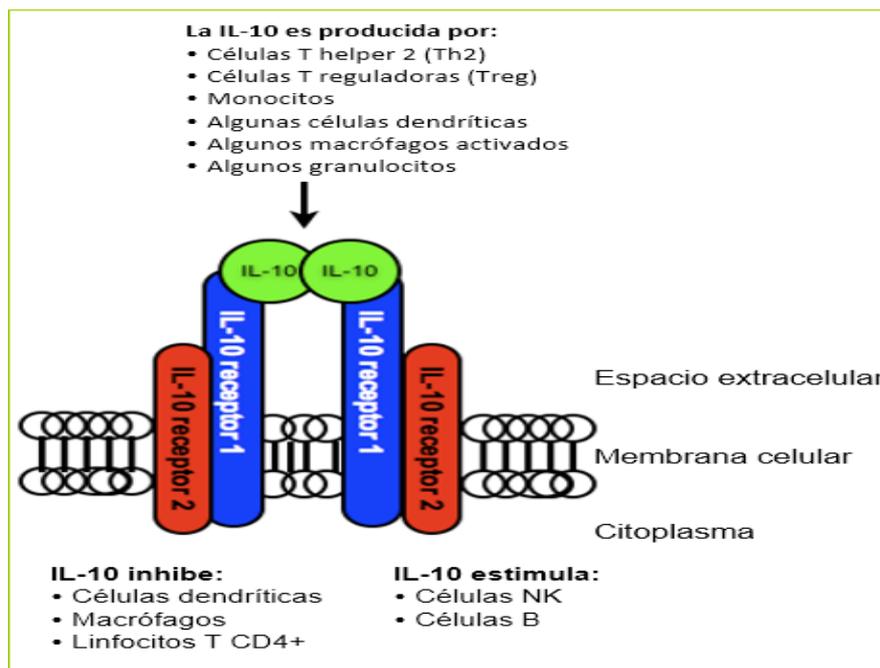


Figura 9. IL-10, su receptor y células del sistema inmunitario relacionadas con esta citoquina (tomado de Enrique Jañez 1999, (120))

Se ha podido comprobar que los factores genéticos influyen considerablemente en la producción de citoquinas (121), y un número importante de polimorfismos parecen controlar el nivel de secreción de la IL-10. El gen de la IL-10 está localizado en el cromosoma 1, en la posición 1q31-1q32 (122). Se han confirmado tres polimorfismos bialélicos en esta región promotora génica: -1082G/A, -819C/T y -592C/A. Con su

combinación podemos encontrar los siguientes haplotipos, correspondiendo cada uno de ellos a un fenotipo relacionado con una producción de IL-10 alta, intermedia o baja (123):

- GCC/GCC, productor alto.
- GCC/ACC, productor intermedio.
- GCC/ATA, productor intermedio.
- ACC/ACC, productor bajo.
- ACC/ATA, productor bajo.
- ATA/ATA, productor bajo.

Una disminución en la producción de esta citoquina (haplotipo bajo productor de IL10) se ha implicado en un aumento de la actividad inflamatoria (23) que provoca una evolución más grave (mayor extensión e intensidad) de la lesión hepática asociada a fármacos una vez iniciada por distintos mecanismos, lo que se conoce como “Hipótesis de la Señal de Daño” (Danger signal Hypothesis) (82). Esto se ha podido demostrar concretamente en la toxicidad hepática producida por paracetamol (27) y diclofenaco (81).

2.2.3.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es una citoquina *proinflamatoria* y mediadora de la respuesta inmunitaria innata, implicada principalmente en respuestas celulares o Th1. Ejerce su efecto sobre células tumorales e inflamatorias (124).

Existe un polimorfismo bialélico (125,126) en el promotor del gen del TNF- α , -308A/G cuya combinación determina los genotipos y fenotipos siguientes:

- G/G, bajo productor
- G/A, alto productor
- A/A, alto productor.

2.2.3.3 Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β)

El TGF- β es una citoquina *antiinflamatoria* e inmunosupresora, que participa principalmente en respuestas inmunitarias celulares o Th1. Esta citoquina es secretada principalmente por monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Induce la proliferación de monocitos y la diferenciación celular. Es una citoquina fibrogénica. Aumenta la producción de proteínas de la matriz extracelular y sus receptores, e inhibe la síntesis de enzimas de degradación proteolítica.

Destacan dos polimorfismos confirmados en la región promotora génica: TGF- β codón 10 T/C y codón 25 C/G (127). Se transmiten en haplotipo, es decir, van juntos. No existen datos concluyentes en la literatura respecto a los fenotipos y haplotipos de estas citoquinas, siendo escasos los estudios dedicados al respecto. Los principales parecen los siguientes:

- TT GG, TC GG; productor alto
- TC GC, CC GG, TT GC; intermedio
- CC GC, CC CC, TT CC, TC CC; bajo

2.2.3.4 Interleuquina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citoquina *proinflamatoria* que se ha relacionado principalmente con la respuesta humoral o Th2, con implicación en varias funciones celulares. También puede presentar actividad antiinflamatoria. Secretada por distintas células como los linfocitos T, monocitos y fibroblastos, induce la diferenciación de eosinófilos y la

producción de IgA. Estimula el eje hipotálamo-pituitario-adrenal que se ha asociado con obesidad central, hipertensión y resistencia a la insulina. Se ha relacionado con la patogénesis de la enfermedad coronaria (128).

La IL-6 presenta una serie de polimorfismos bialélicos en la región promotora génica, de entre los que destacamos: -174G/C. Genotipos y Fenotipos:

- GG, alto productor.
- GC, alto productor.
- CC, bajo productor.

2.2.3.5 Interferón gamma (IFN- γ)

El IFN- γ es una citoquina *proinflamatoria e inmunorreguladora*, implicada principalmente en respuestas celulares o Th1. Pertenece a los interferones tipo II.

Es secretada principalmente por linfocitos Th, Tc, NK y células dendríticas. Es una citoquina quimiotáctica para monocitos y aumenta en ellos la expresión de HLA clase I. Su principal función es la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitarias innatas como en las adquiridas (127).

De esta citoquina destacamos el polimorfismo bialélico en la región intrón 1: +874T/A. Genotipos y Fenotipos:

- TT, productor alto.
- TA, productor intermedio
- AA, productor bajo.

2.2.4 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH, major histocompatibility complex) del ser humano, también denominado complejo de antígenos leucocíticos humanos (HLA, human leukocyte antigen), es una región de cuatro megabases (Mb) situada en el cromosoma 6 (6p21.3). Sus productos, las moléculas HLA, constituyen un elemento clave en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. En el CMH humano se diferencian tres regiones, de clase I, clase II y clase III que codifican diferentes glucoproteínas de membrana específicas:

- **Genes de clase I (CMH-I):** determinan glucoproteínas de membrana presentes en casi todas las células nucleadas y sirven para presentar antígenos peptídicos de células propias alteradas a los linfocitos T citotóxicos.
- **Genes de clase II (CMH-II):** determinan glucoproteínas de membrana de células presentadoras de antígeno (APC: macrófagos, células dendríticas, linfocitos B), que sirven para presentar antígenos peptídicos a linfocitos T colaboradores Th.
- **Genes de clase III (CMH-III):** no todos ellos tienen que ver, aparentemente, con el sistema inmune. Entre los que sí tienen papeles inmunológicos cabe citar los genes de proteínas del complemento, y el del TNF

El conjunto de genes HLA de clase I y clase II tienen tres importantes características:

- El **polimorfismo**, es decir, la existencia de un gran número de alelos para cada uno de estos genes.
- La **codominancia** o expresión de los dos alelos de un mismo gen.

- **Ligamiento** de los genes en el brazo pequeño del cromosoma 6.

COMPLEJO HLA							
Clase CMH	CMH-II			CMH-III	CMH-I		
Región	DP	DQ	DR	C4, C2, BF...	B	C	A
Productos génicos	DP ($\alpha\beta$)	DQ ($\alpha\beta$)	DR ($\alpha\beta$)	Proteínas del complemento, TNFa, TNFb	HLA-B	HLA-C	HLA-A
Ubicación	hacia centrómero ←			brazo corto cromosoma 6	hacia telómero →		

Tabla 5: Organización génica del CMH (adaptada de Enrique lañez Pareja (120))

2.2.4.1 Moléculas de clase I

- **Estructura.**

Las moléculas de clase I son heterodímeros glucoprotéicos constituidos por una cadena pesada α y una ligera β (129)

- *La cadena pesada α* presenta una porción extracelular, con 3 dominios (α_1 , α_2 y α_3) siendo los dos primeros los de mayor polimorfismo, otra transmembrana y una última intracitoplasmática.

- *La cadena ligera β* , llamada β_2 -microglobulina, está constituida por un solo dominio, no presenta polimorfismo y su localización es extracelular, íntimamente asociada a la cadena pesada.

En el extremo aminoterminal existe un surco formado por la interacción espacial entre los dominios α_1 y α_2 (130) donde se albergan los fragmentos de antígenos proteicos procesados para ser reconocidos por el sistema inmune específico (131).

- **Organización genética.**

La región de clase I contiene los tres loci clásicos, HLA A, B y C, cada uno de los cuales codifica para una cadena alfa diferente. Los genes de la cadena alfa presentan una organización similar y comprenden 8 exones separados por sus correspondientes intrones. El primer exón codifica para el péptido líder; y el segundo, tercero y cuarto, para los dominios α_1 , α_2 , y α_3 de la cadena pesada. La región transmembrana es codificada por el quinto exón y la región intracitoplasmática por los exones 6, 7 y 8 (131, 132). El gen de la β_2 -microglobulina contiene cuatro exones. El primero codifica para el péptido líder y los tres siguientes codifican para la molécula completa.

- **Polimorfismo de la cadena alfa.**

Todas las moléculas clásicas HLA de clase I (HLA A, B y C), presentan un alto grado de polimorfismo en cada uno de los tres loci, (132), que obedece a cambios de la secuencia en los exones 2 y 3, lo que se va a traducir en variaciones en la secuencia de aminoácidos en los dominios α_1 y α_2 de la cadena pesada.

2.2.4.2 Moléculas de clase II

- **Estructura.**

Son glucoproteínas de membrana heterodiméricas que resultan de la asociación de dos cadenas llamadas alfa y beta, codificadas ambas dentro de la región de HLA D. Las dos cadenas presentan una porción extracelular, transmembrana e intracitoplasmática (133). La porción extracelular está constituida por dos dominios llamados $\alpha 1$ - $\alpha 2$ y $\beta 1$ - $\beta 2$. La asociación de las dos cadenas forma también un surco en el extremo aminoterminal de la molécula, de configuración más abierta que en CHM I, pero con la misma función de albergar pequeños péptidos antigénicos (130).

- **Organización genética.**

De mayor complejidad que la de clase I, ya que cada uno de los tres loci (DR, DP y DQ) contiene dos genes, A y B, que codifican para las cadenas alfa y beta respectivamente. Además, la subregión DR puede contener genes adicionales responsables de la subdivisión de los genes DR en cuatro grupos: DR1, DR8, DR52 y DR53.

- **Polimorfismo de las moléculas de clase II:**

Las moléculas de clase II presentan polimorfismo en sus dos cadenas. La más polimórfica para los tres loci es la β , y dentro de esta, la región $\beta 1$ de la molécula, codificada por el exón II.

2.2.4.3 Función de las moléculas de clase I y II

Los linfocitos T identifican al antígeno una vez ha sido procesado en pequeños fragmentos peptídicos y asociado a las moléculas de clase I y clase II. Las células T CD8+ reconocen al antígeno presentado por las moléculas de clase I, mientras que las T CD4+ lo hacen asociadas a las moléculas de clase II. A este proceso se le conoce con el nombre de **restricción por el MHC**. Se ha demostrado que un solo sitio de unión en el MHC puede unir péptidos (132) con alta afinidad y a la vez conservar la capacidad de unir una gran variedad de péptidos distintos. La unión al ligando peptídico, que pasa a ser parte integral de la estructura molecular del MHC, estabiliza la molécula.

Las moléculas de MHC son altamente polimórficas en ciertos sitios del surco de unión al péptido. Se ha demostrado que los péptidos que se unen a una variante alélica determinada de MHC tienen similares aminoácidos en dos o tres posiciones específicas de la secuencia peptídica, llamados **residuos de anclaje**. Las cavidades de unión de las moléculas de MHC de clase II son más permisivas a la unión de los aminoácidos, haciendo más difícil definir residuos de anclaje y predecir qué péptidos serán capaces de unir determinadas moléculas de MHC de clase II (133, 134).

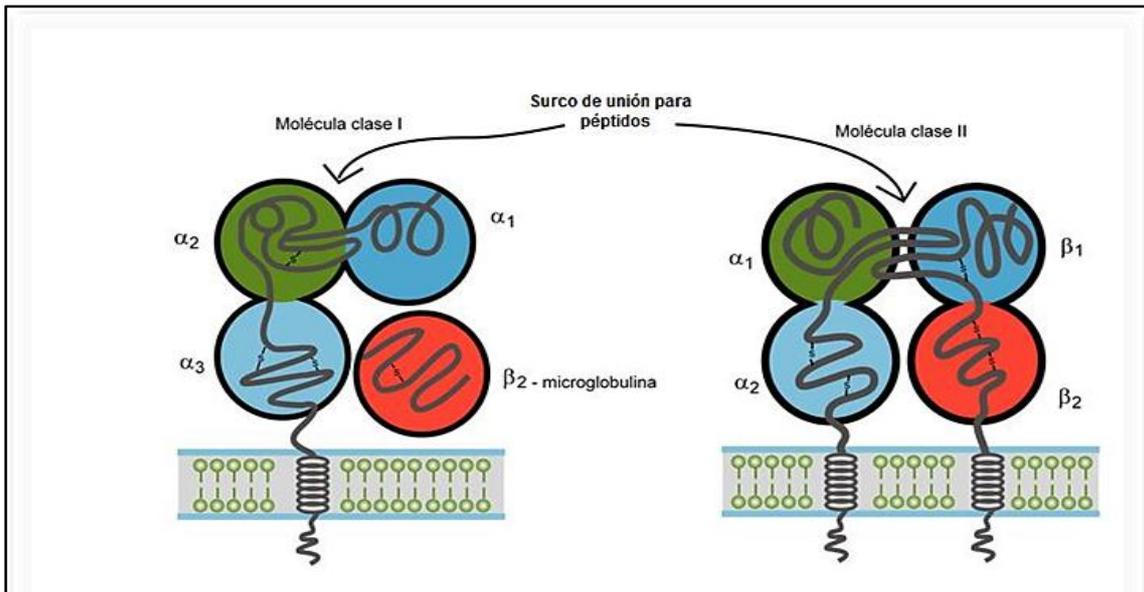


Figura 10: Estructura de las moléculas HLA clase I y II

2.2.4.4 Polimorfismo y poligenia.

Las dos propiedades del CMH que hacen difícil que los agentes patógenos escapen a la respuesta inmunitaria son:

- La **poligenia**: existen diversos genes de CMH de clase I y II que codifican proteínas con diferentes espectros de especificidad de unión.
- El **polimorfismo**: existen más de 200 alelos en algunos loci del CMH, y cada alelo presenta una frecuencia relativamente elevada en la población (135). Por ello, la posibilidad de que el locus del CMH correspondiente en ambos cromosomas de un individuo codifique el mismo alelo es reducida. La mayoría de los individuos son heterocigotos para dichos loci. Ambos alelos se expresan en la célula, por lo cual se dice que la expresión es **codominante**. *Polimorfismo y poligenia* se combinan para producir la diversidad de moléculas del CMH que posee un individuo. Además, procesos de recombinación génica pueden crear nuevos alelos, con lo que aumenta la diversidad molecular del CMH.

El polimorfismo de las moléculas de CMH garantiza un número suficiente de moléculas distintas en un individuo que asegure la respuesta inmune ante la mayoría de agentes externos. Si una proteína carece de péptidos con un motivo apropiado para unir alguna de las moléculas de CMH expresadas en las células del individuo, este no podrá responder al antígeno; esto es muy infrecuente.

2.2.4.5 HLA y hepatotoxicidad.

La individualidad de la respuesta inmune podría explicar por qué la hepatotoxicidad ocurre en algunos y no en otros sujetos. Al ser la expresión de las moléculas de HLA genéticamente polimórfica puede existir una relación entre *el haplotipo HLA particular del sujeto y su propensión al desarrollo de reacciones hepatotóxicas inmunológicas*.

Se han realizado estudios de fenotipo HLA en pacientes que han desarrollado reacciones de hipersensibilidad debidas a fármacos, encontrándose una asociación significativa (Genome-wide association study or GWAs). Los primeros trabajos intentaban relacionar la hepatitis causada por la anestesia con halotano con el HLA del paciente (136, 137). Los resultados fueron contradictorios. Eade et al no encuentran asociación estadística entre la hepatotoxicidad por halotano y ningún alelo del HLA (136) mientras que el grupo de Otsuka et al (137) determinan una asociación significativa entre el haplotipo Aw24-Bw52-DR2 y el desarrollo de hepatitis icterica tras la anestesia con este fármaco. Los estudios no son comparables al tratarse de poblaciones diferentes, y porque en el segundo trabajo, además de las moléculas de HLA I también se estudian las de tipo II (DR) que son cruciales en el desencadenamiento de la respuesta inmune.

Posteriormente se intentan establecer otras asociaciones como hepatotoxicidad por nitrofurantoína y el *HLA-B8*, metotrexato y *HLA-A3*, antidepresivos tricíclicos y diclofenaco y *HLA-A11* (138) o clorpromacina y *HLA-DR6* (138), no estableciéndose una significación estadística debido probablemente al pequeño tamaño de las muestras.

Estudios más recientes han demostrado una asociación significativa entre la hepatotoxicidad por amoxicilina-clavulánico y el haplotipo *HLA-DRB1*1501* (47). Estos datos apoyarían la hipótesis de que el fenotipo HLA del huésped pueda predisponer al desarrollo de reacciones inmunoalérgicas a fármacos al ser reconocidos como neoantígenos determinados productos de su metabolización (hipótesis del hapteno (19)). Dada la especificidad de unión a determinados haplotipos de HLA, esta predisposición sería hacia un tipo determinado de fármaco. Este campo de estudio ha sido muy desarrollado en los últimos años con diferentes trabajos que buscan una asociación significativa entre un determinado haplotipo de HLA y un tóxico específico (48,76-79).

Algunas de las relaciones más significativas son las mostradas en la tabla 3 que se comentaron entre los factores de riesgo genéticos para el desarrollo de DILI.

2.3. HEPATOTOXICIDAD Y QUIMIOTERAPIA.

La hepatotoxicidad debida a quimioterapia es una causa importante de morbilidad en enfermos oncológicos. La mayoría de los casos de hepatotoxicidad inducida por la quimioterapia son idiosincrásicos y no tienen una firma clínica o histológica única que sea distinta de otros agentes que causan DILI (139). Los principales mecanismos subyacentes a la hepatotoxicidad relacionada con la quimioterapia se basan en la producción de metabolitos reactivos generados por reacciones de oxidación en fase I, daño inmunológico o alteraciones en la función mitocondrial (140, 141). La hepatopatía subyacente y la afectación hepática por el propio tumor pueden ser modificadores importantes de la lesión hepática (139). Debido a que los beneficios (remisión del cáncer) son altos, también lo son los riesgos que el oncólogo y el paciente deben estar dispuestos a asumir. En cualquier caso el daño relacionado con las drogas utilizadas para el cáncer todavía se evalúa mal debido a la subestimación clínica relativa y al difícil diagnóstico diferencial (142).

Las neoplasias linfoides de precursores hematopoyéticos engloban a la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y el linfoma linfoblástico de origen B o T. Los dos procesos, leucemia y linfoma linfoblásticos, son considerados biológicamente equivalentes y se los denomina de una u otra forma por la implicación de médula ósea y sangre periférica en el primer caso y de estructuras extramedulares en el segundo. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad maligna que representa el 25% de todas las neoplasias malignas en los niños (143). Aproximadamente el 80% de todos los pacientes afectados se pueden curar, pero la resistencia a la terapia y sus efectos tóxicos siguen siendo problemas clínicos graves (144). El linfoma linfoblástico representa el 30% de los linfomas no hodgkin en los niños, y tanto desde el punto de vista citológico como en las alteraciones cromosómicas que presenta es muy parecido a la LLA, por lo que el tratamiento de ambas enfermedades es similar.

Las enfermedades histiocitarias son un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la proliferación de células dendríticas y de macrófagos, que pueden afectar a diferentes órganos o tejidos a cualquier edad. La presentación clínica y la gravedad son muy variables, desde formas con resolución espontánea a formas muy graves con compromiso vital y disfunción multiorgánica (145). La etiopatogenia es desconocida, aunque en los últimos años se han producido importantes avances que han permitido mejorar el conocimiento de la enfermedad (146). El tratamiento es igualmente muy variable: en muchos casos no se administra ningún tratamiento y el pronóstico es excelente, pero en otros casos es necesaria la utilización de distintos citostáticos similares a los empleados en las neoplasias hematológicas, que conllevan la aparición de toxicidad.

A pesar de los avances terapéuticos alcanzados, entre 20 y 30 % de los niños con este tipo de patologías fallecen por causas relacionadas con la enfermedad o su tratamiento. El éxito del tratamiento depende de múltiples factores, que incluye rasgos biológicos y genéticos en las células tumorales en el momento del diagnóstico, características del paciente y lo más importante, las diferencias en la respuesta terapéutica (147). Numerosos estudios han demostrado que existe gran variabilidad entre pacientes, tanto en el efecto terapéutico, como en la toxicidad de los fármacos

utilizados en el tratamiento. Además, las células tumorales tienen la habilidad de incorporar rápidamente cambios fenotípicos que las hacen resistentes a una gran diversidad de fármacos estructuralmente diferentes. Por tanto, el fracaso terapéutico puede deberse a la resistencia intrínseca de las células leucémicas o a una reducida exposición a la droga por biotransformación acelerada en los sistemas enzimáticos del paciente (148). La intensidad del tratamiento en los pacientes con LLA y linfoma linfoblástico varía de acuerdo con diferentes características identificables en el momento del diagnóstico. No obstante, aunque la mayoría de los niños alcanzan la curación, los efectos colaterales a mediano y largo plazo de la quimioterapia anticancerosa, ocasionan alteraciones que comprometen su calidad de vida. Además, la toxicidad aguda que provocan los tratamientos intensivos puede cobrar la vida del paciente o retrasar la continuidad del tratamiento planificado, lo que aumenta el riesgo de recaídas (8). Como resultado, el foco de la investigación está cambiando lentamente de tratar de aumentar las tasas de supervivencia a reducir las toxicidades relacionadas con la quimioterapia. Estos efectos adversos a menudo son consecuencia de la toxicidad directa en el tejido sano, como resultado de la baja especificidad mostrada por estos medicamentos y se vuelven más frecuentes a medida que se intensifica el tratamiento. En este escenario, es obvio que cualquier factor capaz de modificar la farmacocinética o la farmacodinamia de los quimioterápicos tiene el potencial de ser crítico para la aparición de efectos adversos graves en los pacientes con este tipo de enfermedades.

2.3.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

2.3.1.1 Epidemiología

La LLA constituye el 25% de los tumores y el 75% de las leucemias en la edad pediátrica. El pico de incidencia máximo se establece entre los dos y los cinco años de edad (143), predominando ligeramente en los varones, sobre todo en la edad puberal.

Las diferencias geográficas son notables en esta enfermedad; mientras que en los países menos desarrollados, como Norte de África y Oriente Medio, predominan los linfomas y las LLA de estirpe T, en los países industrializados la LLA de estirpe B es, con diferencia, la más frecuente de las hemopatías malignas (149,150). Este hecho se ha relacionado con la mayor facilidad para la exposición a determinados agentes medioambientales “leucemógenos” en los países industrializados. En los países con poblaciones heterogéneas, se ha observado una mayor incidencia de LLA en la raza blanca.

2.3.1.2 Fisiopatología

La secuencia de acontecimientos que derivan en la transformación maligna en la LLA se debe a múltiples factores. Estos eventos se producen durante el desarrollo de la estirpe linfoide, ya que la alta tasa de proliferación y de reordenamientos genéticos que acontece en este momento favorece la aparición de mutaciones espontáneas y de otras alteraciones citogenéticas (149, 150).

- Causas genéticas:

En más del 75% de las LLA de pacientes pediátricos se pueden detectar anomalías genéticas primarias, siendo necesarias varias alteraciones para que se desarrolle una leucemia. Los estudios de Mullinghan han identificado una media de 6 alteraciones en las copias de DNA en los casos de LLA infantil (151). Los factores genéticos tienen un papel cada vez más importante en la etiología de las leucemias agudas. Esta afirmación está basada en:

- 1) La relación estrecha entre la LLA y algunas translocaciones cromosómicas.
- 2) La mayor frecuencia de leucemia aguda en los familiares de pacientes con LLA.
- 3) La mayor incidencia de LLA en determinadas enfermedades genéticas (síndrome de Down, Klinefelter, neurofibromatosis, Schwachman, Bloom, Fanconi, etc.)(150, 151).

Los avances de las técnicas y conocimientos de la biología molecular de los últimos años han permitido identificar casi el 100% de las anomalías citogenéticas de las células leucémicas. Éstas pueden afectar al número total de cromosomas o a su estructura. Se ha comprobado que la hiperdiploidía (aumento del número de cromosomas >51) en los linfoblastos es un factor de buen pronóstico. En la actualidad, sabemos que esto, probablemente, es debido a que las células leucémicas hiperdiploides tienen una mayor predisposición a la apoptosis, porque son capaces de acumular mayor concentración de metabolitos activos del metotrexato (poliglutamatos) y por ello son más sensibles a este fármaco. De todas las anomalías cromosómicas estructurales, las translocaciones son las más frecuentes (151).

Translocación	Frecuencia	Genes afectados	Características
t(1,19)(q23;p13)	5-6%	E2A-PBX1	Fenotipo pre-B, hiperleucocitosis. Necesario tratamiento intensivo
t(9,22)(q34;p11)	3-5%	BCR-ABL	Cromosoma Philadelphia, hiperleucocitosis. Tratamiento con imatinib
t(4,11)(q21;p23)	2%	MLL-AF4	Asociada a lactante, hiperleucocitosis, mal pronóstico
t(12,21)(p13;q22)	25%	TEL-AML	Fenotipo B, buen pronóstico, mayor sensibilidad a asparaginasa

Tabla 6: Translocaciones más frecuentes en la LLA

- Factores ambientales:

Entre los factores medioambientales que pueden facilitar el desarrollo de leucemia, destaca la exposición a las radiaciones ionizantes. El aumento de incidencia de leucemia entre los supervivientes de Hiroshima y Nagasaki se relacionó con la proximidad a la explosión. Se cree que el 1% de las leucemias en el adulto son secundarias a las pruebas radiológicas realizadas durante su vida. Existe controversia sobre si los campos electromagnéticos (teléfonos móviles, torres de alta tensión, etc.) incrementan o no el riesgo de leucemia. De momento, los estudios realizados no han encontrado una clara asociación. La exposición a diferentes productos químicos, como el benceno, se ha asociado a leucemia mieloide aguda (LMA) en el adulto. También la quimioterapia utilizada para el tratamiento de distintos tumores, puede tener efecto leucemógeno (por ejemplo, los agentes alquilantes o los inhibidores de la topoisomerasa II). En el estudio de la LLA en el menor de un año con reordenamiento del gen MLL se ha observado que esta alteración genética aparece con alta frecuencia

en aquellas leucemias agudas secundarias a la exposición a agentes inhibidores de la topoisomerasa II. A partir de esta observación, se ha desarrollado la hipótesis de que sustancias en la dieta, medicamentos o en el ambiente que inhiban las topoisomerasas y la capacidad reducida del feto o de la madre de eliminar estas sustancias podrían aumentar el riesgo de desarrollar leucemia aguda en el lactante (152).

Se ha dado mucha importancia al papel de los virus en el estudio de la etiología de las leucemias. Esto es debido a que la mayoría de las LLA se producen en un periodo de la vida en el cual el sistema inmune está en desarrollo y podría ser más susceptible a los efectos oncogénicos de determinados agentes virales. Hasta el momento, el virus de Ebstein-Barr en la LLA-L3 y los HTLV I y II en algunos casos de leucemias del adulto han sido los únicos con una clara asociación (152).

2.3.1.3 Pronóstico. Grupos de riesgo.

El pronóstico de la LLA depende de las características del paciente y de la leucemia, pero actualmente lo más importante es la respuesta precoz al tratamiento, cuantificado por la enfermedad mínima residual (EMR). La respuesta precoz al tratamiento refleja las características genéticas de los linfoblastos, las características farmacodinámicas y farmacogenéticas del paciente y el efecto de la quimioterapia sobre las células. Factores pronósticos históricamente importantísimos, como la edad y el número de leucocitos al diagnóstico, están empezando a ser cuestionados con los nuevos tratamientos basados en el seguimiento por EMR. Los pacientes con una edad inferior a un año continúan teniendo un pronóstico claramente peor que el resto de los pacientes. Algunas anomalías cromosómicas como la t(9:22) o la t(4:11) presentaban muy mal pronóstico. Actualmente, tras la adición a la quimioterapia de los inhibidores de la tirosín kinasa, como el imatinib, el pronóstico de los pacientes con LLA Phi+ t(9;22) ha mejorado espectacularmente, dejando de ser en el momento actual una indicación de trasplante de progenitores hematopoyéticos. Los pacientes que tras las primeras 4-6 semanas que dura la inducción no presentan remisión completa, tienen una alta tasa de recaída y una supervivencia libre de enfermedad muy reducida (154).

Atendiendo a los factores pronósticos, en el protocolo actualmente vigente (SEHOP-PETHEMA 2014, (155)) encontramos 3 grupos de pacientes:

1. **RIESGO ESTÁNDAR:** El paciente debe reunir **todos y cada uno de los siguientes** criterios:
 - Edad >1 y <10 años
 - Leucocitos <20 x10⁹/l al diagnóstico
 - Inmunofenotipo no T
 - Ausencia de infiltración del SNC y/o testes
 - Citogenética (uno de los dos criterios es suficiente):
 - Alta Hiperdiploidía (51-67 cromosomas), índice de DNA 1,16-1,48
 - t(12;21) positiva
 - No t(1;19)
 - No reordenamiento MLL
 - Presencia de <1.000 blastos/mm³ en día +8 de la Inducción, en sangre periférica

- Presencia de < 5% de blastos y < 0,1% de ERM en médula ósea (MO) en día +15 de la Inducción y al final de la inducción I'A
2. ALTO RIESGO: La existencia de cualquiera de los siguientes criterios determina la inclusión del paciente en este grupo de Alto Riesgo:
 - t(4;11) (MLL/AF4)
 - Hipodiploidía <44 cromosomas o índice DNA <0,81
 - > 1.000 blastos en día +8 de la Inducción, en sangre periférica
 - > 25% de blastos y >10% de ERM en el día +15 de la Inducción, en médula ósea
 - ERM > 1% en el día +33 de la Inducción, en médula ósea
 - Pacientes afectos de LAL Ph+
 3. RIESGO INTERMEDIO: Aquellos pacientes que no reúnan los criterios de Riesgo Estándar ni de Alto Riesgo

2.3.1.4 Tratamiento.

El tratamiento de la leucemia ha cambiado mucho en los últimos años. Hace 50 años el uso de quimioterapia combinada condujo a la remisión del 80-90% de los niños con LLA, pero la mayoría presentaron recidivas, sobre todo en sistema nervioso central, con supervivencia final inferior al 10% (156). Con la adición de irradiación craneoespinal y quimioterapia intratecal se consiguió aumentar la supervivencia (157). Posteriormente, el desarrollo de un régimen intensivo de inducción y consolidación con 8 fármacos y 8 semanas de duración supuso un avance muy importante, apareciendo los protocolos denominados BFM (158). Este régimen es la base de la mayoría de las terapias actuales, que presentan componentes básicos similares: inicialmente hay una fase de Inducción que dura entre 4-6 semanas e incluye un glucocorticoide, vincristina, una preparación de asparaginasa, uso opcional de antraciclinas y quimioterapia intratecal. Después de la remisión de la enfermedad, el tratamiento incluye una fase de quimioterapia intensiva de 6-8 semanas de duración que pretende consolidar la remisión y prevenir la reaparición de la leucemia en el sistema nervioso central. Posteriormente se administra la intensificación retardada, que dura 8 semanas. Los ciclos repetidos de metotrexato, administrados a dosis altas en infusión intravenosa durante 24 horas, seguidos de la administración de ácido fólico para “rescatar” los tejidos de posibles efectos tóxicos, son un componente esencial de estas etapas.

Los pacientes reciben por último la denominada “terapia de mantenimiento”, donde se usan antimetabolitos (metotrexato oral de forma semanal y mercaptopurina oral diariamente) a dosis bajas durante un tiempo prolongado. Se desconocen las razones exactas por las cuales se requiere esta fase de tratamiento, así como la duración y composición más efectivas de la misma, pero su no administración se asocia con un riesgo de recaída 4 veces mayor que cuando sí se administra (159). Se ha demostrado que los polimorfismos del paciente pueden influir tanto en la eficacia como en la toxicidad de los antimetabolitos (160), especialmente en esta fase.

Las recaídas se producen en un 15-20% de los niños, siendo las tasas de curación más bajas después de la misma. Los niños de presentan una recaída precoz (antes de 6 meses del fin de tratamiento), con frecuencia presentan mutaciones que reducen la eficacia de los quimioterápicos empleados (162, 162).

Con respecto al trasplante alogénico de células hematopoyéticas, como terapia primaria se usa en menos del 10% de los pacientes, mientras que tras la recaída este porcentaje es más alto (50% de los niños que recaen).

En la actualidad estamos asistiendo a un hito muy importante en la historia del tratamiento de la leucemia, y es el avance de la inmunoterapia (anticuerpos monoclonales y células CAR-T), que probablemente en los próximos años logre un aumento significativo en la supervivencia de los niños con recaída (163).

A continuación se muestra el esquema de tratamiento vigente actualmente en España, SEHOP-PETHEMA 2014 y los quimioterápicos empleados en cada una de las fases:

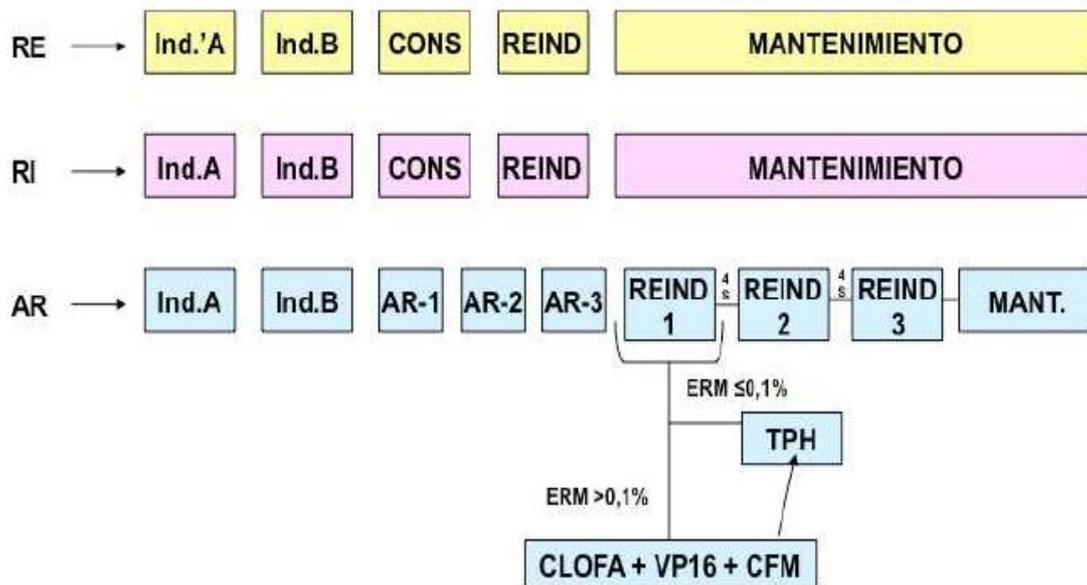


Figura 11: esquema de tratamiento SEHOP-PETHEMA.

Abreviaturas: RE riesgo estándar; RI riesgo intermedio, AR alto riesgo; Ind.A inducción fase A; Ind.B Inducción fase B; CONS Consolidación; REIND Reinducción; ERM enfermedad residual mínima; TPH trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Riesgo estándar:								
Inducción A	Inducción B	Consolidación			Reinducción			Mantenimiento
PRED	CFM	6-MP			Fase I	Fase II	6-MP	
DNR	ARA-C	HD-MTX			DEXA	CFM	MTX	
VCR	6-MP	TIT			VCR	TG	TIT	
ASP	TIT				DOXO	ARA-C		
TIT					ASP	TIT		
					TIT			

Riesgo Intermedio:								
Inducción A	Inducción B	Consolidación			Reinducción			Mantenimiento
PRED	CFM	6-MP			Fase I	Fase II	6-MP	
DNR	ARA-C	HD-MTX			DEXA	CFM	MTX	
VCR	6-MP	TIT			VCR	TG	TIT	
ASP	TIT				DOXO	ARA-C	PEG-ASP	
TIT					ASP	TIT		
					TIT			

Alto riesgo:								
Inducción A	Inducción B	Intensificación			Reinducción			Mantenimiento
PRED	CFM	AR-1	AR-2	AR-3	R-1	R-2	R-3	6-MP
DNR	ARA-C	DEXA	DEXA	DEXA	DEXA	DEXA	DEXA	MTX
VCR	6-MP	VCR	VCR	HD ARA C	VCR	VCR	VCR	TIT
ASP	TIT	HD- MTX	HD- MTX	VP	DOXO	DOXO	DOXO	
TIT		TIT	TIT	PEG- ASP	PEG- ASP	PEG- ASP	PEG- ASP	
		CFM	IFO	TIT	CFM	CFM	CFM	
		HD ARA C	DNR		TIT	TIT	TIT	
		PEG- ASP	PEG- ASP		TG	TG	TG	
					ARA- C	ARA- C	ARA- C	

Tabla 7: fármacos usados en cada fase del tratamiento de la LLA en niños, según esquema SEHOP-PETHEMA 2014.

Abreviaturas: PRED: prednisona, DNR: daunorrubicina, VCR: vincristina, APS: asparaginasa nativa de E. coli, CFM: Ciclofosfamida, ARA-C: citarabina, 6-MP: mercaptopurina, HD-MTX: metotrexato a altas dosis, DOXO: doxorubicina, TG: tioguanina, PEG-ASP: asparaginasa pegilada de E. coli, IFO: ifosfamida, HD ARA-C: citarabina a altas dosis, TIT: triple intratecal (metotrexato, citarabina e hidrocortisona).

2.3.1.5. Hepatotoxicidad en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda

2.3.1.5.1 Epidemiología y manifestaciones clínicas.

La hepatotoxicidad asociada a la quimioterapia es frecuente en los regímenes de tratamiento contemporáneos para la LLA. La mayoría de las veces ocurre de forma no predecible o idiosincrásica, es decir, no tiene relación con la dosis administrada del citostático. Suele ocurrir entre 1 y 4 semanas de la exposición, y más frecuentemente tras exposiciones múltiples (139). Pese a su frecuencia, las series descritas son escasas, y las tasas de hepatotoxicidad varían ampliamente entre estudios sin que estas diferencias puedan atribuirse totalmente a diferencias en la población (huésped), fenotipos de leucemia (enfermedad) o las pequeñas variaciones en la dosificación del régimen y las combinaciones de quimioterapia (terapia). En general, en los estudios publicados el porcentaje oscila entre el 15-25% de los pacientes (164). Los efectos adversos de estos agentes en el hígado también pueden ser modificados por enfermedad hepática preexistente, la sensibilidad genética a la quimioterapia y la propia afectación tumoral del hígado (139).

El daño hepático puede ser reversible o permanente, dependiendo de la variabilidad genética, edad, sexo, y la capacidad de adaptación hepática del paciente. En población adulta se conoce que la edad avanzada, el sexo femenino, y hábitos sociales específicos como el tabaco y el alcohol pueden incrementar el riesgo de toxicidad (165). Estudios recientes han tratado de determinar factores de riesgo en niños tratados de leucemia linfoblástica, detectándose que la mayor edad y la obesidad se relacionan con un incremento del riesgo de sufrir hepatotoxicidad quimio-inducida (164).

La presentación clínica de la hepatotoxicidad inducida por quimioterapia es muy variable, incluyendo formas asintomáticas con elevación de las transaminasas, hepatitis colestásica manifiesta, progresión a fibrosis y cirrosis, transformación maligna, obstrucción sinusoidal y fallo hepático fulminante (166). En el tratamiento actual de la leucemia linfoblástica, lo más frecuente es la elevación de las transaminasas, siendo raros los casos de daño hepático grave o permanente (167, 168).

2.3.1.5.2 Grados de hepatotoxicidad en los protocolos actuales.

En los últimos protocolos vigentes en España la hepatotoxicidad se clasifica en 5 grados, atendiendo a la elevación de ALT, AST, fosfatasa alcalina y bilirrubina total, según los Criterios CTAE versión 4 del National Cancer Institute of United States (NCI) (169). Se muestran en la tabla 8:

	0	1	2	3	4	5
Fosfatasa alcalina	Límites normales	>LSN-2,5xLSN	>2,5-5x LSN	>5-20x LSN	>20 LSN	-----
Bilirrubina	Límites normales	>LSN-1,5xLSN	>1,5-3xLSN	>3-10x LSN	>10 LSN	-----
GGT	Límites normales	>LSN-2,5xLSN	>2,5-5x LSN	>5-20x LSN	>20 LSN	-----
Síntomas de fallo hepático	No	-----	-----	Asterixis, encefalopatía moderada	Encefalopatía moderada a grave, coma	Muerte
Hipertensión portal	No	----- ---	Flujo venoso portal disminuido	Flujo venoso portal retrógrado + varices o ascitis	Situación potencialmente mortal, requiere intervención urgente	Muerte
ALT	Límites normales	>LSN-3x LSN	>3-5x LSN	>5-20x LSN	>20 LSN	-----
AST	Límites normales	>LSN-3x LSN	>3-5x LSN	>5-20x LSN	>20 LSN	-----

Tabla 8: Grados de hepatotoxicidad según el National Cancer Institute of United States (NCI). Abreviaturas: LN, límites normales; LSN, límite superior de la normalidad

En líneas generales, en las guías de tratamiento actuales se indica la suspensión o el retraso del tratamiento si los niveles de transaminasas o bilirrubina alcanzan un grado 3 de toxicidad.

2.3.1.5.3 Principales quimioterápicos implicados.

2.3.1.5.3.1 Antimetabolitos:

Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis tanto de DNA como de RNA y conducir a la apoptosis celular. Estos fármacos tienen potencial hepatotóxico variable, y puesto que muchos son metabolizados en el hígado, requieren de ajuste de dosis en pacientes con disfunción hepática.

- Citarabina/arabinósido de citosina:

La citarabina combina una base de citosina con un azúcar arabinosa en lugar de desoxirribosa, lo que conduce a la muerte celular. Es el antimetabolito más importante en el tratamiento de la leucemia mieloblástica aguda, siendo también usado en el tratamiento de la leucemia linfoblástica, habitualmente a dosis más bajas. Se ha descrito

elevación transitoria de las transaminasas después de su administración a altas dosis, no siendo frecuente la progresión a colestasis (170).

- 6-Mercaptopurina y tioguanina:

Análogos de las purinas, se emplean actualmente como fármacos clave en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. La 6-MP es especialmente importante en la fase de mantenimiento. Pueden producir tanto daño hepatotóxico como colestasis. La tioguanina se relaciona con la enfermedad veno-oclusiva hepática, toxicidad grave y frecuentemente irreversible que parece ser dosis dependiente (171). La efectividad de ambos fármacos depende de sus metabolitos activos: 6-tioguanina nucleótido (6-TGN) y 6-metilmercaptopurina nucleótido (6-MMPN). Los niveles que alcanzan estos metabolitos dentro de las células hematopoyéticas parecen tener relación directa con la eficacia y toxicidad de la droga: la acumulación excesiva conduce a una mayor toxicidad; por el contrario, los niveles bajos pueden conducir a una disminución de la eficacia de la terapia (172).

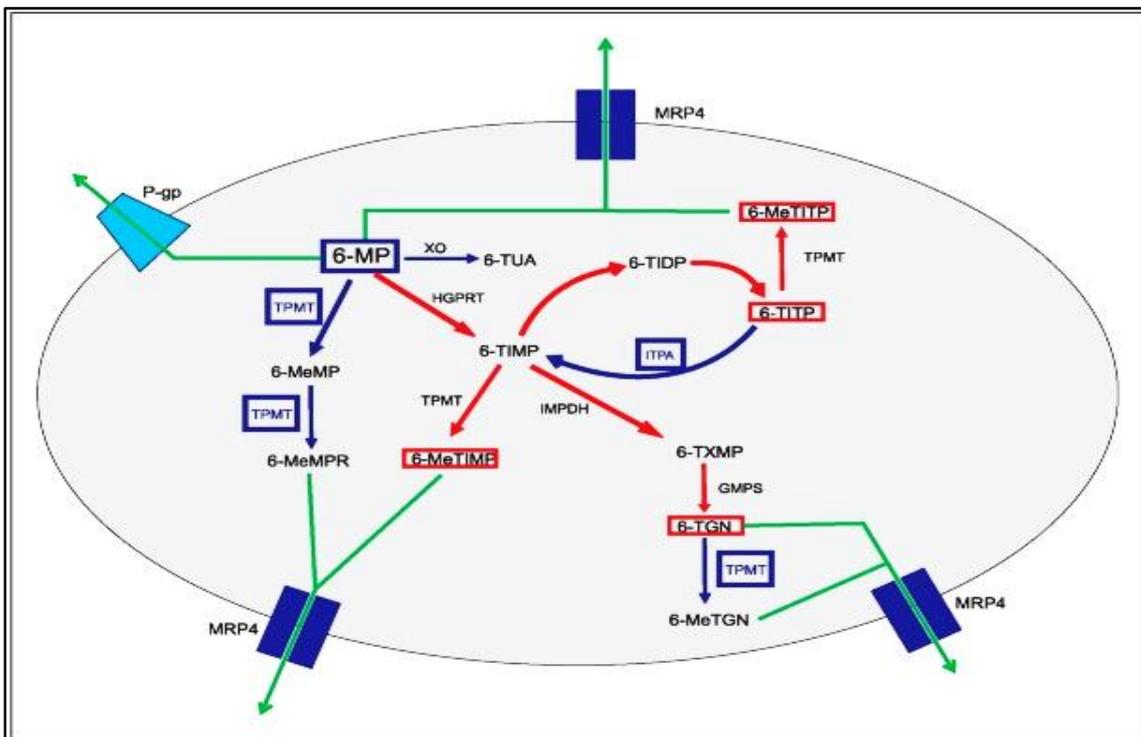


Figura 12: Metabolismo de la mercaptopurina, tomado de Milosevic y col (172)

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes que codifican las proteínas involucradas en el metabolismo de 6-MP y tioguanina, el transporte celular y el mecanismo de acción pueden influir en la eficacia y la toxicidad de estos fármacos. Los más conocidos son los polimorfismos del gen responsable de la tiopurin S-metiltransferasa (TPMT), enzima importante que inactiva los medicamentos con tiopurina y 6-MP. Actualmente se sabe que personas que portan dos alelos TPMT inactivos (deficiencia homocigótica de TPMT) experimentan toxicidad severa medular y hepática cuando se tratan con dosis convencionales. Los portadores TPMT deficientes heterocigóticos (un alelo TPMT inactivo) muestran toxicidad moderada a severa en

contraste con los portadores homocigotos del alelo TPMT de tipo salvaje (TPMT * 1) y tienen un menor riesgo de toxicidad cuando se toman dosis convencionales de ambos fármacos (172, 173). También se ha demostrado que los SNP en el gen de la pirofosfatasa de trifosfato de inosina (ITPA), que modula la actividad de la ITPasa, también influyen en la acumulación de los metabolitos tóxicos de tiopurina y 6-MP. Los portadores de estos SNP son propensos a toxicidad severa (173, 174).

Otros polimorfismos estudiados corresponden a los de los genes que codifican las proteínas de transporte tipo ABC (transportadores de casete de unión a ATP), como la proteína de resistencia a múltiples fármacos 4 (MRP4), que sirve como una bomba de eflujo transmembrana para varios aniones orgánicos. La proteína MRP4 exporta nucleótidos de 6-MP metilados de las células, protegiéndolos así de la toxicidad de este fármaco. El gen ABCC4 que codifica la proteína MRP4 es altamente polimórfico, con más de 20 variantes genéticas. Los alelos ABCC4 menos funcionales pueden ser responsables de toxicidad más grave durante el tratamiento con 6-MP. Además, los alelos ABCC4 más activos podrían ser responsables de la resistencia a la 6 MP (172, 176). En particular, el nucleótido T en ABCC4 c. * 1372 T> G ha sido señalado por Lopez et al. (177) en un estudio GWAS como la variante genética que da como resultado una disminución de la expresión de ABCC4 y, por lo tanto, mayor toxicidad inducida por 6-MP.

- Metotrexato:

El MTX es un antimetabolito que actúa inhibiendo competitivamente la dihidrofolato reductasa. Esta enzima participa en la formación del tetrahidrofolato necesaria para la formación del nucleósido timidina, requerido para la síntesis de ADN, ARN, timidilatos y proteínas.

En dosis bajas, el MTX se excreta prácticamente sin modificar en la orina, mientras que en dosis altas (como las que se usan en el tratamiento de la leucemia linfoblástica en las fases previas al mantenimiento), es metabolizado parcialmente en el hígado a 7-hidroxi metotrexato.

A dosis altas generalmente causa un aumento transitorio en los niveles de transaminasas en el 60%-80% de los pacientes, que se resuelve de forma espontánea en 1-2 semanas. Sin embargo, a dosis más bajas y en pacientes que se someten a tratamientos prolongados, como en la artritis reumatoide, puede provocar fibrosis y cirrosis (178). En los pacientes que toman MTX oral diario, se estima que la fibrosis o la cirrosis se desarrollan con más del doble de frecuencia que en aquellos que tome el medicamento de forma intermitente por vía parenteral (176). Hay descritos al menos 3 casos de carcinoma hepatocelular desarrollado en pacientes con fibrosis hepática secundaria a metotrexato, y todos ellos fueron niños tratados por leucemia linfoblástica aguda, uno de ellos con deficiencia de alfa-1 antitripsina. Estos datos sugieren un potencial efecto carcinogénico a largo plazo secundario al tratamiento con metotrexato, al menos en los raros casos que desarrollan fibrosis hepática (179).

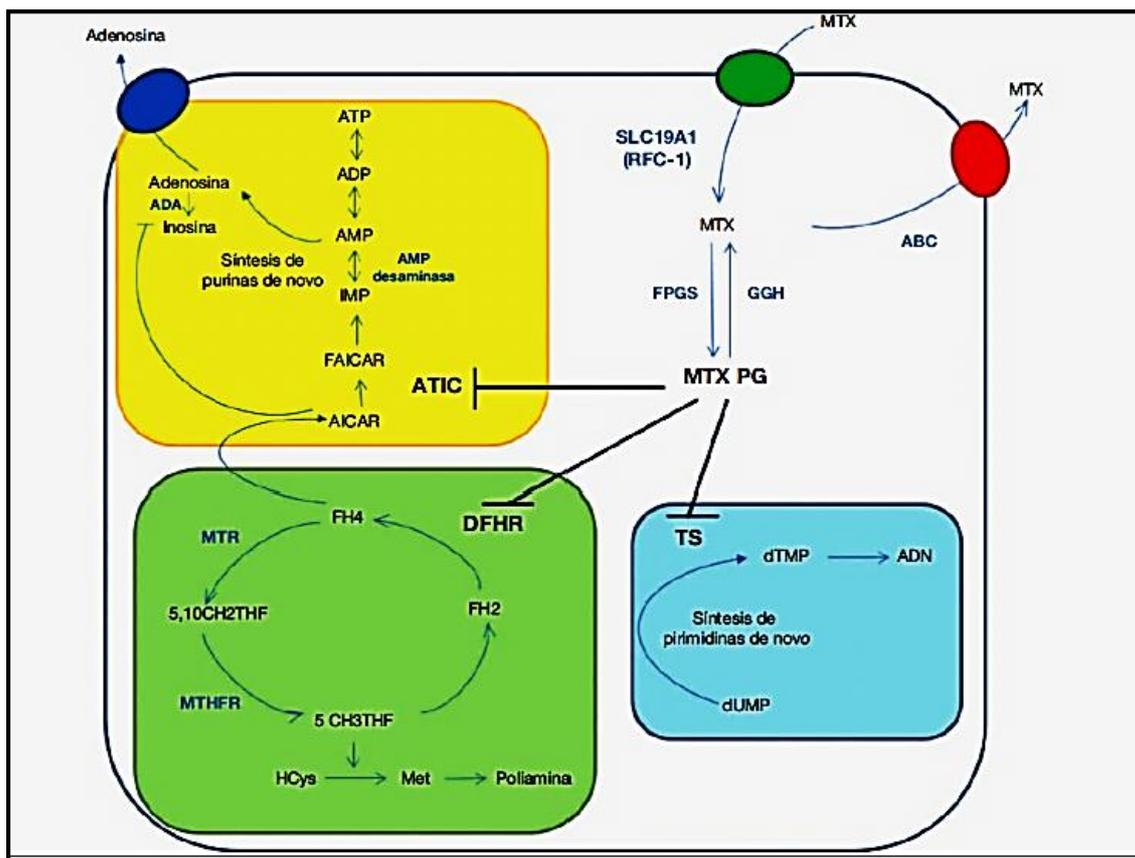


Figura 13: metabolismo intracelular del metotrexato, tomado de Moya y col (180).

Los polimorfismos en los genes de las enzimas que intervienen en el metabolismo del metotrexato han sido objeto de múltiples estudios, con resultados dispares. A continuación se resumen los más importantes (180):

- **Polimorfismos de la Metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR):** La MTHFR es una enzima clave en el metabolismo del ácido fólico, al regular la cantidad de folato intracelular disponible para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Cataliza la reducción de 5,10 metilén tetrahidrofolato a 5 metil tetrahidrofolato, forma en que circula el folato endógeno, que es un donador de grupo metilo necesario para la conversión de homocisteína a metionina durante la síntesis de proteínas. Esta enzima mantiene los niveles normales de folato reducido y homocisteína. Se han estudiado diferentes SNP de *MTHFR*, con el fin de encontrar asociación entre ellos y la eficacia y toxicidad del MTX. Entre ellos, los SNP rs1801133 (677C>T) y rs1801131 (A1298C) son de los que más trabajos publicados existen. Estos polimorfismos han sido implicados en la respuesta al tratamiento con MTX. Se ha descrito que los pacientes con LLA que presentan haplotipos mutados tienen menor supervivencia libre de eventos, con mayor riesgo de recaídas en los pacientes con la variante C677T, así como mayor frecuencia de toxicidad hematológica y hepática durante la consolidación y el mantenimiento (181).

- *Dihidrofolato reductasa (DHFR)*: Se ha descrito una asociación entre el SNP rs1643650 y la respuesta al fármaco; los pacientes con un genotipo T/C o C/C podrían tener una mejor respuesta al MTX en monoterapia que los pacientes con genotipo T/T (182).
- *5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa (ATIC)*: está implicada en la liberación extracelular de adenosina desempeñando un papel fundamental en los efectos antiinflamatorios del MTX a dosis bajas. Se han estudiado diferentes variantes genéticas de ATIC, con el fin de encontrar asociación entre ellas y la toxicidad y/o eficacia del tratamiento con MTX. De las publicaciones existentes, el SNP rs2372536 es el más estudiado y hay que destacar la concordancia entre los resultados de 3 publicaciones que describen una asociación entre los portadores del alelo G en rs2372536 y la toxicidad al fármaco (180).
- *Timidilato sintetasa (TS)*: es inhibida directamente por el MTX PG, por lo que se han intentado relacionar algunas de sus variaciones genéticas con la respuesta y/o toxicidad del MTX. Se ha descrito una asociación entre una secuencia variable de repeticiones en tandem en la región promotora y los niveles de expresión proteica. Recientemente, un estudio ha descrito que el genotipo 3G/3G en el alelo TS*3 se asocia con peor respuesta al MTX en pacientes con artritis reumatoide (183).
- *Transportador de folato reducido de proteína 1 (RFC1/SLC19A1)*: interviene en la entrada del MTX a la célula, por lo que una alteración en su funcionalidad puede provocar un aumento o disminución de los valores de MTX intracelular. Se han estudiado diferentes SNP del gen *RFC1/SLC19A1*, siendo rs1051266 (G80A) del que más publicaciones existen. Los resultados de estos estudios muestran discordancias entre la eficacia y/o toxicidad del MTX y el SNP rs1051266.
- *ATP-binding cassette B1*: Los transportadores *ATP-binding cassette* están implicados en el eflujo del MTX, y la *ABCB1* es uno de los genes más estudiados como posible marcador farmacogenético. De todos los SNP estudiados, la variante rs1045642 (C3435T) situada en el exón 26 del gen 64 es la que más veces se ha documentado. (184, 185). A pesar de tanto trabajo para determinar la contribución genética de *ABCB1* en la respuesta y toxicidad del MTX, los resultados de los estudios hasta la fecha publicados no son concordantes (180).
- *Gamma glutamil hidrolasa*: La *GGH* tiene la función de revertir la poliglutamación del MTX permitiendo, de este modo, que se pueda extraer de la célula, por lo que variaciones genéticas que afecten a su funcionalidad, también pueden ser indicadoras de una falta de eficacia del fármaco o de una toxicidad asociada a este. El SNP rs11545078 es del que más publicaciones existen, con distintos resultados (183, 186).

2.3.1.5.3.2 Agentes alquilantes:

- **Ciclofosfamida (CFM):**

Pertenece al grupo de fármacos alquilantes citotóxicos. El compuesto original está inactivo in vitro y ejerce su acción biológica a través de metabolitos, principalmente mostaza fosforamida y acroleína, producidas por el sistema de enzimas hepáticas microsomales P450. La acroleína obstruye el sistema de defensa antioxidante de los tejidos, produce especies reactivas de oxígeno (ROS) e interactúa con los aminoácidos proteicos causando cambios estructurales y funcionales (187).

La lesión hepática inducida por CFM no es frecuente, y parece depender principalmente de su metabolito activo, la acroleína (188). En la mayoría de los casos se observan elevaciones leves y transitorias en los niveles séricos de aminotransferasa, siendo excepcionales otras alteraciones (139).

Con respecto a la farmacogenética, estudios actuales tratan de establecer la relación entre polimorfismos de los genes que codifican las enzimas del sistema P450 y la respuesta a la CFM. La mayoría de los estudios farmacogenómicos se han centrado en la evaluación de las variantes genéticas de CYP2B6 y CYP2C19, las enzimas que catalizan el paso de bioactivación inicial. La expresión y la actividad de CYP2B6 y CYP2C19 son altamente polimórficas debido a los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) comunes. La variación heredada en ambos genes también parece influir en los resultados terapéuticos. Sin embargo hay aún inconsistencias en la calidad de los datos (189, 190).

- **Ifosfamida:**

La ifosfamida un análogo de Ciclofosfamida. Su perfil de toxicidad parece ser similar al de Ciclofosfamida, y puede provocar elevaciones leves y transitorias en suero de los niveles de aminotransferasa. La causa de la hepatotoxicidad idiosincrásica de ifosfamida no es bien conocida. La lesión hepática asociada a sintomatología sólo está descrita en un pequeño número de casos, con desarrollo en todos ellos de hepatitis colestásica que surge dentro de unas pocas semanas de recibir ifosfamida (junto con otros agentes antineoplásicos). El síndrome de obstrucción sinusoidal se ha informado solo en regímenes de acondicionamiento previos a trasplante de células hematopoyéticas, y su gravedad varía desde una lesión transitoria autolimitada hasta el fallo hepático agudo (191).

2.3.1.5.3.3 Antibióticos antitumorales:

- **Doxorrubicina y Daunorrubicina:**

Ambos son producidos por la bacteria *Streptomyces peucetius*. Las drogas de este grupo, que incluye epirrubicina e idarrubicina, parecen similares en términos de toxicidad y metabolismo. La doxorrubicina puede causar una reacción idiosincrásica y potencialmente producir toxicidad hepática. Por otro lado, la función hepática deteriorada retrasa la excreción y aumenta la acumulación de fármaco en plasma y tejidos, lo que conduce a efectos secundarios sistémicos como la miocardiopatía (139, 142).

2.3.1.5.3.4 Alcaloides de la Vinca:

Los alcaloides de la vinca son fármacos citotóxicos derivados de la planta de bígaro *Catharanthus roseus*, y actúan sobre la tubulina y los microtúbulos impidiendo la división celular.

- **Vincristina:**

Se han observado pruebas anormales de la función hepática con elevación transitoria de las transaminas después del tratamiento con vincristina, y se ha informado hepatotoxicidad grave en pacientes que recibieron vincristina junto con radioterapia (139, 142). Así mismo, la vincristina se ha asociado a la aparición de síndrome de obstrucción sinusoidal hepático (192). Su metabolización primaria es hepática, por lo que su administración en pacientes con hepatopatía y elevación de la fosfatasa alcalina y la bilirrubina debe hacerse con precaución, ya que puede haber retraso en el aclaramiento de la vincristina y potenciarse su toxicidad (142).

2.3.1.5.3.5 Otros antineoplásicos:

- **Asparraginasa:**

La hepatotoxicidad es frecuente con la asparraginasa derivada de *Escherichia coli*. Lo habitual es la elevación moderada y transitoria de las transaminasas, la bilirrubina y/o la fosfatasa alcalina. Aunque el mecanismo de hepatotoxicidad es desconocido, se cree que podría tener relación con la depleción que provoca de la asparagina, lo que lleva a una síntesis anormal de proteínas, aunque tiende a ser reversible (164).

La hepatotoxicidad es también frecuente con la forma pegilada de la asparraginasa, describiéndose elevaciones moderadas de las transaminasas y la bilirrubina. La recuperación en estos casos suele ser retardada (193).

3.3.2 LINFOMA LINFOBLÁSTICO.

Los linfomas linfoblásticos forman un grupo de neoplasias linfoides en las que el origen es una célula precursora de esta estirpe. Suponen un 30% de todos los linfomas no Hodgkin en los niños. Hasta en un 90% de los pacientes con linfoma linfoblástico las células neoplásicas pertenecen a la estirpe T y el resto presentan marcadores B. Su naturaleza es semejante a la de las leucemias linfoblásticas agudas, pero se diferencian porque en el caso de los linfomas la afectación medular es inferior al 25% y en cambio hay afectación extramedular. La presencia de una masa mediastínica anterior de rápido crecimiento es muy frecuente, así como la afectación del sistema nervioso central, el derrame pleural, la infiltración testicular y la presencia habitual de adenopatías periféricas.

Las alteraciones cromosómicas observadas en los linfomas linfoblásticos se asemejan a las descritas en las LLA, aunque han sido mucho menos estudiadas y su valor pronóstico es menos conocido.

Los protocolos terapéuticos presentan una estructura semejante a los de las leucemias linfoblásticas, con diversas fases, con una duración total que alcanza 24 meses. Los medicamentos empleados se resumen en la siguiente tabla (194).

Inducción	Consolidación o Protocolo M	Reinducción	Mantenimiento
Prednisona	Mercaptopurina	Dexametasona	Mercaptopurina
Vincristina	Metotrexato	Vincristina	Metotrexato
Daunorubicina	Metotrexato intratecal	Doxorrubicina	
Asparraginasa E. coli		Asparraginasa E. coli	
Ciclofosfamida		Ciclofosfamida	
Mercaptopurina		Citarabina	
Metotrexato intratecal		Tioguanina	
		Metotrexato intratecal	

Tabla 9: *tratamiento del linfoma linfoblástico (194)*

La toxicidad derivada del tratamiento es similar a la observada en la LLA, pudiendo acarrear eventos fatales. Los efectos secundarios a medio y largo plazo tampoco son desdeñables, incluyendo la presencia de segundos tumores que en algunas series han llegado hasta el 6% de los pacientes tratados (195).

En cuanto al pronóstico de los pacientes con linfoma linfoblástico, ha cambiado totalmente desde que los pacientes se tratan con pautas similares a las utilizadas en la leucemia linfoblástica aguda. Se han descrito largas supervivencias de hasta el 75% en niños. La edad > 14 años, el género femenino y la afectación del sistema nervioso central han sido referidos en algunas series como factores de mal pronóstico (194). A pesar de las mejoras en los tratamientos, un 10-20% de los pacientes presentan recidivas o enfermedad refractaria, siendo entonces el trasplante de progenitores hematopoyéticos y la inmunoterapia las opciones terapéuticas (196).

2.3.3 HISTIOCITOSIS.

Se trata de un grupo de enfermedades caracterizada por la proliferación de células dendríticas CD1a+ o CD207 langerina + en diversos tejidos. Estas células derivan de los progenitores CD34+ de la médula ósea y comparten características similares en lo que se refiere a su origen, presencia de antígenos de membrana y síntesis de citoquinas.

Su etiología no está clara. Se han analizado diferentes factores etiopatogénicos infecciosos y ambientales, con resultados poco concluyentes. No se han encontrado factores predisponentes, salvo la exposición al tabaco en las formas pulmonares aisladas de los adultos (197). Sí se ha podido demostrar que tanto las citoquinas proinflamatorias

como la proliferación clonal y las mutaciones oncogénicas juegan un papel importante (145).

En cuanto a la clínica, los niños pueden presentar una gran variedad de síntomas y signos en función de los órganos y sistemas afectados. Puede afectar a los huesos como una lesión única; a los pulmones, como una lesión solitaria; a veces se presenta como una afectación cutánea o bucal aislada o, más infrecuente, se presenta con una patología multisistémica más grave, con implicación de diferentes órganos: piel, huesos, pulmones, ganglios linfáticos, hígado, bazo, SNC, etc. Esta afectación multiorgánica conlleva una evolución más comprometida y un peor pronóstico, pudiendo tener un desenlace fatal (198, 199).

El manejo terapéutico es muy variable y depende del tipo de afectación (200):

- Los pacientes que presentan afectación en un solo órgano o sistema, sin afectación sistémica (afectación exclusiva de piel, lesión única en hueso, afectación de un solo ganglio linfático), no reciben quimioterapia.
- Los pacientes que presentan una afectación más extensa precisan de tratamiento con quimioterapia. La pauta de tratamiento depende de la clasificación según el grupo de riesgo, pero se basa fundamentalmente en la combinación de 2 fármacos, prednisona y vinblastina, en ciclos de inducción, seguidos de diferentes pautas de mantenimiento según respuesta inicial.

Dentro de las pautas de mantenimiento, los medicamentos más utilizados son la 6-mercaptopurina y el metotrexato, administrados de forma similar al tratamiento de mantenimiento de la LLA y el linfoma linfoblástico, con una duración de 6 o 12 meses según el riesgo individual. Si bien en la fase de inducción no suelen aparecer toxicidades importantes, salvo neutropenia leve, en la fase comentada de mantenimiento los principales problemas son las toxicidades hepática y medular, como sucede en la fase de mantenimiento de LLA y linfomas linfoblásticos.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

3.1 HIPÓTESIS

- Se desconoce la importancia real de la hepatotoxicidad en oncología pediátrica a pesar de ser causa de morbilidad y suspensión, modificación de dosis o modificación de intervalos de tratamientos quimioterápicos.
- Niños con el mismo tumor e igual tratamiento tienen toxicidades diferentes, lo que hace pensar en la posibilidad de que existan factores genéticos individuales que influyan en la aparición de efectos secundarios como la hepatotoxicidad.

3.2 OBJETIVOS.

3.2.1 PRINCIPAL

Determinar la posible influencia de los factores inmunogenéticos (HLA, polimorfismos de citoquinas y genotipo KIR) en la lesión hepática inducida por citostáticos en niños con enfermedades oncológicas

3.2.2 SECUNDARIOS

- Identificar el citostático responsable (clase terapéutica, dosis, tiempo de exposición), y/o asociaciones de los mismos.
- Caracterizar clínico-patológicamente la lesión hepática
- Definir el curso clínico (gravedad y tiempo de resolución) del episodio.
- Inclusión del grupo de niños oncológicos en el registro de hepatotoxicidad por drogas en la población pediátrica creado en 2008.

4. PACIENTES Y METODOLOGÍA

4. PACIENTES Y METODOLOGÍA

4.1 DISEÑO:

Se ha llevado a cabo un estudio observacional de casos y controles. Para ello se han seleccionado pacientes pediátricos, de edades comprendidas entre de 0- 14 años, diagnosticados y tratados de enfermedades malignas en la unidad de Oncología y Hematología Pediátrica del Hospital Universitario Materno Infantil Virgen de las Nieves de Granada. El periodo de recogida de datos ha sido el comprendido entre los años 2008 al 2017.

Como grupo control se incluyen niños de las mismas edades, igualmente diagnosticados y tratados de enfermedades malignas en el mismo periodo de tiempo, pero en los que no se detectó en el curso del tratamiento alteración del perfil hepático.

4.2 SUJETOS Y ÁMBITO DE ESTUDIO:

4.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Edad comprendida entre 0 y 14 años
- Tratamiento por proceso maligno
- Señales de alerta:
 - a) > 200 U/L de ALT;
 - b) > 0,6 mg/dL de bilirrubina conjugada;
 - c) > 220 U/L de AST, > 2 mg/dL de bilirrubina total y >516 U/L de isoenzima hepática de la fosfatasa alcalina (simultáneamente).
- Firma del consentimiento informado por parte de los padres o tutores, y por el propio paciente en caso de tener 12 años o más (**ANEXO IV**)

4.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- No consentimiento para la entrada en el estudio por parte de los representantes legales.
- Alteración de la función hepática previa al tratamiento quimioterápico.
- Proceso hepático viral, metabólico, autoinmune o enfermedad por depósito justificativo de la alteración del perfil hepático.
- Enfermedades no hepáticas que cursen con alteración del perfil hepático: tiroidea, insuficiencia cardiaca o infección por VIH fundamentalmente.

4.2.3 RECOGIDA DE DATOS.

En todos los casos se ha recogido información acerca de sus características demográficas, historia médica, enfermedades concurrentes y exposición a otros fármacos mediante un formulario estructurado, que incluye una investigación sobre el uso de otros fármacos o plantas medicinales consumidos en los tres meses previos a la hospitalización o consulta (**ANEXO II**)

Para cada quimioterápico se recoge información sobre:

- Fecha de inicio y final del tratamiento.
- Dosis.
- Indicación.
- Intervalo de tiempo desde el inicio de la administración del fármaco y el inicio de la alteración hepática o sintomatología.

Para descartar posibles causas alternativas, en todos los pacientes se obtiene una historia clínica detallada en lo que respecta a antecedentes de patología biliar o hepática, así como información sobre factores de riesgo asociados a enfermedad hepática.

El patrón de daño hepático y la relación cronológica entre el fármaco y el inicio del mismo se han definido de acuerdo a los criterios de la Reunión de Consenso Internacional de daño hepático inducido por fármacos (Benichou C, J Hepatol 1990):

1.- Lesión hepatocelular: incremento aislado de ALT cinco veces superior al límite de la normalidad o actividad de ALT/FA expresada en múltiplos del límite superior de la normalidad mayor a 5.

2.- Lesión colestásica: incremento aislado de FA superior a dos veces el valor normal o ALT/FA inferior a dos.

3.- Lesión mixta: ALT elevada, incremento de FA y ALT/FA mayor a dos pero inferior a cinco.

4.2.3.1 Establecimiento de causalidad:

El diagnóstico de hepatotoxicidad ha sido evaluado por el médico a cargo de los pacientes y corroborado por el médico responsable del registro. Los criterios de evaluación incluyen una secuencia temporal adecuada desde la administración del fármaco hasta el inicio de la alteración hepática, un curso clínico no coincidente con los efectos de otra enfermedad concomitante, otro fármaco u otra terapia no farmacológica; la mejoría con la retirada, disminución o espaciado temporal del fármaco y la existencia de casos previos de hepatotoxicidad descritos por el quimioterápico.

Se incluirán aquellos casos de hepatotoxicidad que cumplan los criterios clínicos y además cuya evaluación de causalidad al quimioterápico haya sido estimada como posible, probable o definida por la escala de CIOMS (**ANEXO I**). Esta escala contiene una serie de cuestiones preseleccionadas que son puntuadas según la información disponible. La puntuación total es trasladada a una de las siguientes categorías de sospecha: definida o altamente probable, probable, posible, improbable y excluida.

Con el protocolo estructurado de recogida de datos se establece la relación cronológica, las variables demográficas y se excluyen causas alternativas o concomitantes. Se ha definido el mecanismo de lesión clasificándola en intrínseca o idiosincrásica y ésta en inmunoalérgica o metabólica. También se evalúa el tiempo de resolución del cuadro tras la supresión del quimioterápico, y la respuesta a la reintroducción del mismo según cada caso.

Una vez establecido el diagnóstico de hepatotoxicidad se tomaron dos muestras de sangre de cada paciente, y se almacenaron alícuotas de suero (estudio inmunológico)

y sangre total (estudio inmunogenético) a -20°C y se remitieron al centro coordinador en Granada a través de la red de Biobanco. (**ANEXO III**). En el centro coordinador se procesaron las muestras y se realizaron las siguientes determinaciones genéticas:

1. Tipificación HLA: en las muestras recogidas se analizan los loci:

- HLA clase I: HLA-A*, B* y C*.
- HLA-clase II: HLA-DRB1*, DQB1*, DQA1* y DP.

Para el genotipado se utiliza el kit LABType™ SSO (One Lambda, Inc. Canoga Park CA) que utiliza la tecnología Lumine x™ x MAP™. Luminex es un sistema de reacción en cadena de polimerasa reversa de secuencias específicas con oligonucleótidos (PCR-SSO) que implica la amplificación de regiones específicas dentro del CMH I o II con grupos de cebados (primers) específicos, seguidos por un proceso de sondeo del ADN amplificado con esferas de Luminex cubiertas con probes de oligonucleótidos específicos de secuencia para identificar la presencia o ausencia de alelos específicos. La asignación del tipo HLA se basa en la reacción patrón observado y se compara con diferentes patrones conocidos.

2. Tipaje KIR: se realiza el genotipado de 14 genes (inhibidores: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2 y 3DL3; activadores: 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5 y 3DS1) y 2 pseudogenes KIR en todos los sujetos reclutados usando el kit de genotipado KIR SSO (One Lambda, Inc. Canoga Park CA) que utiliza la tecnología Lumine x™ descrita previamente. Se amplifican por PCR los exones 3, 4, 5, 7, 8 y 9 del cromosoma 19. La asignación de genotipos se basa en la reacción con patrones de secuencias de genes KIR publicadas.

3. Identificación y análisis de los polimorfismos genéticos de las citoquina IL-10, TNF- α , TGF- β 1, IL-6 y IFN- γ . Inicialmente se extrae el ADN de las muestras de sangre total recogidas en EDTA utilizando el Kit High Pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania). Posteriormente los polimorfismos genéticos de las citoquinas fueron analizados utilizando la bandeja de genotipificación de citoquinas de One Lambda (Cytokine Genotyping Tray) por PCR-SSP (PCR-Sequence Specific Priming) siguiendo el protocolo del fabricante. Los fragmentos de ADN amplificados son separados por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan por tinción con bromuro de etidio y exposición a la luz ultravioleta. La interpretación de los resultados de PCR-SSP se basa en la presencia o ausencia de un fragmento de ADN amplificado específico. Los polimorfismos estudiados son: - TNF - α (-308G / A). - TGF - β 1 (-10T / A; 25C / G). - IL10 (-1082G / A; -819T / C; -592 C / A. - IL6 (-174G / C). - IFN- γ (+ 874T / A). Todos los análisis se llevan a cabo en la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (ibs GRANADA).

5. VARIABLES DEL ESTUDIO. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.1 VARIABLES DEL ESTUDIO:

1. Quimioterápico responsable del daño hepático.
2. Caracterización clínica del DILI: total de días de consumo del tóxico y días desde el comienzo de exposición al tóxico hasta el inicio de los síntomas.
3. Duración del daño hepático: Daño agudo definido como alteración de la bioquímica hepática secundariamente al consumo del fármaco durante un periodo inferior a 6 meses y daño crónico definido como alteración de la misma durante un periodo superior a 6 meses.
4. Tipo de daño hepatotóxico: Este será definido como hepatocelular, colestásico o mixto dependiendo de los valores del cociente entre el valor de la fosfatasa alcalina y la ALT.
5. Gravedad de la hepatotoxicidad: Definida como: daño fulminante (según criterios de consenso); daño grave (pacientes con ictericia y tiempo de protrombina < 50%); daño no grave (pacientes que no cumplen criterios de daño grave) y pacientes trasplantados.
6. Genotipo HLA
7. Genotipo KIR.
8. Polimorfismo de los genes que codifican la IL-10, IL-6, TGF- β , TNF- α y IFN- γ

5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La gestión y análisis de los datos se ha realizado con el programa SPSS 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Las variables cualitativas se expresan como números absolutos en porcentajes, y como valores medios \pm DS las cuantitativas.

- Técnicas de Estadística Descriptiva: distribución de frecuencias y porcentaje para las variables cualitativas y estadísticos de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas (media).
- Técnicas de Estadística Inferencial: el criterio para considerar la existencia de significación estadística fue un valor de $P \leq 0.05$ y se fija el intervalo de confianza en el 95%.

Como test de asociación se utilizaron el “test de chi-cuadrado” o el “test exacto de Fisher” cuando se esperaba que alguno de los valores fuese menor de 5 (variables cualitativas). El efecto independiente de cada factor se determinó usando un modelo de regresión logística. La fuerza de la asociación se determina con el cálculo de la Odds Ratio. Las variables dependientes en este estudio fueron **HTX / No-HTX**.

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

6.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS:

El presente estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con la última versión de la Declaración de Helsinki.

Todos los casos y controles han firmado el consentimiento informado para la donación de muestras a la red de BIOBANCO (**ANEXO IV**).

6.2. CONFIDENCIALIDAD DE DATOS:

En todas las fases del estudio se respetó lo establecido por la Ley de Protección de Datos. Se ha mantenido la confidencialidad de todos los datos de carácter personal, quedando anonimizados en la base de datos central, que, además, está protegida por una contraseña que sólo es conocida por el personal autorizado implicado en el estudio.

7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

Se estudian un total de 22 pacientes que cumplen los criterios de inclusión descritos previamente y recogidos en el Registro Español de Hepatotoxicidad por fármacos y productos de herboristería en la Población Pediátrica

Como muestra control se incluyen 24 niños, igualmente diagnosticados y tratados de enfermedades maligna, pero en los que no se detectó ningún episodio de hepatotoxicidad.

7.1. DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS DEL GRUPO CASOS.

Se incluyó en el estudio como casos a un total de 22 enfermos.

Las principales características epidemiológicas y clínicas se recogen en la siguiente tabla:

Caso	Sexo	Edad	Diagnóstico	Nº episodio	Fase tratamiento	Citostático	ALT U/L	AST U/L	FA	BR mg/dl	Tipo de daño
1	varón	5	LLA	1	Consolidación	MTX	564	76	250	1,3	hepatotóxico
1	varón	5	LLA	2	Mantenimiento	MTX	228	78	240	0,5	hepatotóxico
1	varón	5	LLA	3	Mantenimiento	MTX	357	155	252	0,5	hepatotóxico
1	varón	5	LLA	4	Mantenimiento	MTX	270	126	240	0,8	hepatotóxico
1	varón	5	LLA	5	Mantenimiento	MTX	237	178	256	0,9	hepatotóxico
2	varón	4	LLA	1	Consolidación	MTX	1488	929	74	2,5	hepatotóxico
2	varón	3	LLA	2	Consolidación	MTX	506	196	181	1,3	hepatotóxico
2	varón	3	LLA	3	Mantenimiento	MTX	281	86	240	0,5	hepatotóxico
3	varón	3	LLA	1	Mantenimiento	6-MP	379	81	217	0,5	hepatotóxico
3	varón	3	LLA	2	Mantenimiento	6-MP	315	105	180	0,6	hepatotóxico
4	varón	5	LLA	1	Mantenimiento	MTX + 6-MP	293	71	244	0,8	hepatotóxico
4	varón	5	LLA	2	Mantenimiento	MTX + 6-MP	326	79	178	0,6	hepatotóxico
4	varón	5	LLA	3	Mantenimiento	MTX + 6-MP	355	88	156	0,7	hepatotóxico
5	mujer	3	LLA	1	Inducción B	6-MP	628	144	115	2	hepatotóxico
5	mujer	3	LLA	2	Inducción B	6-MP	210	137	342	2,5	mixto
5	mujer	3	LLA	3	Mantenimiento	6-MP	239	95	347	2,6	hepatotóxico
5	mujer	3	LLA	4	Mantenimiento	6-MP	337	140	269	0,5	hepatotóxico
6	mujer	4	LLA	1	Consolidación	MTX	981	770	135	1,2	hepatotóxico
6	mujer	4	LLA	2	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	596	115	304	0,6	hepatotóxico
6	mujer	4	LLA	3	Mantenimiento	MTX + 6-MP	447	107	338	0,7	hepatotóxico
6	mujer	4	LLA	4	Mantenimiento	MTX + 6-MP	303	140		0,7	hepatotóxico
7	varón	7	LLA	1	Intensificación AR-2	Peg-asf	228	139	363	0,5	mixto
7	varón	7	LLA	2	Reinducción R-1	Tioguanina	466	182	270	0,6	hepatotóxico
7	varón	7	LLA	3	Reinducción R-2	Tioguanina	487	191	170	0,7	hepatotóxico
7	varón	7	LLA	4	Reinducción R-3	Tioguanina	499	224	248	0,8	hepatotóxico
7	varón	7	LLA	5	Mantenimiento	6-MP	466	182		0,8	hepatotóxico
7	varón	7	LLA	6	Mantenimiento	6-MP	386	310		0,8	hepatotóxico
7	varón	7	LLA	7	Mantenimiento	6-MP	396	125		0,4	hepatotóxico
7	varón	7	LLA	8	Mantenimiento	6-MP	974	224	227	0,8	hepatotóxico
7	varón	7	LLA	9	Mantenimiento	6-MP	899	170	332	0,7	hepatotóxico
7	varón	7	LLA	10	Mantenimiento	6-MP	432	136	382	0,8	hepatotóxico

Tabla 10: características epidemiológicas y clínicas de los casos

(Continuación)

8	mujer	5	LLA	1	Mantenimiento	MTX + 6-MP	268	97	215	0,7	hepatotóxico
8	mujer	5	LLA	2	Mantenimiento	MTX + 6-MP	634	204	230	0,52	hepatotóxico
8	mujer	5	LLA	3	Mantenimiento	MTX + 6-MP	1295	507	174	0,87	hepatotóxico
9	varón	4	LLA	1	Mantenimiento	MTX + 6-MP	397	253	211	0,54	hepatotóxico
9	varón	4	LLA	2	Mantenimiento	MTX + 6-MP	498	107	150	0,4	hepatotóxico
10	mujer	5	LLA	1	Inducción B	6-MP	487	176	74	1,24	hepatotóxico
10	mujer	5	LLA	2	Inducción B	6-MP	545	322	160	1,91	hepatotóxico
10	mujer	5	LLA	3	Reinducción B	Tioguanina	554	284	350	1,3	hepatotóxico
10	mujer	5	LLA	4	Mantenimiento	6-MP	183	107	359	3,47	mixto
11	varón	1	LLA	1	Mantenimiento	MTX + 6-MP	432	164	190	0,4	hepatotóxico
11	varón	1	LLA	2	Mantenimiento	MTX + 6-MP	289	78	228	0,9	hepatotóxico
11	varón	1	LLA	3	Mantenimiento	MTX + 6-MP	299	115		0,7	hepatotóxico
12	varón	5	LLA	1	Consolidación	MTX	928	622	122	0,8	hepatotóxico
12	varón	5	LLA	2	Consolidación	MTX	702	579	137	0,8	hepatotóxico
12	varón	5	LLA	3	Intensificación 4º bloque	MTX	582	120	150	1,7	hepatotóxico
12	varón	5	LLA	4	Mantenimiento	MTX	380	170	232	1,1	hepatotóxico
12	varón	5	LLA	5	Mantenimiento	MTX	396	80		0,6	hepatotóxico
13	mujer	3	LLA	1	Inducción B	6-MP	1184	776	72	1,65	hepatotóxico
13	mujer	3	LLA	2	Inducción B	6-MP	717	680	89	1	hepatotóxico
13	mujer	3	LLA	3	Mantenimiento	6-MP	596	481	245	0,9	hepatotóxico
13	mujer	3	LLA	4	Mantenimiento	6-MP	1240	463	120	1,01	hepatotóxico
13	mujer	3	LLA	5	Mantenimiento	6-MP	640	136	207	0,87	hepatotóxico
13	mujer	3	LLA	6	Mantenimiento	6-MP	599	152	213	0,97	hepatotóxico
14	mujer	12	LLA	1	Consolidación	MTX	322	135	70	1,1	hepatotóxico
14	mujer	12	LLA	2	Intensificación 4º bloque	MTX	337	143	92	0,7	hepatotóxico
14	mujer	12	LLA	3	Mantenimiento	MTX	331	114	73	0,7	hepatotóxico
14	mujer	12	LLA	4	Mantenimiento	MTX	333	93		0,8	hepatotóxico
15	varón	5	LLA	1	Inducción	Asp	123	43	400	2,5	mixto
15	varón	5	LLA	2	Intensificación	ASP	148	68	395	2,5	mixto
15	varón	5	LLA	3	Mantenimiento	MTX + 6-MP	605	138		0,9	hepatotóxico
15	varón	5	LLA	4	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	604	137	321	0,6	hepatotóxico
15	varón	5	LLA	5	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	277	107	307	0,8	hepatotóxico
15	varón	5	LLA	6	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	353	105	402	0,9	hepatotóxico
15	varón	5	LLA	7	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	346	98	312	0,6	hepatotóxico
16	mujer	9	LLA	1	Reinducción B	Tioguanina	251	111	168	1,2	hepatotóxico
16	mujer	9	LLA	2	Mantenimiento	MTX	370	107	280	0,6	hepatotóxico
16	mujer	9	LLA	3	Mantenimiento	MTX	485	166	230	0,9	hepatotóxico
16	mujer	9	LLA	4	Mantenimiento	MTX	431	112	296	0,6	hepatotóxico
16	mujer	9	LLA	5	Mantenimiento	MTX	427	166		0,6	hepatotóxico
17	varón	6	LLA	1	Consolidación	MTX	280	139	80	0,4	hepatotóxico
17	varón	6	LLA	2	Intensificación 4º bloque	MTX	1050	400	350	3	hepatotóxico
17	varón	6	LLA	3	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	345	250		0,9	hepatotóxico
17	varón	6	LLA	4	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	290	155	298	0,7	hepatotóxico

(Continuación)

18	varón	5	LLA	1	Inducción B	6-MP	355	177	334	0,79	hepatotóxico
18	varón	5	LLA	2	Inducción B	6-MP	276	157		0,49	hepatotóxico
18	varón	5	LLA	3	Mantenimiento	6-MP	527	123	330	1,3	hepatotóxico
18	varón	5	LLA	4	Mantenimiento	6-MP	1035	535	239	0,9	hepatotóxico
18	varón	5	LLA	5	Mantenimiento	6-MP	684	337	217	1,23	hepatotóxico
18	varón	5	LLA	6	Mantenimiento	6-MP	831	225	334	1,89	hepatotóxico
19	varón	3	Linfoma linfoblástico	1	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	361	186	347	1,2	hepatotóxico
19	varón	3	Linfoma linfoblástico	2	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	239	155	383	1,8	mixto
19	varón	3	Linfoma linfoblástico	3	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	255	165	387	2	mixto
19	varón	3	Linfoma linfoblástico	4	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	288	200	399	1,7	hepatotóxico
19	varón	3	Linfoma linfoblástico	5	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	340	188	345	1,5	hepatotóxico
19	varón	3	Linfoma linfoblástico	6	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	257	142	356	1,5	hepatotóxico
19	varón	3	Linfoma linfoblástico	7	Mantenimiento	MTX+ 6-MP	239	145	383	0,9	mixto
20	varón	5	LLA	1	Inducción B	6-MP	383	210	270	1,27	hepatotóxico
20	varón	5	LLA	2	Inducción B	6-MP	330	225		1,3	hepatotóxico
20	varón	5	LLA	3	Mantenimiento	6-MP	383	227	290	1,6	hepatotóxico
20	varón	5	LLA	4	Mantenimiento	6-MP	320	210		1,6	hepatotóxico
21	varón	13	Linfoma linfoblástico	1	Reinducción B	Tioguanina	654	246	63	0,68	hepatotóxico
21	varón	13	Linfoma linfoblástico	2	Reinducción B	Tioguanina	358	143		0,5	hepatotóxico
21	varón	13	Linfoma linfoblástico	3	Mantenimiento	MTX + 6-MP	365	178	117	0,3	hepatotóxico
21	varón	13	Linfoma linfoblástico	4	Mantenimiento	MTX + 6-MP	320	150	144	0,4	hepatotóxico
22	varón	8	Histiocitosis	1	Mantenimiento	MTX + 6-MP	603	418	250	1	hepatotóxico
22	varón	8	Histiocitosis	2	Mantenimiento	MTX + 6-MP	340	210	240	0,8	hepatotóxico
22	varón	8	Histiocitosis	3	Mantenimiento	MTX + 6-MP	366	264		0,8	hepatotóxico

Tabla 10: características epidemiológicas y clínicas de los casos

7.1.1 SEXO

De los 22 casos, 7 fueron mujeres (30%), y 15 varones (68%).

7.1.2 EDAD

La edad media de los casos es de 5,4 años, con un máximo de 13 años y un mínimo de 1 año

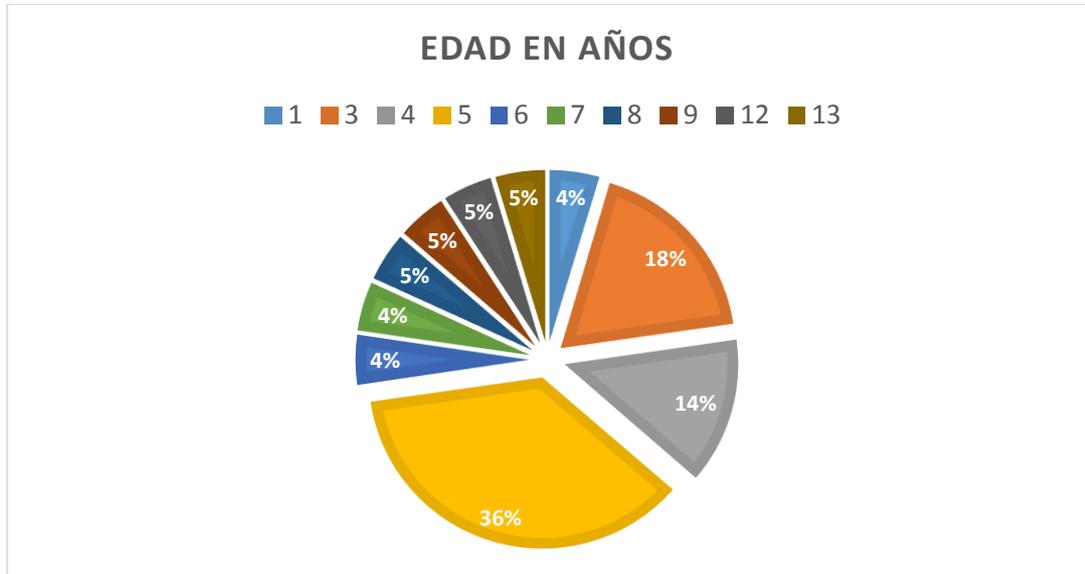


Figura 14: edad del grupo de estudio

7.1.3 Diagnóstico principal.

La enfermedad de base por la que estaban recibiendo tratamiento los casos se muestra en la figura 15:

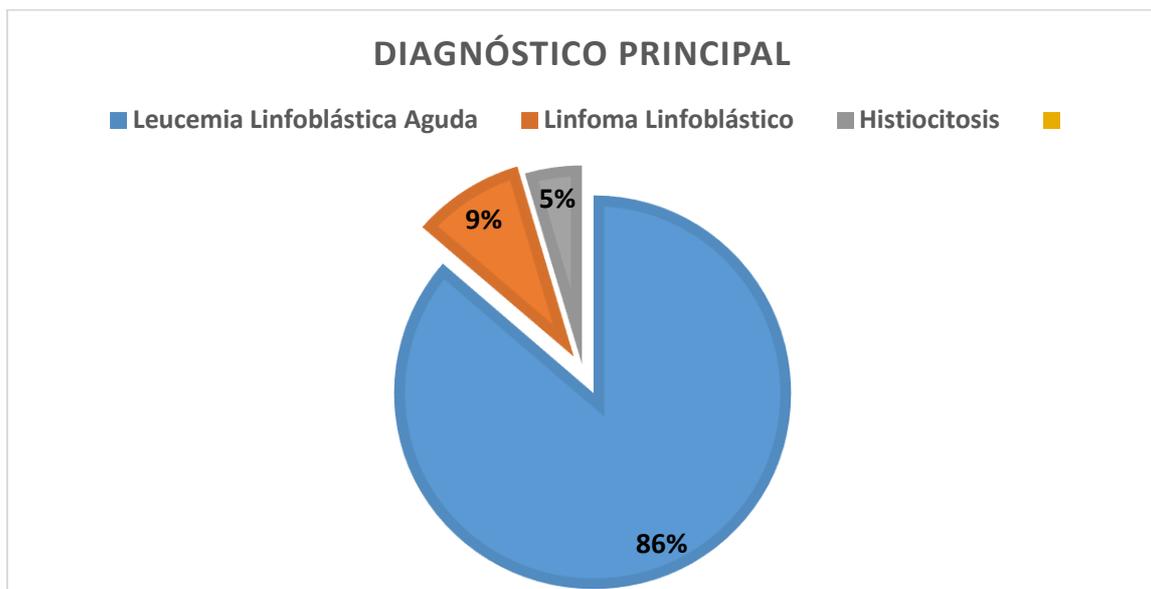


Figura 15: diagnóstico principal

7.1.4 NÚMERO DE EPISODIOS DE HEPATOTOXICIDAD.

Todos los niños tuvieron más de un episodio de hipertransaminasemia. En total, se analizan 98 episodios de hepatotoxicidad. La media por paciente es de 4,4 episodios, con un máximo de 10 y un mínimo de 2 episodios por paciente. Los resultados se muestran en la siguiente figura:

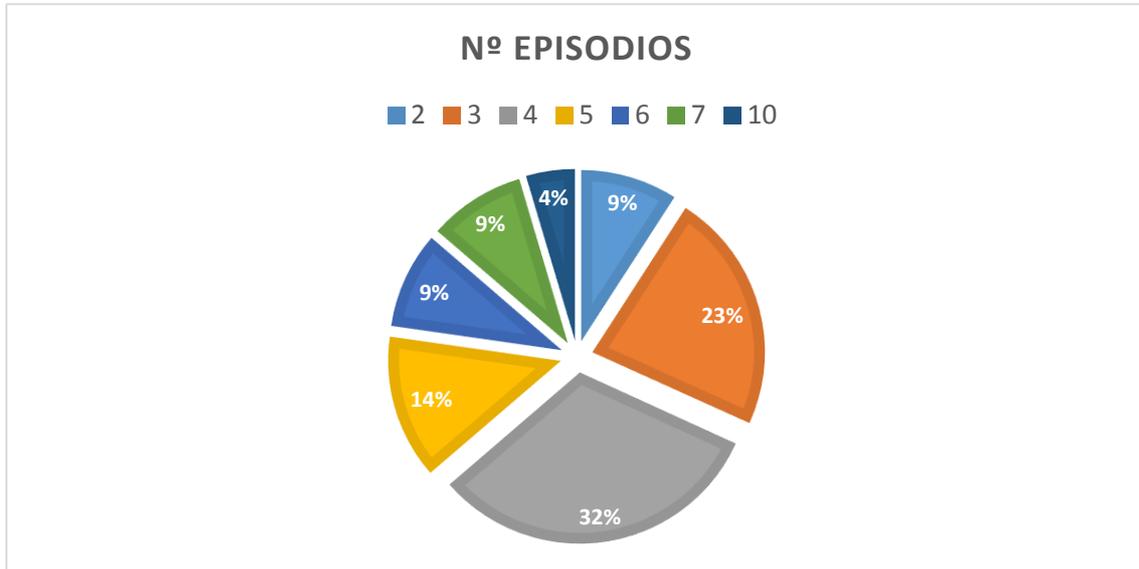


Figura 16: número de episodios de hepatotoxicidad por caso

7.1.5 FASE DEL TRATAMIENTO.

En la figura 17 se muestra la fase del tratamiento en la que tiene lugar el episodio de hepatotoxicidad:

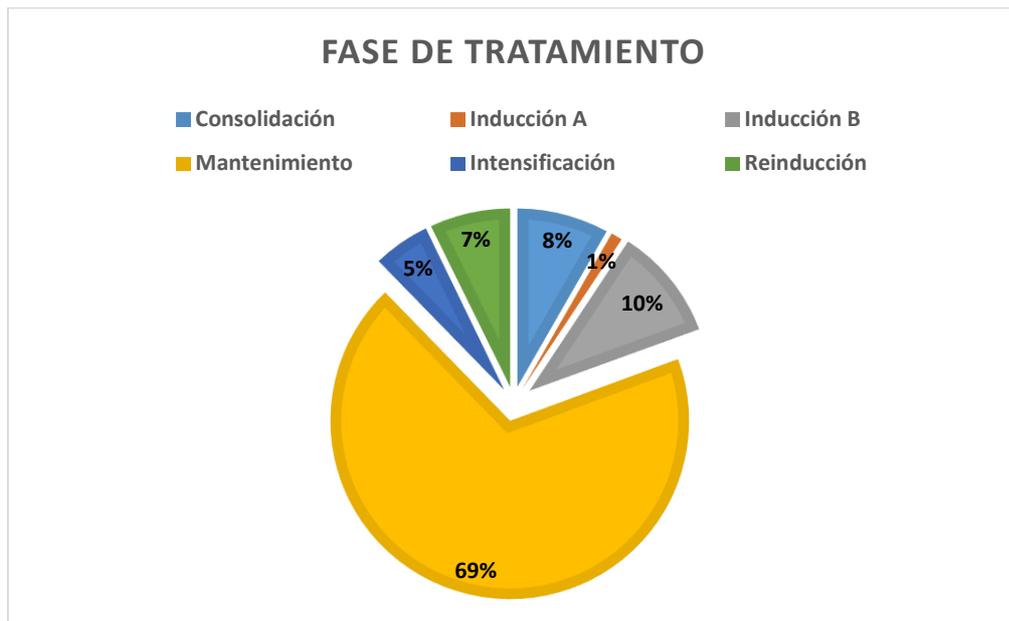


Figura 17: fases del tratamiento en los episodios de hepatotoxicidad

7.1.6 QUIMIOTERÁPICO ATRIBUIDO A LA HEPATOTOXICIDAD.

En la figura 18 se representa el fármaco o combinación de fármacos implicados en la aparición de la hepatotoxicidad:

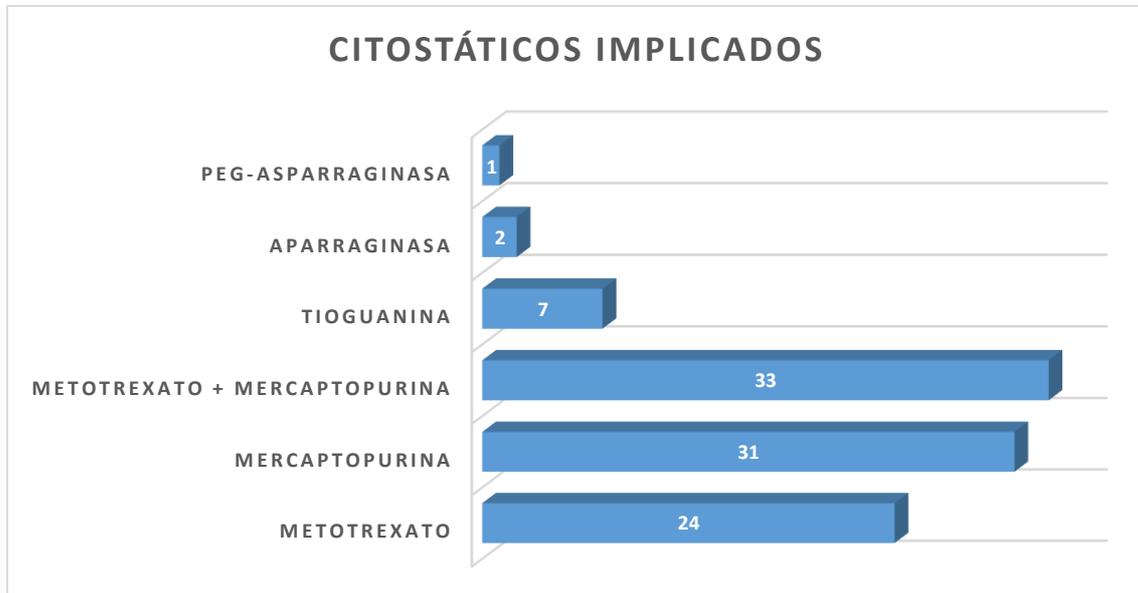


Figura 18: Fármacos implicados en los episodios de hepatotoxicidad

6- mercaptopurina y metotrexato han sido los fármacos más implicados en los episodios de hepatotoxicidad, bien administrados de forma aislada (mercaptopurina 31% y metotrexato 24 % de los episodios) o bien de forma combinada (33% de los episodios).

7.1.7 SÍNTOMAS.

La clínica más frecuente acompañante al aumento de transaminasas fue el dolor abdominal y la hiporexia. Los resultados se muestran en la siguiente figura:

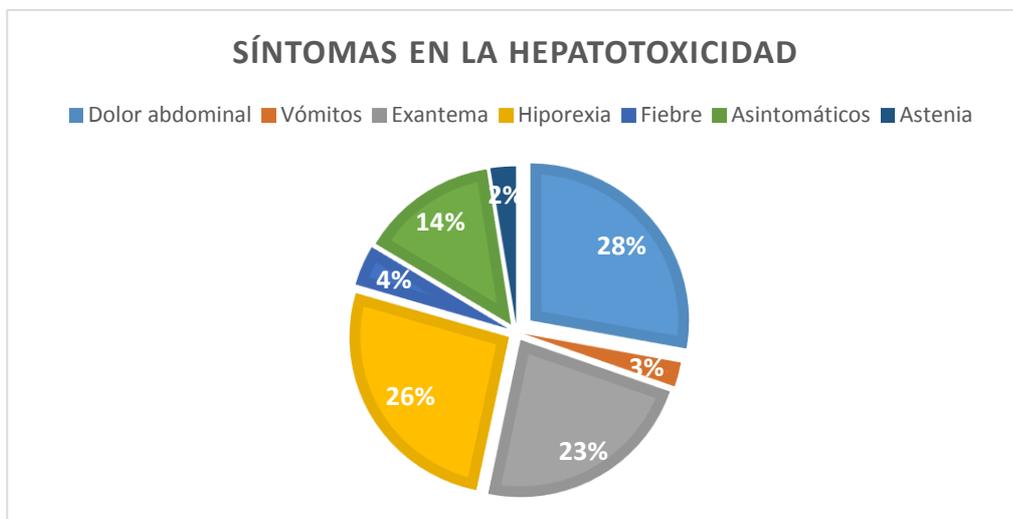


Figura 19: Sintomatología acompañante de los episodios de hepatotoxicidad

7.1.8 FUNCIÓN HEPÁTICA.

Las figuras 20 a 23 muestran las principales alteraciones en los parámetros hepáticos. Los valores medios de AST fueron de 208,72 U/l (43-929), los de ALT 471,8 U/l (123-1.488), FA 240,72 U/l (63-402), GGT 54,75 U/l (10-220) y bilirrubina 1,04mg/dl (0,3-3,47).

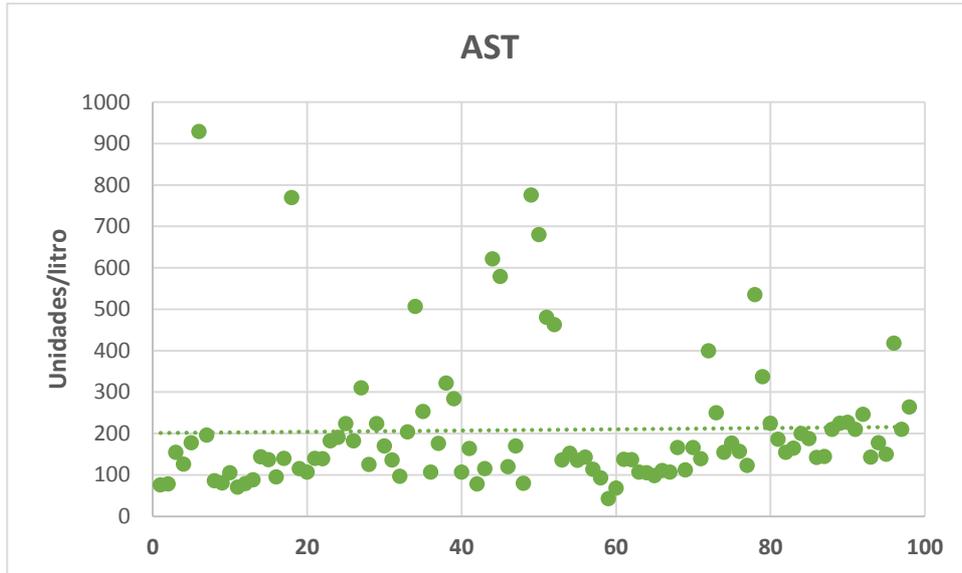


Figura 20: valores de AST en U/L

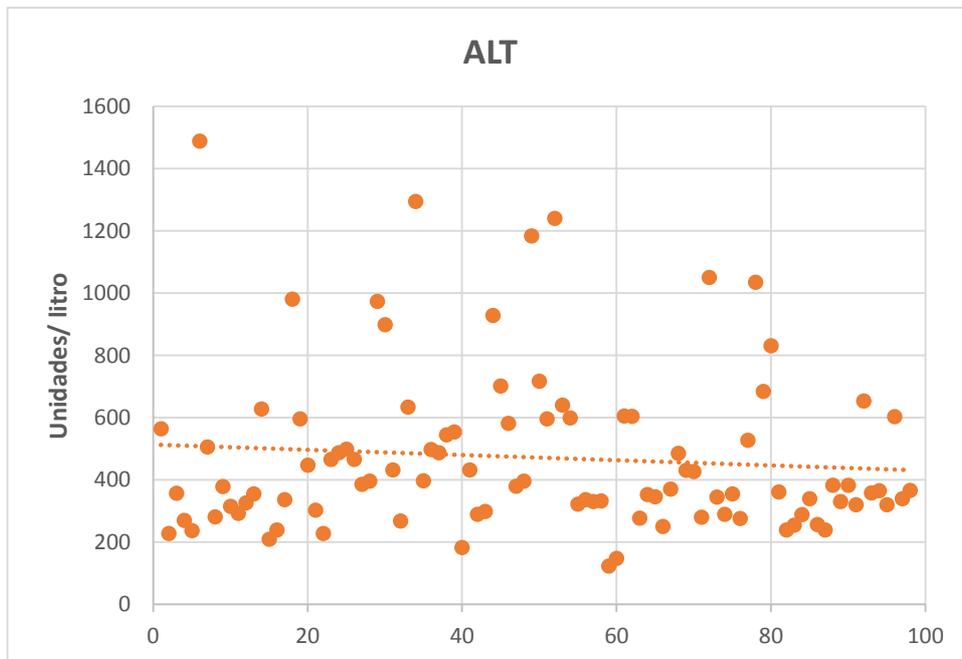


Figura 21: valores de ALT en U/L

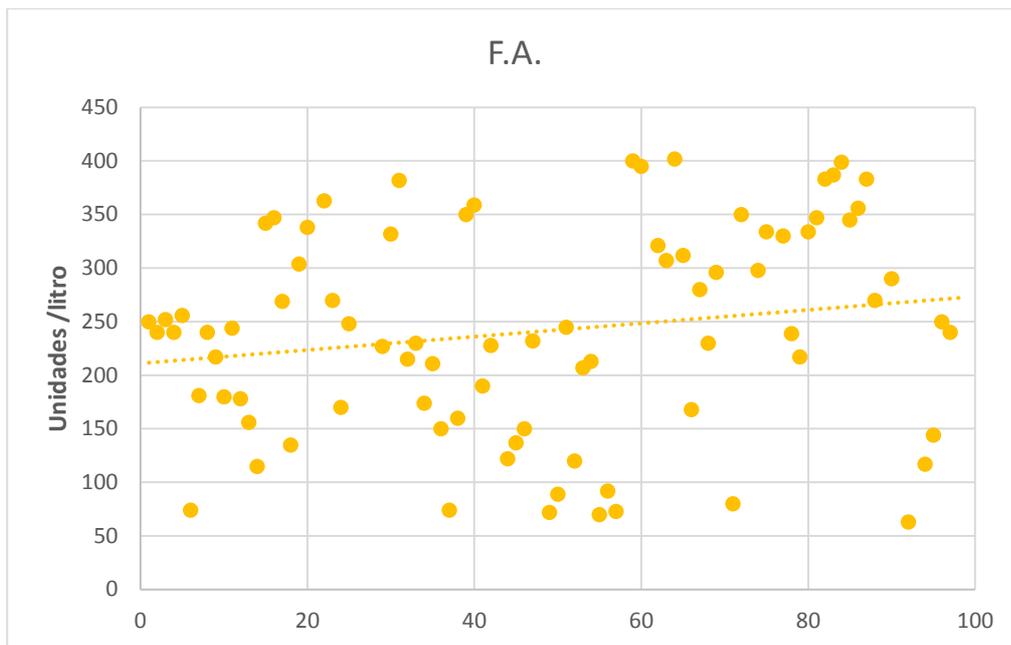


Figura 22: valores de Fosfatasa Alcalina en U/L

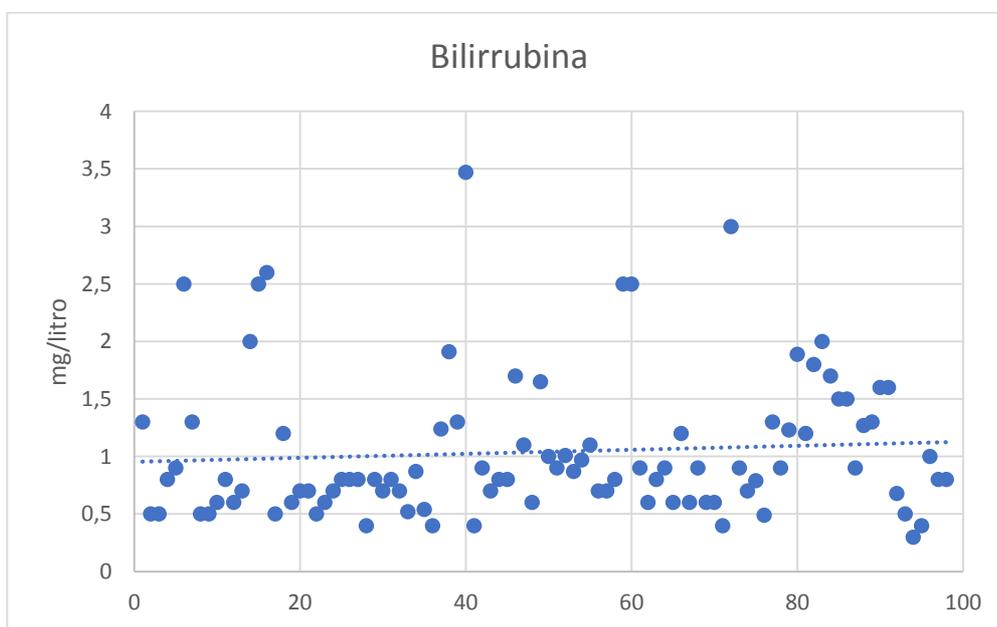


Figura 23: valores de bilirrubina total (mg/dl)

7.1.9 TIPO DE DAÑO HEPÁTICO.

El patrón de lesión predominante, basado en el valor R (*cociente ALT/FA*) se muestra en la figura 24. No hubo ningún episodio colestásico.

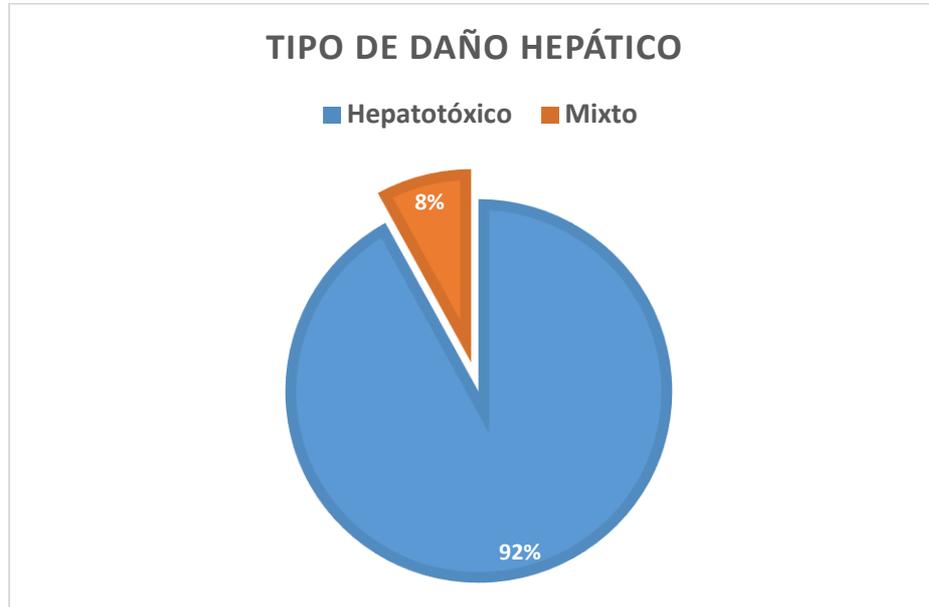


Figura 24: tipo de daño hepático

7.1.10 TIEMPO DE DETECCIÓN DE LA HEPATOTOXICIDAD.

El tiempo desde el inicio de la toma del medicamento y la detección de la hepatotoxicidad fue muy variable y dependiente del médico a cargo del paciente, con una media de 37,52 días. Los hallazgos se muestran en la siguiente figura:

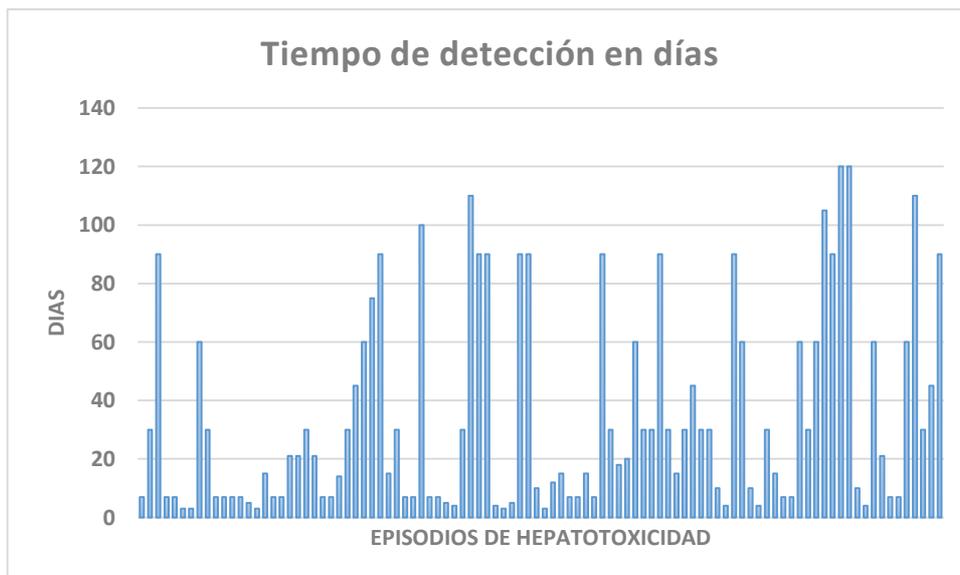


Figura 25: tiempo en días de detección de la hepatotoxicidad

El tiempo de resolución de las alteraciones analíticas tras suspensión del citostático, cuando esta suspensión tuvo lugar, osciló entre un mínimo de 7 días y un máximo de 31 días, siendo el tiempo medio de resolución de 11,7 días.

7.1.11 ATRIBUCIÓN DE CAUSALIDAD.

Los resultados tras evaluar la causalidad según la escala de CIOMS se muestran en la figura siguiente:

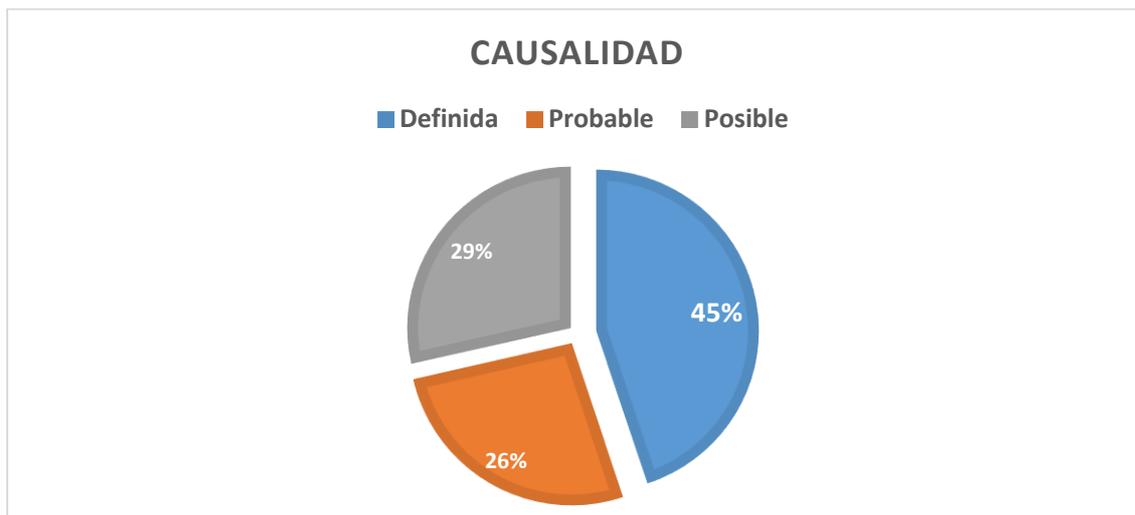


Figura 26: Atribución de causalidad según escala CIOMS

7.1.12 GRAVEDAD DEL DAÑO HEPÁTICO.

En cuanto a la gravedad, solo 2 de los episodios presentaron coagulopatía y, por tanto, fueron calificados de graves según criterios de consenso. La siguiente tabla muestra las características principales de los 2 episodios catalogados como graves.

CASO	ENFERMEDAD BASE	Nº EPISODIO	Fase	CITOSTÁTICO	ALT máxima U/L	F.A máxima u/l	Bilirrubina mg/dl	PROTROMBINA
2	LLA	1º	1er bloque Consolidación	MTX 5g/m ² en 24 horas	1488	74	2,5	Actividad 40% INR 1,8
17	LLA	2º	4º bloque Intensificación	MTX 5g/m ² en 4 horas	1050	350	3	Actividad 45% INR 1,7

Tabla 11.1: características de los casos graves.

Ambos casos estuvieron asociados a la administración de metotrexato a dosis altas, en el primer caso en infusión de 24 horas y en el segundo a la misma dosis pero en infusión de 4 horas. La detección de estos casos fue más precoz que en los casos no graves. Los síntomas asociados a estos episodios fueron la aparición de exantema cutáneo y fiebre en el primer caso, y fiebre en el segundo. Ambos casos se acompañaron de toxicidad medular moderada, y uno de ellos de insuficiencia renal transitoria. La evolución en ambos casos fue favorable, aunque los pacientes requirieron ingreso prolongado y sufrieron retrasos en sus tratamientos.

Caso	Detección (días)	Resolución (días)	Síntomas	Otras alteraciones
2	3	15	Exantema cutáneo, fiebre	Aplasia medular, insuficiencia renal
17	4	7	Fiebre	Aplasia medular

Tabla 11.2: características de los casos graves

7.1.13 PRUEBAS DE IMAGEN.

Se realizó ecografía abdominal, una vez finalizado el tratamiento, en 18 pacientes; 3 presentaron patrón de esteatosis grasa, 2 pacientes presentaron hepatomegalia y el resto de las ecografías no mostraron hallazgos patológicos. No se realizó biopsia hepática en ningún paciente.

7.1.14 CONSECUENCIAS DE LA HEPATOROXICIDAD EN EL TRATAMIENTO.

Con respecto a las consecuencias de la hepatotoxicidad en el tratamiento, éstas fueron muy variables y dependientes del médico a cargo de cada paciente. Las principales fueron la suspensión temporal del tratamiento (45% de los pacientes), la reducción de la dosis del citostático implicado en los siguientes ciclos (85%), retrasos en la administración de los siguientes ciclos, o bien el mantenimiento de una actitud expectante, sin suspensión de tratamiento ni cambios de dosis, lo cual ocurrió en un porcentaje muy pequeño de los episodios (6 %).

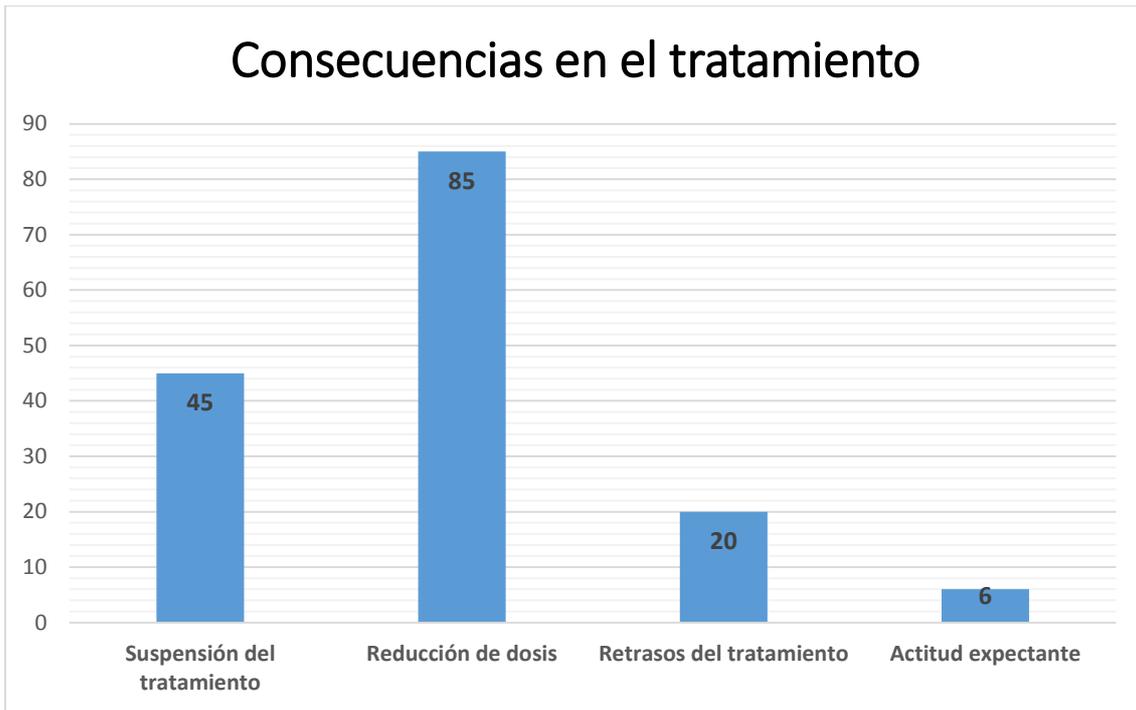


Figura 27: consecuencias de los episodios de hepatotoxicidad en el tratamiento

7.2 CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO CONTROL.

El grupo control está constituido por 24 niños de edades comprendidas entre de 0- 14 años, diagnosticados y tratados de enfermedades malignas en la unidad de Oncología y Hematología Pediátrica del Hospital Universitario Materno Infantil Virgen de las Nieves de Granada, y que durante el tratamiento no han presentado ningún episodio de hepatotoxicidad.

Control	Sexo	Edad	Diagnóstico
1	Varón	12	LLA
2	Varón	8	LLA
3	Varón	7	Histiocitosis
4	Mujer	7	LLA
5	Varón	4	LLA
6	Mujer	7	LLA
7	Mujer	12	LLA
8	Varón	12	Linfoma Linfoblástico
9	Mujer	5	LLA
10	Mujer	2	Histiocitosis
11	Varón	2	LLA
12	Mujer	7	LLA
13	Varón	3	LLA
14	Varón	8	LLA
15	Varón	5	LLA
16	Varón	1	Linfoma Linfoblástico
17	Mujer	10	Histiocitosis
18	Varón	12	LLA
19	Mujer	4	LLA
20	Varón	5	LLA
21	Mujer	3	LLA
22	Varón	6	LLA
23	Varón	5	LLA
24	Mujer	4	LLA

Tabla 12: Características epidemiológicas de los controles.

7.3 ESTUDIO HLA.

7.3.1 ESTUDIO EN EL TOTAL DE LA MUESTRA

- HLA CLASE I

- HLA-A:

En nuestra muestra de 46 pacientes detectamos 23 alelos HLA-A (n=44 pacientes, hay dos que no amplifican el alelo). El más abundante en nuestra población es el **A0201** (41%), seguido del **A0101** (32%), y **A0301**; A2402; A2902 (n=14%). Todos los demás están por debajo del 8%

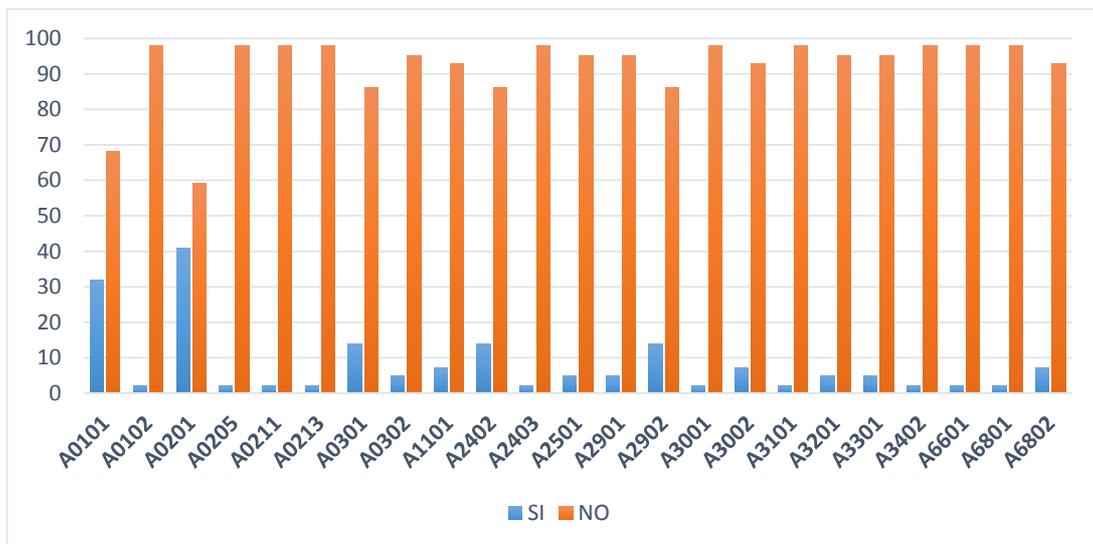


Figura 28: distribución de los HLA-A en el total de la muestra

- HLA-B:

Se detectan 36 alelos HLA-B, que aparecen en porcentajes muy bajos. El más frecuente es el B0801, que aparece en un 28%, seguido del B5101 en un 23%.

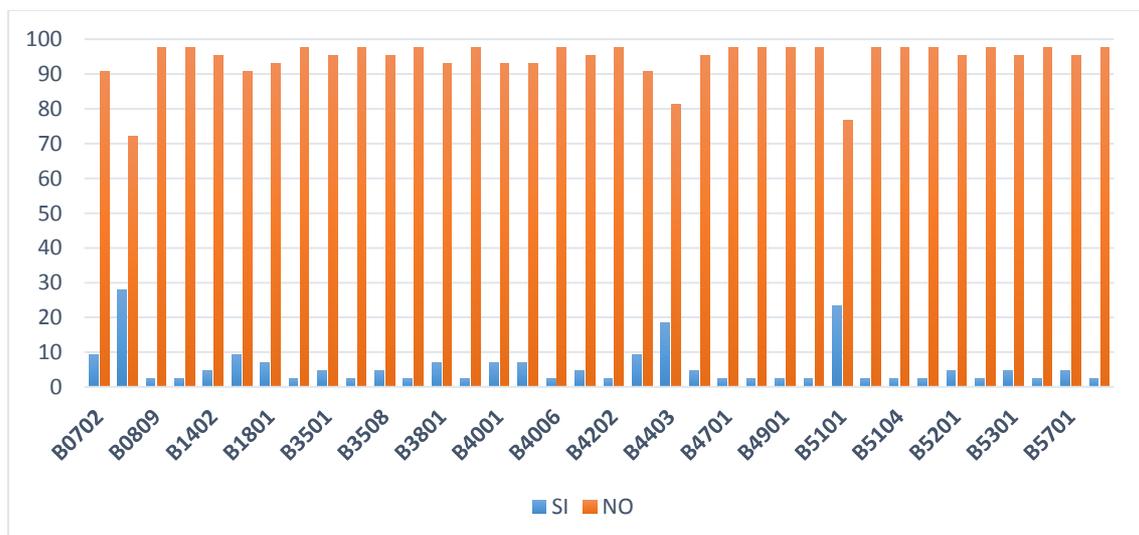


Figura 29: distribución de los HLA-B en el total de la muestra

- **HLA-C:**

Se detectan 20 alelos, siendo el más frecuente el C0701 en un 26% de los niños estudiados. Los restantes aparecen en menos del 20% de la población total.

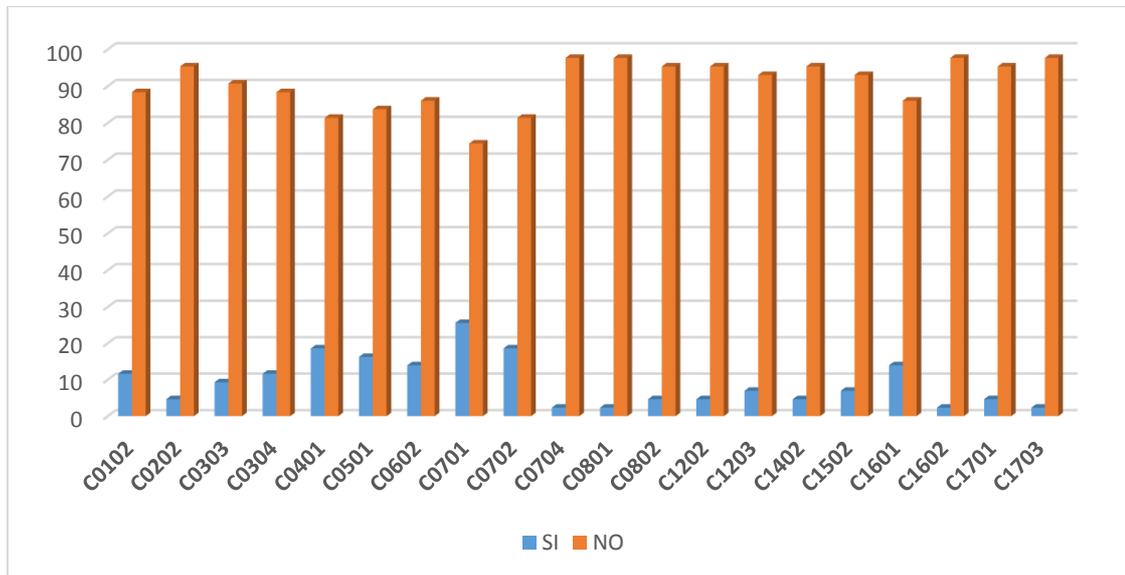


Figura 30: distribución de los HLA-c en el total de la muestra

• **HLA CLASE II:**

- **HLA-DRB:**

Se detectan 25 alelos. Los más frecuentes son DRB*0301 (33%), DRB*0701 (27%) y DRB*1301 (27%).

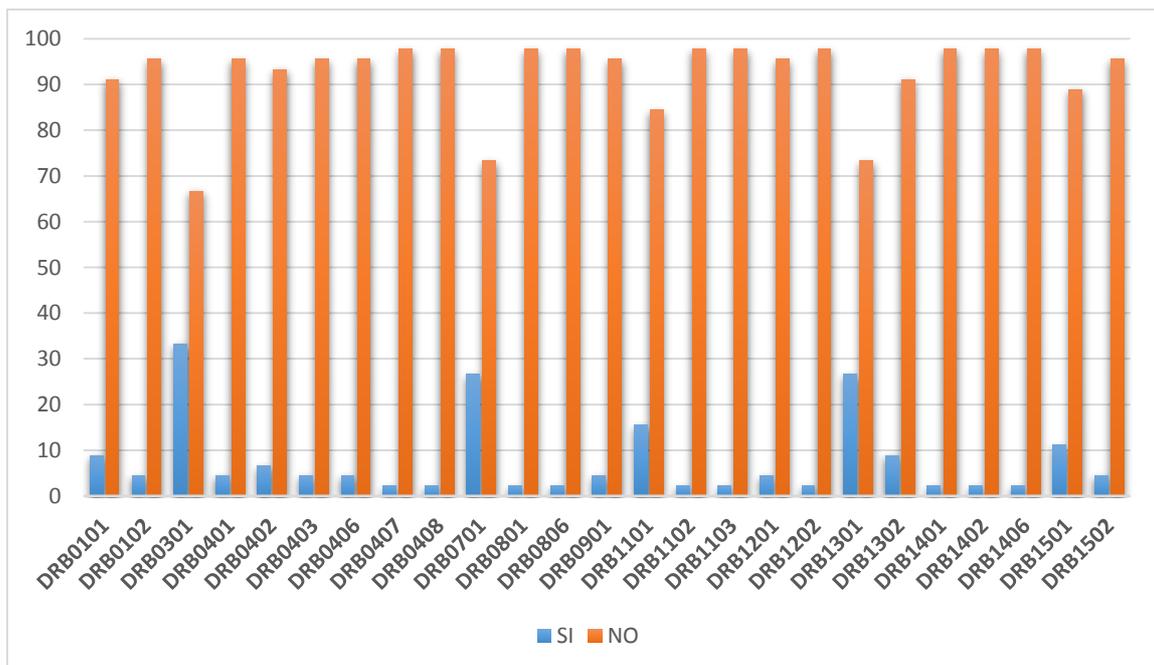


Figura 31: distribución de los HLA-DRB en el total de la muestra

- HLA-DQA:

Se detectan 14 alelos. Los más frecuentes son DQA*0501 (33%), DQA*0103 (29%) y DQA*0201 y DQA*0505 (24% respectivamente).

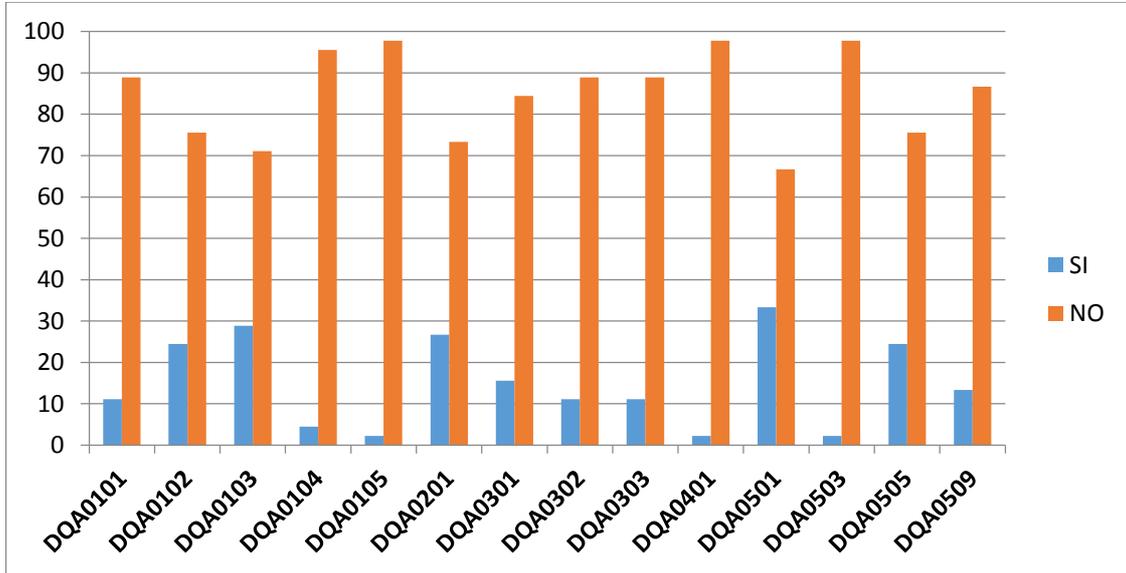


Figura 32: distribución de los HLA-DQA en el total de la muestra

-HLA-DQB:

Se describen un total de 15 alelos, siendo los más frecuentes el DQB*0201 (31%), DQB*0301 (29%) y DQB*0202 (24%).

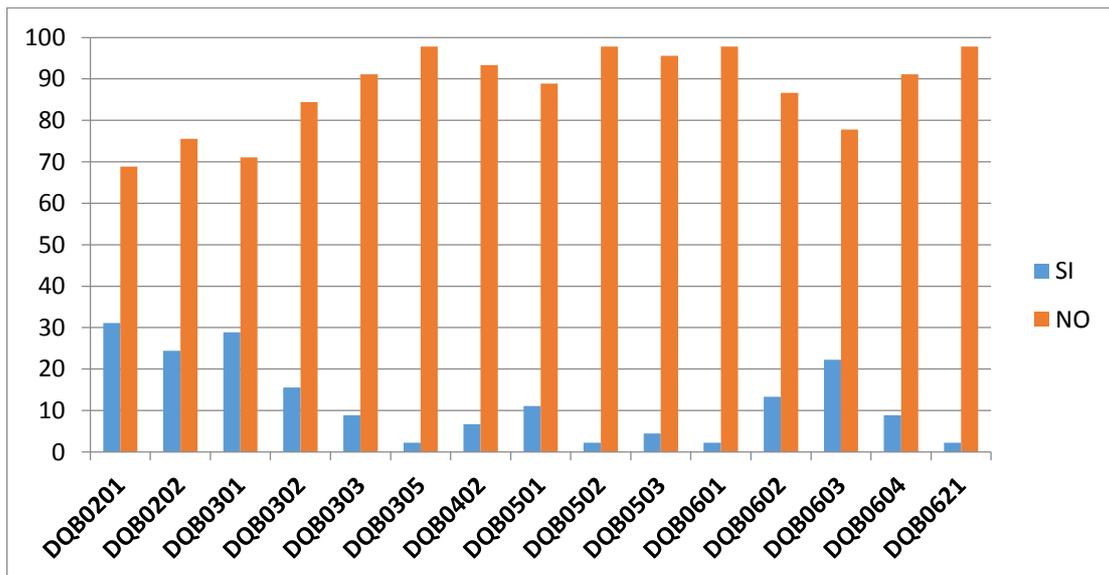


Figura 33: distribución de los HLA-DQB en el total de la muestra

- **HLA-DPA:**

Se detectan en nuestra población 4 alelos. Destaca el HLA-DPA*0103, que aparece en un 87% de la población. Le sigue el DPA*0201 que se detecta en un 31% de los niños.

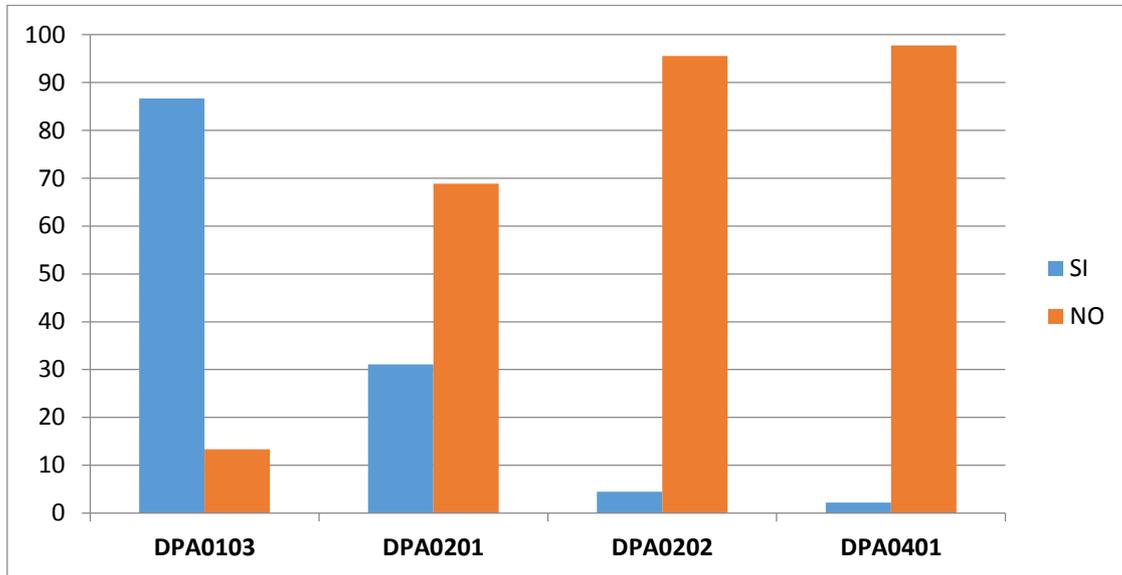


Figura 34: distribución de los HLA-DPA en el total de la muestra

- **HLA-DPB:**

Se detectan 14 alelos, apareciendo el DPB*0401 en el 56% de los niños incluidos en el estudio, y el DPB*0201 en un 40%. Los demás aparecen en menos del 20%.

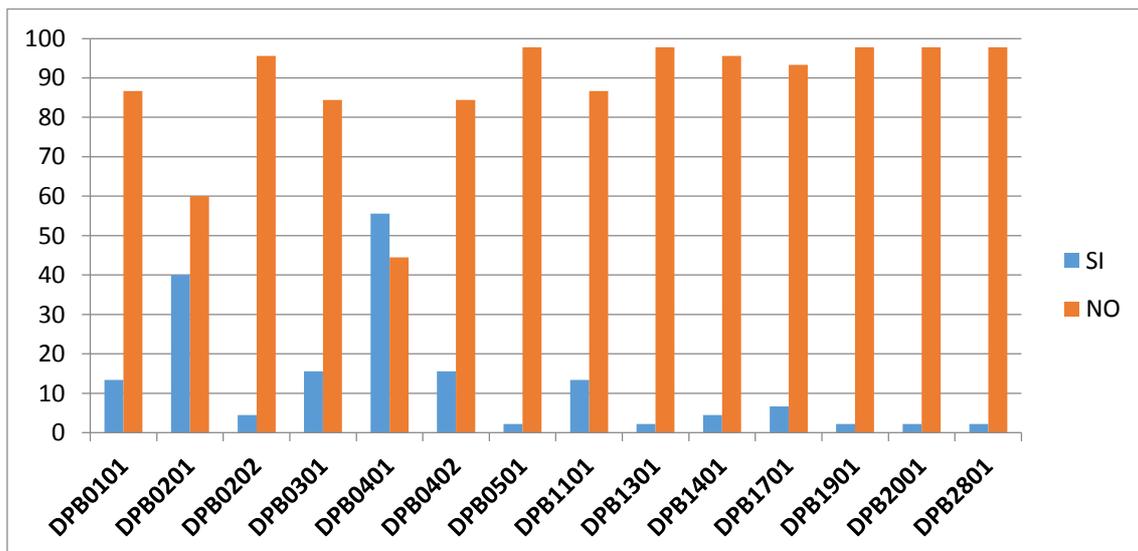


Figura 35: distribución de los HLA-DPB en el total de la muestra

7.3.2 ANÁLISIS EN LOS CASOS Y CONTROLES

- **HLA CLASE I:**

No existen diferencias significativas en los alelos HLA-A, B y C entre casos y controles.

- **HLA CLASE II:**

- **HLA-DRB:**

El 100% de los pacientes que muestran el alelo DRB*0101 son casos. Por tanto este alelo podría estar en relación con la aparición de hepatotoxicidad ($p= 0,049$).

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
DRB0101	NO	Recuento	18	23	41
		% dentro de DRB0101	43,9%	56,1%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	81,8%	100,0%	91,1%
	SI	Recuento	4	0	4
		% dentro de DRB0101	100,0%	,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	18,2%	,0%	8,9%
Total	Recuento	22	23	45	
	% dentro de DRB0101	48,9%	51,1%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,590 ^a	1	,032		
Corrección por continuidad ^b	2,619	1	,106		
Razón de verosimilitudes	6,134	1	,013		
Estadístico exacto de Fisher				,049	,049
Asociación lineal por lineal	4,488	1	,034		
N de casos válidos	45				

Tabla 13: Tabla de contingencia del HLA-DRB*0101

- **HLA-DQA:**

No se encuentran diferencias en estos alelos entre casos y controles

- **HLA-DQB:**

El alelo DQB*05 se expresa en 7 sujetos, de los cuales 6 son casos, es decir el 85,7% de los sujetos que presentan el alelo son casos. Podría tratarse de un factor de riesgo para la hepatotoxicidad ($p= 0,047$, estadístico Fisher).

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
DQB05	NO	Recuento	16	22	38
		% dentro de DQB05	42,1%	57,9%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	72,7%	95,7%	84,4%
	SI	Recuento	6	1	7
		% dentro de DQB05	85,7%	14,3%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	27,3%	4,3%	15,6%
Total	Recuento	22	23	45	
	% dentro de DQB05	48,9%	51,1%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,499 ^a	1	,034		
Corrección por continuidad ^b	2,923	1	,087		
Razón de verosimilitudes	4,892	1	,027		
Estadístico exacto de Fisher				,047	,042
Asociación lineal por lineal	4,399	1	,036		
N de casos válidos	45				

Tabla 14: Tabla de contingencia del HLA-DQB*05

- **HLA-DPA y HLA-DPB:**

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles.

7.4 ANÁLISIS GENOTIPO KIR.

7.4.1 ANÁLISIS EN EL TOTAL DE LA MUESTRA.

El resultado del estudio de los genotipos KIR en nuestra población es el siguiente:

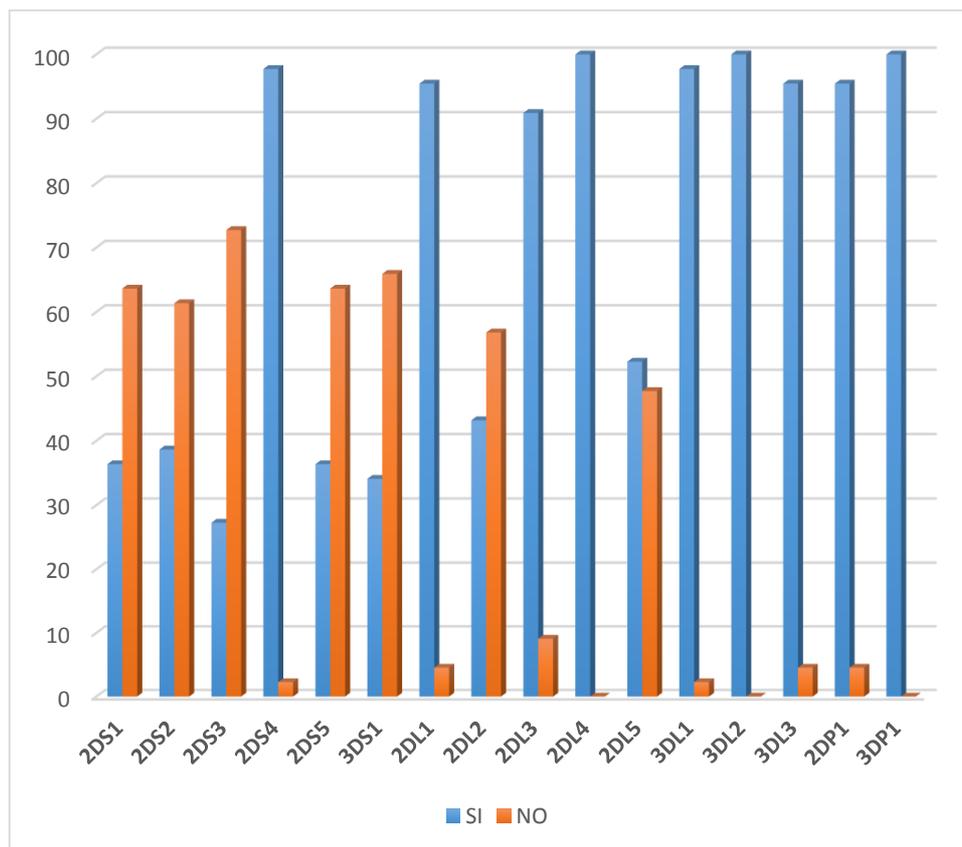


Figura 36: genotipo KIR en el total de la muestra

Observamos que el genotipo KIR **K2DL4** lo tienen el 100% de los sujetos. También aparecen en todos los pacientes los KIRs 3DL2 y 3DP1. El KIRs menos abundante es el K2DS3 (presente en el 27% de los niños)

7.4.2 ANALISIS EN CASOS Y CONTROLES.

Los genotipos KIR que se detectaron en cada uno de los grupos estudiados fueron los siguientes:

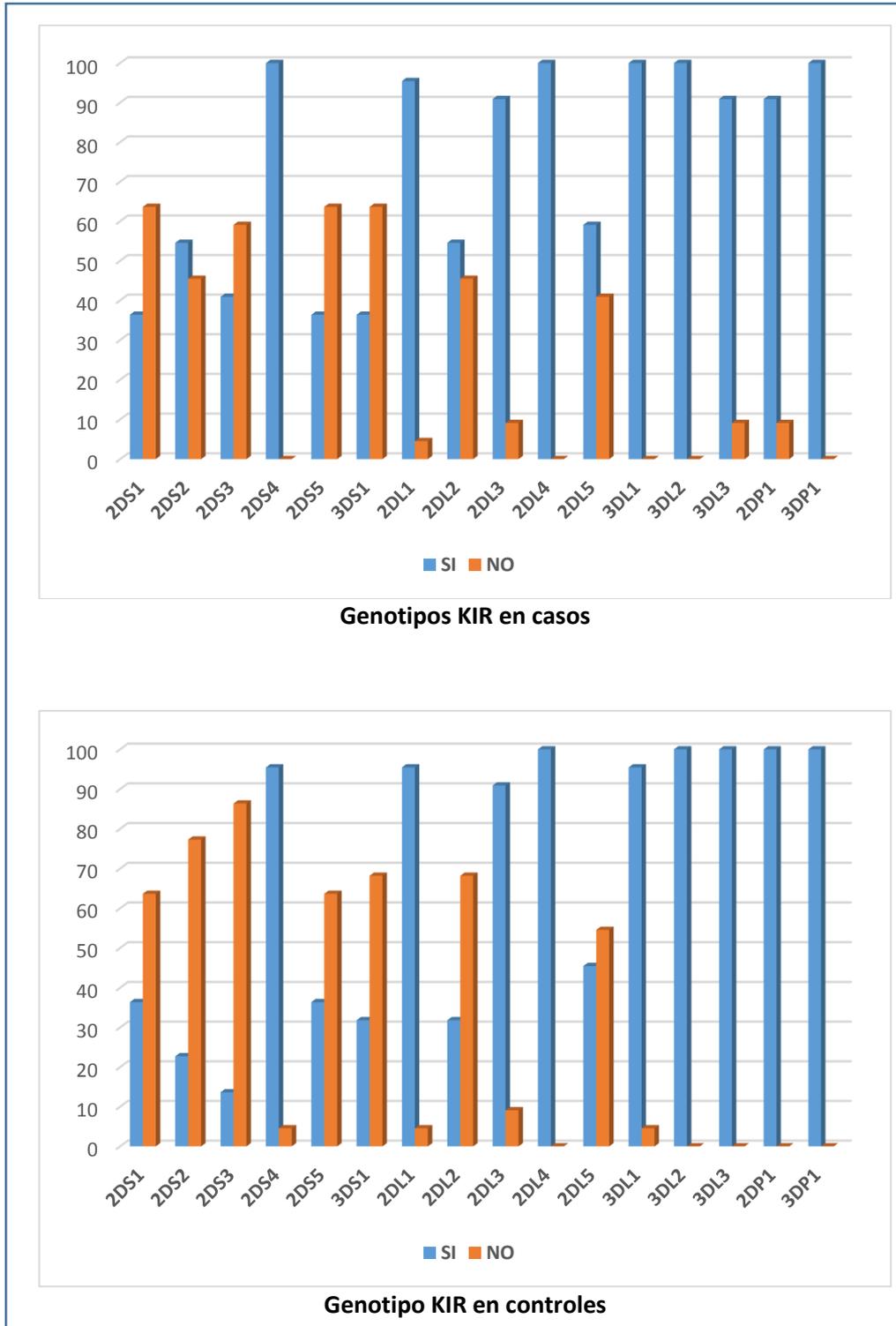


Figura 37: genotipos KIR encontrados en los casos y en los controles

Del estudio comparativo destacamos las siguientes cuestiones:

- Hay 3 pacientes que presentan todos los genotipos KIRs, perteneciendo los 3 al grupo casos, aunque no alcanzamos significación estadística ($p = 0,2$)

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
TodosKIR	NO	Recuento	19	22	41
		% dentro de TodosKIR	46,3%	53,7%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	86,4%	100,0%	93,2%
	SI	Recuento	3	0	3
		% dentro de TodosKIR	100,0%	,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	13,6%	,0%	6,8%
Total	Recuento	22	22	44	
	% dentro de TodosKIR	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 15: Tabla de contingencia para la variable "todos los KIRS"

- El genotipo KIR **K2DS2** aparece de forma más frecuente en los casos (70,6% de los casos frente a 29,4% de los controles). Este genotipo podría por tanto estar en relación con la susceptibilidad a padecer DILI. AL realizar estudios de regresión logística se concluye que los niños con este genotipo tienen 4 veces más probabilidad de tener hepatotoxicidad (OR=4,08; P=0,034; IC 95%= 1,1-15)

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
K2DS2	NO	Recuento	10	17	27
		% dentro de K2DS2	37,0%	63,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	45,5%	77,3%	61,4%
	SI	Recuento	12	5	17
		% dentro de K2DS2	70,6%	29,4%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	54,5%	22,7%	38,6%
Total	Recuento	22	22	44	
	% dentro de K2DS2	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

VARIABLES EN LA ECUACIÓN

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)		
							Inferior	Superior	
Paso 1ª	K2DS2(1)	1,406	,665	4,472	1	,034	4,080	1,108	15,020
	Constante	-,875	,532	2,705	1	,100	,417		

Tabla 16: Tabla de contingencia y regresión logística de genotipo KIR K2DS2

- Algunos niños presentan todos los KIRs activadores, mientras que otros muestran todos los KIRS inhibidores. Al realizar el estudio comparativo entre grupos y controles no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos en este aspecto ($p= 0.3$ para los activadores y $p= 0.2$ para los inhibidores)

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
KIR Activadores	NO	Recuento	18	21	39
		% dentro de KIR Activadores	46,2%	53,8%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	81,8%	95,5%	88,6%
	SI	Recuento	4	1	5
		% dentro de KIR Activadores	80,0%	20,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	18,2%	4,5%	11,4%
Total	Recuento	22	22	44	
	% dentro de KIR Activadores	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
KIR Inhibidores	NO	Recuento	16	20	36
		% dentro de KIR Inhibidores	44,4%	55,6%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	72,7%	90,9%	81,8%
	SI	Recuento	6	2	8
		% dentro de KIR Inhibidores	75,0%	25,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	27,3%	9,1%	18,2%
Total	Recuento	22	22	44	
	% dentro de KIR Inhibidores	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 17: Tablas de contingencia de la presencia de KIRs activadores e inhibidores en casos y controles.

- Al estudiar los haplotipos KIRs de los pacientes de la muestra, destaca que el 86 % de los niños presentan el haplotipo AA. En cuanto al haplotipo AB, el 100% de los niños pertenecían al grupo casos. No se encuentran no obstante diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles en este punto ($p= 0,17$).

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
HAP_Bx	AA	Recuento	18	20	38
		% dentro de HAP_Bx	47,4%	52,6%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	81,8%	90,9%	86,4%
	AB	Recuento	3	0	3
		% dentro de HAP_Bx	100,0%	,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	13,6%	,0%	6,8%
	BB	Recuento	1	2	3
		% dentro de HAP_Bx	33,3%	66,7%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	4,5%	9,1%	6,8%
Total	Recuento	22	22	44	
	% dentro de HAP_Bx	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 18. *Tabla de contingencia de la presencia de KIRs activadores e inhibidores en casos y controles.*

- Estudio de los HLAs ligados de los KIRs C1, C2 y Bw4:
 - o Primero se hace un estudio de los ligandos por separado de los KIRs, sin encontrar diferencias significativas

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
Cw_lig	C1C1	Recuento	10	7	17
		% dentro de Cw_lig	58,8%	41,2%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	47,6%	31,8%	39,5%
	C1C2	Recuento	8	11	19
		% dentro de Cw_lig	42,1%	57,9%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	38,1%	50,0%	44,2%
	C2C2	Recuento	3	4	7
		% dentro de Cw_lig	42,9%	57,1%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	14,3%	18,2%	16,3%
Total	Recuento	21	22	43	
	% dentro de Cw_lig	48,8%	51,2%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 19. *Tabla de contingencia del estudio de ligandos KIR en casos y controles*

- En segundo lugar se estudia el complejo formado por los ligandos unidos a su receptor KIR, y encontramos que **los niños con el receptor tipo 2DS2 unido al ligando C1** parecen tener 10 veces más riesgo de tener un episodio de DILI durante en tratamiento (OR: 10,4; p= 0,007, IC 95%: 1,9-56,6)

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
hx2DS2_C1L	NO	Recuento	10	19	29
		% dentro de hx2DS2_C1L	34,5%	65,5%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	47,6%	90,5%	69,0%
	SI	Recuento	11	2	13
		% dentro de hx2DS2_C1L	84,6%	15,4%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	52,4%	9,5%	31,0%
Total	Recuento	21	21	42	
	% dentro de hx2DS2_C1L	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Variables en la ecuación

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
								Inferior	Superior
Paso 1 ^a	hx2DS2_C1L(1)	2,347	,862	7,406	1	,007	10,450	1,928	56,637
	Constante	-1,705	,769	4,918	1	,027	,182		

Tabla 20. Tabla de contingencia y regresión logística del Estudio del complejo KIR-ligando en casos y controles

- Debido a que los alelos KIR2DL2 y KIR2DL3 son alelos de un mismo gen, se realiza el estudio comparativo entre niños homocigóticos y heterocigóticos, es decir:
 - Paciente 2DL2/2DL2: homocigóticos para 2DL2
 - Pacientes 2DL3/2DL3: homocigóticos para 2DL3
 - Pacientes 2DL2/2DL3: heterocigóticos

No se encontraron diferencias significativas, ni tampoco al estudiar los KIRs junto a sus ligandos (p= 0,29)

Tabla de contingencia

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
Poblaciones_DL2DL3	2DL2/2DL2	Recuento	1	1	2
		% dentro de Poblaciones_DL2DL3	50,0%	50,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	4,5%	4,5%	4,5%
	2DL2/2DL3	Recuento	11	6	17
		% dentro de Poblaciones_DL2DL3	64,7%	35,3%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	50,0%	27,3%	38,6%
	2DL3/2DL3	Recuento	10	15	25
		% dentro de Poblaciones_DL2DL3	40,0%	60,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	45,5%	68,2%	56,8%
Total	Recuento	22	22	44	
	% dentro de Poblaciones_DL2DL3	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 21. Distribución de homocigotos/heterocigotos para los alelos KIR2DL2/KIR2DL3 en casos y controles.

- De la misma forma, los alelos KIR3DL1 y KIR3DS1 son alelos de un mismo gen, por lo que también se comparan pacientes homocigotos y heterocigotos:
 - Pacientes 3DL1/3DL1 : homocigóticos para 3DL1
 - Pacientes 3DS1/3DS1 : homocigóticos para 3DS1
 - Pacientes 3DL1/3DS1 : heterocigóticos

Tampoco se encuentran en este caso diferencias significativas, ni en el estudio de los KIRs con sus ligandos.

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
Poblaciones_3DL1_3DS1	3DL1/3DL1	Recuento	13	15	28
		% dentro de Poblaciones_3DL1_3DS1	46,4%	53,6%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	59,1%	68,2%	63,6%
	3DL1/3DS1	Recuento	9	6	15
		% dentro de Poblaciones_3DL1_3DS1	60,0%	40,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	40,9%	27,3%	34,1%
	3DS1/3DS1	Recuento	0	1	1
		% dentro de Poblaciones_3DL1_3DS1	,0%	100,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	,0%	4,5%	2,3%
Total	Recuento	22	22	44	
	% dentro de Poblaciones_3DL1_3DS1	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 22. Tabla de contingencia de la distribución de homocigotos/heterocigotos para los alelos KIR3DL1/KIR3DS1 en casos y controles.

7.5 INVESTIGACIÓN DE POLIMORFISMOS DE CITOQUINAS.

7.5.1 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LA IL-10 EN CASOS Y CONTROLES.

Se determinan tanto en casos como en controles los distintos genotipos y fenotipos asociados con una producción de IL-10 alta, intermedia o baja. El estudio de estos fenotipos en casos y controles es el siguiente:

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
IL10_FENOT	Productor alto	Recuento	4	4	8
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	19,0%	19,0%	19,0%
	Productor intermedio	Recuento	8	10	18
% dentro de Tipo_Muestra3_REC		38,1%	47,6%	42,9%	
Productor bajo	Recuento	9	7	16	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	42,9%	33,3%	38,1%	
Total	Recuento	21	21	42	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 23. *Tabla de contingencia de fenotipos IL-10 en casos y controles.*

Observamos que un 42,9% de los casos tienen fenotipo asociado a producción baja de IL10. En cuanto a los controles, el 47,6% presentan fenotipo relacionado a producción intermedia de IL10. Sin embargo no se alcanza significación estadística ($p = 0,7$).

7.5.2 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA EN CASOS Y CONTROLES.

El genotipo más frecuente GG, que se corresponde con fenotipo bajo productor, aparece en un 76,2% de los casos y en un 66,7% de los controles. No hay diferencias entre ambos grupos con $p= 0.5$ en el estudio de genotipo y $p= 0.49$ en el fenotipo.

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
TNF_GENO	GG	Recuento	16	14	30
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	76,2%	66,7%	71,4%
	GA	Recuento	5	6	11
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	23,8%	28,6%	26,2%
	AA	Recuento	0	1	1
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	,0%	4,8%	2,4%
Total		Recuento	21	21	42
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
TNF_FENO	High	Recuento	5	7	12
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	23,8%	33,3%	28,6%
	Low	Recuento	16	14	30
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	76,2%	66,7%	71,4%
Total		Recuento	21	21	42
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 24. Tabla de contingencia de genotipos y fenotipos TNF- α en casos y controles.

7.5.3 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA

De los 9 posibles haplotipos que existen, en nuestra población, solo encontramos 5. Los más frecuentes, en casos y controles, son *TT GG* y *TC GG*. No se encuentran diferencias significativas entre casos y controles ($p= 0,41$ y $0,47$ para genotipo y fenotipo respectivamente).

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
TGFB_GENO	TT GG-h	Recuento	9	9	18
		% dentro de TGFB_GENO	50,0%	50,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	42,9%	42,9%	42,9%
	TC GG-h	Recuento	9	6	15
		% dentro de TGFB_GENO	60,0%	40,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	42,9%	28,6%	35,7%
	TC GC-i	Recuento	0	2	2
		% dentro de TGFB_GENO	,0%	100,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	,0%	9,5%	4,8%
	CC GG-i	Recuento	2	1	3
		% dentro de TGFB_GENO	66,7%	33,3%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	9,5%	4,8%	7,1%
	CC GC-L	Recuento	1	3	4
		% dentro de TGFB_GENO	25,0%	75,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	4,8%	14,3%	9,5%
Total	Recuento	21	21	42	
	% dentro de TGFB_GENO	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
TGFB_FENO	High	Recuento	18	15	33
		% dentro de TGFB_FENO	54,5%	45,5%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	85,7%	71,4%	78,6%
	Interm	Recuento	2	3	5
		% dentro de TGFB_FENO	40,0%	60,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	9,5%	14,3%	11,9%
	Low	Recuento	1	3	4
		% dentro de TGFB_FENO	25,0%	75,0%	100,0%
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	4,8%	14,3%	9,5%
Total	Recuento	21	21	42	
	% dentro de TGFB_FENO	50,0%	50,0%	100,0%	
	% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 25. Tabla de contingencia de genotipos y fenotipos TGF- β en casos y controles.

7.5.4 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LA INTERLEUQUINA 6.

Los genotipos más frecuentes son GG (42,9% de casos y 38,1 % de controles) y GC (33,3% de los casos y 38,1% de controles). Ambos se relacionan con fenotipo alto productor por lo que el 76% de los casos y de los controles lo son. No hay diferencias significativas entre casos y controles.

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
IL6_geno	GG	Recuento	9	8	17
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	42,9%	38,1%	40,5%
	GC	Recuento	7	8	15
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	33,3%	38,1%	35,7%
	CC	Recuento	5	5	10
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	23,8%	23,8%	23,8%
Total		Recuento	21	21	42
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
il6_FENO	High	Recuento	16	16	32
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	76,2%	76,2%	76,2%
	Low	Recuento	5	5	10
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	23,8%	23,8%	23,8%
Total		Recuento	21	21	42
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 26. Tabla de contingencia de genotipos y fenotipos IL-6 en casos y controles.

7.5.5 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL INTERFERÓN GAMMA.

En los casos el genotipo TT y fenotipo alto productor es el más frecuente, con un 45% del total. En el grupo control, lo más frecuente es el genotipo TA con fenotipo productor intermedio, con un porcentaje del 47,6%. No se alcanza significación estadística entre ambos grupos ($p= 0,3$).

			Tipo_Muestra3_REC		Total
			CASO	CONTROL	
IFN_Geno_Feno	TT_High	Recuento	9	5	14
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	45,0%	23,8%	34,1%
	TA_Inter	Recuento	8	10	18
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	40,0%	47,6%	43,9%
	AA_Low	Recuento	3	6	9
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	15,0%	28,6%	22,0%
Total		Recuento	20	21	41
		% dentro de Tipo_Muestra3_REC	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 27. Tabla de contingencia de fenotipos IFN- γ en casos y controles.

8. DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

Pese a que la hepatotoxicidad por fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer es bien conocida, no existen trabajos en la literatura que hayan analizado los episodios de DILI en niños oncológicos de forma estandarizada como se ha realizado en el presente trabajo.

La selección de un esquema de tratamiento antineoplásico para un paciente de oncología se basa primero en la disponibilidad de medicamentos efectivos, y luego en un equilibrio entre las posibles toxicidades relacionadas con el tratamiento, la condición clínica del paciente y las comorbilidades asociadas (201). Aunque la hipertransaminasemia se observa comúnmente en esta población, la identificación de su etiología es a menudo difícil. La inmunosupresión, la necesidad de transfusiones, las enfermedades infecciosas y la polifarmacia pueden ensombrecer la situación. Creemos que son necesarios protocolos estandarizados, de forma similar a lo realizado en este trabajo, para conocer mejor la toxicidad hepática de la quimioterapia.

Las dos categorías principales de DILI son intrínsecas / dependientes de la dosis e idiosincrásicas / independientes de la dosis. La primera se refiere a fármacos que son capaces de causar daño hepático de manera predecible en humanos o en modelos animales cuando se administran en dosis suficientemente altas. El hecho de que la elevación de transaminasas se haya repetido en el 100% de nuestros enfermos, a pesar de que en el 85% se redujo la dosis, nos hace pensar que los episodios de hepatotoxicidad por quimioterapia son idiosincrásicos.

Como el diagnóstico de DILI sigue siendo de exclusión se trata de uno de los trastornos más difíciles que deben ser manejados por oncólogos pediátricos. Los mecanismos multifactoriales parecen ser la base del DILI (60).

Los factores de riesgo relacionados con el fármaco juegan un factor importante; metotrexato y mercaptopurina fueron los citostáticos implicados en el 88% de los casos. De los factores de riesgo relacionados con el huésped, los episodios previos de DILI fueron los más importantes en nuestra población pues, en todos los casos, se produjeron nuevos episodios al reintroducir el fármaco. Otros factores de tipo ambiental han sido relacionados también con la hepatotoxicidad en oncología: características metabólicas del paciente (por ejemplo, obesidad), el tipo de dieta, el consumo de alcohol, café y tabaco, la polifarmacia, el estado inmunológico y el estado nutricional (26, 60). A pesar de que en niños café, alcohol y tabaco no parecen tener influencia con respecto al resto de factores, el presente estudio no los puede poner de manifiesto por el bajo número de pacientes que integran la muestra. Pesamos que son necesarios estudios multicéntricos amplios para determinar la importancia de los factores ambientales.

Desde una perspectiva nosográfica, existe una propensión a tratar de distinguir los diversos patrones de daño hepático y asociar fármacos específicos con cada patrón. Sin embargo, no siempre es posible hacer tales asociaciones. El patrón clínico de hepatotoxicidad puede variar según la interacción entre los factores del fármaco (dosis, biodisponibilidad y duración del tratamiento) y los factores del huésped (edad, sexo y absorción del fármaco) (204). Este trabajo no pudo poner de manifiesto diferencias entre el patrón de DILI y los distintos fármacos, puesto que metotrexato y mercaptopurina

intervinieron en la mayoría de los episodios de hepatotoxicidad, bien de forma aislada o asociados. Además el 91,8% de las reacciones fueron de tipo hepatotóxico. El patrón mixto fue raro (8,2%) sin que hayamos detectado ninguna reacción de tipo colestásico.

Se han utilizado los marcadores tradicionales de daño hepático (ALT, ALP y bilirrubina), no obstante hay que señalar que, en niños con cáncer, los patrones de daño hepático pueden estar determinados por las condiciones patológicas y eventos subyacentes descritos en la literatura tales como apoptosis, necrosis y necroptosis, inflamación, estrés oxidativo y activación del sistema inmunitario (204). Son necesarios nuevos biomarcadores de DILI para la detección temprana de hepatotoxicidad que además, ayuden al diagnóstico más adecuado en las circunstancias que están presentes en enfermos oncológicos.

Recientemente se han publicado los efectos diferenciales de los agentes hepatotóxicos sobre el daño hepático entre los sujetos con cáncer; estos estudios sugieren que la función hepática subyacente puede afectar la susceptibilidad y los patrones de DILI (205). En nuestros pacientes no existía evidencia de daño hepático previo a la instauración de la quimioterapia.

El diagnóstico de DILI se basa en el diagnóstico diferencial de exclusión de otras etiologías plausibles. En pacientes con cáncer sometidos a tratamiento con terapias anticancerosas, la identificación de DILI grave es especialmente desafiante debido a las complejidades de la polifarmacia anticancerosa y a que los mecanismos por los cuales las terapias anticancerígenas pueden causar daño hepático en individuos susceptibles no son todavía completamente conocidos (206-208). Este hecho ha condicionado que no hayan podido ser incluidos en el registro otros niños oncológicos con aumento de transaminasas, pero que, según la escala de CIOMS, no han sido catalogados como posibles al perder peso la probabilidad por la patología subyacente y los rigurosos criterios de selección.

A pesar de que se han establecido los criterios para estandarizar la lesión hepática, las modificaciones de la dosis a menudo se basan en el juicio clínico empírico. En el momento actual, no existen pautas uniformes establecidas para la decisión de la medida terapéutica más adecuada ante la aparición de un episodio de DILI. Por lo tanto, es esencial una comprensión exhaustiva de las manifestaciones hepatotóxicas de los agentes quimioterapéuticos más comunes (206). Los oncólogos que intervinieron en el tratamiento de los niños del presente trabajo decidieron conductas terapéuticas distintas ante la hipertransaminasemia detectada, sin un criterio estandarizado; en la mayoría de los casos (85%), la actitud tomada fue la reducción de la dosis del fármaco, bien continuando la cadencia de tratamiento, o bien retrasando el ciclo siguiente. Esta reducción en la dosis total administrada podría conllevar una menor eficacia del tratamiento. Mención especial merece la fase de mantenimiento, donde la administración combinada de mercaptopurina y metotrexato por vía oral son responsables de hasta un 70% de los episodios de DILI en este estudio. Actualmente son numerosos los estudios que se centran en tratar de predecir y evitar la hepatotoxicidad en esta fase del tratamiento, la mayor parte de ellos se centran en el estudio de los polimorfismos genéticos de las enzimas encargadas del metabolismo tanto de la mercaptopurina como del metotrexato, tratando de adaptar las dosis de los citostáticos al riesgo de toxicidad de cada niño (177-186). Algunos de los polimorfismos más

estudiados, como los de las enzimas responsables del metabolismo de la 6-MP y la tioguanina, comienzan ya a realizarse en el momento del diagnóstico la enfermedad, antes de que aparezca por tanto la hepatotoxicidad, con resultados prometedores (209, 210).

Después de un desafío positivo, los pacientes que reciben beneficios de un medicamento muy crítico para su enfermedad, o incluso para su vida como ocurre en los pacientes oncológicos, sin duda, pueden ser considerados para la reexposición a fármacos (202) como ocurrió con todos los pacientes analizados. Estudios clínicos prospectivos recientes que examinan cientos de eventos de reintroducción actualmente definen una nueva exposición positiva al fármaco como un nivel de ALT de $3-5 \times$ LSN o mayor, que generalmente ocurre mucho más rápidamente que el DILI inicial. (26, 60, 201). La reexposición a fármacos puede ser apropiada para medicamentos críticos, cuando no hay alternativas más seguras disponibles y el beneficio objetivo del paciente excede su riesgo (203). No obstante, la tasa de reintroducción positiva del 100% detectada en nuestro estudio hace recomendar una reintroducción controlada y prudente de fármacos que han producido un primer episodio de DILI. Dos de los episodios de hepatotoxicidad ha sido clasificados como graves, por lo que es necesario establecer algoritmos de seguridad estandarizados con controles muy estrictos de enzimas hepáticas durante los períodos de alto riesgo. No consideramos la posibilidad de interrupción definitiva del fármaco por tratarse de medicamentos críticos, sin que existan alternativas seguras disponibles, de manera que el beneficio objetivo del paciente excede su riesgo.

En cuanto a la influencia de los factores inmunogenéticos (HLA, polimorfismos de citoquinas y genotipo KIR), este estudio es pionero, ya que no hay ninguno previo en oncología.

Actualmente existe controversia respecto a si variaciones genéticas en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) determinarían cierta predisposición a las reacciones adversas hepáticas debido al papel que desempeña en la respuesta inmunológica. En el presente estudio no se encuentran diferencias significativas en los polimorfismos del HLA clase I entre casos y controles.

Respecto al HLA clase II detectamos que el 100% de los pacientes que muestran el alelo DRB*0101 son casos. Por tanto la presencia de este alelo podría suponer un factor de riesgo para el desarrollo de hepatotoxicidad. No hay diferencias significativas en los restantes HLA clase II, salvo al realizar el análisis de los alelos considerando sólo dos dígitos, en cuyo caso hay que destacar que el alelo DQB* se expresa en 7 sujetos, de los cuales 6 son casos, es decir el 85,7% de los sujetos que presentan el alelo DQB*05 pertenecen al grupo de niños con hepatotoxicidad. El bajo tamaño de la muestra hace que no se alcance significación estadística.

Las células natural Killer intrahepáticas exhiben un nivel más alto de citotoxicidad y una mayor expresión de mediadores citotóxicos en comparación con las células NK periféricas (211). En este estudio, hemos analizado los polimorfismos KIR con respecto a la susceptibilidad a hepatotoxicidad en niños que recibe quimioterapia por un proceso oncológico. La presencia de KIR activadores es generalmente más variable que la de los KIR inhibidores. Se ha sugerido que el número total de KIR activadores podría afectar a

la susceptibilidad a determinadas enfermedades, ya que las señales aumentadas de múltiples receptores KIR activadores podrían exacerbar la activación de las células NK y los subconjuntos de células T contra los autoantígenos (212). Al comparar el número de KIR activadores entre casos y controles encontramos que el genotipo K2DS2 es cuatro veces más frecuente en el grupo de niños que presentan hepatotoxicidad, por lo que podría tratarse de un factor de riesgo para padecer DILI.

La función de los receptores KIR depende de la presencia de ligandos HLA apropiados en la célula diana para que se produzca la señalización correcta y la activación de las células NK. Por tanto hemos analizado la presencia de ligandos HLA clase I actualmente identificados, encontrando que el genotipo K2DS2 ligado a su ligando C1 parece favorecer la aparición de DILI. De los dos hechos descritos se presupone la posibilidad de que la activación de las células NK favorezca la lesión hepática, aunque sin duda son necesarios estudios más amplios para comprobar este hecho.

Las combinaciones de KIR-HLA consideradas en este estudio se basaron en ligandos identificados hasta la fecha. Sin embargo, la comprensión actual de los ligandos de los KIR no es completa, y las interacciones actualmente no conocidas podrían también influir en la susceptibilidad a DILI (211). Además se ha sugerido que diferentes productos de alelos KIR podrían tener diferente afinidad por el mismo ligando HLA, lo que podría conducir a diferencias en la regulación de la actividad de células NK. Este aspecto no ha sido evaluado en el presente estudio.

La evidencia reciente demuestra que el equilibrio entre los mediadores pro-y antiinflamatorios puede determinar la susceptibilidad y gravedad de la lesión hepática en hepatotoxicidad por acetaminofeno experimental (28). Es plausible que la activación de la inmunidad innata del hígado y la inflamación resultante pueda también desempeñar un papel importante en la hepatotoxicidad idiosincrásica (28). En consecuencia, los genes que codifican la IL-10, IL-6, el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β) o el Interferón Gamma (IFN- γ), todos ellos implicados en la respuesta inflamatoria, son candidatos para el estudio de la susceptibilidad al daño hepático secundario a tóxicos. Si bien los fenotipos bajos productores de IL-10 parecen ser algo más frecuentes en el grupo de niños con hepatotoxicidad, no se encuentran diferencias significativas al estudiar los polimorfismos de estos mediadores de forma comparativa en casos y controles.

Para finalizar queremos destacar que el futuro de los tratamientos quimioterápicos consistirá probablemente en la creación de tratamientos personalizados adaptados al riesgo individual de toxicidad de cada paciente (9). La creciente disponibilidad de plataformas genéticas de alto rendimiento y bajo costo que permiten el cribado simultáneo de cientos de polimorfismos, la educación de los profesionales de la salud y la implementación de redes multicéntricas destinadas a mejorar la seguridad de nuevos fármacos, ayudarán a mejorar el impacto de la farmacogenética en la rutina clínica. Nuestros estudios sugieren que los polimorfismos KIR pueden ser factores de riesgo posibles para la susceptibilidad a DILI por quimioterapia, por lo que creemos necesario la realización de estudios más amplios para corroborar este aspecto.

9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

9.1 DERIVADAS DEL DISEÑO

La principal limitación deriva del escaso tamaño muestral debido fundamentalmente a que el cáncer es una enfermedad rara en la población pediátrica. En segundo lugar, hemos utilizado estrictos criterios de inclusión para limitar al máximo la presencia de otros posibles factores que podrían ser causantes de lesión hepática.

Otra limitación inherente a los estudios de casos y controles es que no se pueden estimar de manera directa las medidas de incidencia o prevalencia que tradicionalmente se obtienen en los estudios de cohortes o transversales.

9.2 DERIVADAS DEL ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS.

Las revisiones recientes indican que del 70-95% de las asociaciones recientes que se publican no se confirman en los estudios posteriores. La mayor parte de los diseños de los estudios son de casos y controles, por lo que, además de los sesgos conocidos de este tipo de estudios, en el caso de las asociaciones genéticas se deben tener en cuenta consideraciones adicionales, como que las variantes genéticas difieren en las poblaciones en función de la raza (estratificación de la población). Uno de los problemas más importantes de estos tipos de asociaciones es el gran número de polimorfismos genéticos que pueden estar relacionados con el riesgo de enfermedad, el desarrollo de técnicas con capacidad de detectarlos en una gran cantidad de personas y su aplicabilidad práctica. En concreto, las conclusiones de nuestro trabajo deben de interpretarse con cautela y confirmarse en estudios más amplios.

10. CONCLUSIONES

10. CONCLUSIONES

El análisis y discusión crítica del conjunto de observaciones y resultados contenidos en esta memoria nos permiten formular las siguientes conclusiones:

➤ **Objetivo principal:**

1. No hemos encontrado diferencias entre ningún alelo *HLA-A*, *HLA-B* o *HLA-C* relacionados con hepatotoxicidad.

2. El 100% de los niños que muestran el alelo ***HLA-DRB*0101*** y el 85,7% de los que muestran el alelo ***DQB*05*** son casos, por lo que estos alelos podrían estar relacionados con el daño hepático inducido por quimioterapia en esta población.

3. El genotipo ***KIR K2DS2***, de tipo activador, aparece de forma más frecuente en los niños que han padecido episodios de hepatotoxicidad, 70,6% de los casos frente a 29,4% de los controles. Los niños con este genotipo tienen 4 veces más probabilidad de tener hepatotoxicidad. Además, los niños con el receptor tipo **2DS2 unido al ligando C1** parecen tener 10 veces más riesgo de tener un episodio de daño hepático durante el tratamiento. Estos dos sugieren que la activación de las células NK favorece la hepatotoxicidad.

4. Los polimorfismos ***bajo productor de IL-10*** tienden a ser más frecuentes en el grupo de niños que han sufrido un episodio de hepatotoxicidad, ya que aparecen en un 43% de los casos frente a un 33% de los controles.

5. Los polimorfismos genéticos de *TNF- α* , *TGF- β* , *IL-6* e *IFN- γ* no están relacionados con el riesgo de desarrollar daño hepático.

➤ **Objetivos secundarios:**

6. Los quimioterápicos más frecuentemente implicados en la aparición de hepatotoxicidad son mercaptopurina y metotrexato, ambos pertenecientes al grupo de los antimetabolitos.

7. El tipo de daño hepático más frecuente en la población pediátrica oncológica es el hepatotóxico, detectándose en el 92% de las ocasiones.

8. Las manifestaciones clínicas del daño hepático por quimioterapia son inespecíficas, siendo las más frecuentes en nuestro grupo el dolor abdominal y la hiporexia.

9. El 97,9% los episodios de daño hepático fueron no graves, y todos fueron transitorios.

10. La principal consecuencia de la hepatotoxicidad asociada a quimioterapia es la reducción de la dosis del quimioterápico implicado, con posibles consecuencias sobre la efectividad del tratamiento.

➤ **Conclusión final:**

La hepatotoxicidad idiosincrásica debida a a quimioterapia en niños no es una toxicidad infrecuente, y sin embargo continúa siendo un reto para los oncólogos pediátricos, debido principalmente a sus inespecíficas manifestaciones clínicas, a que carece de marcadores específicos, a que la atribución de causalidad es compleja y a que es pobre el conocimiento del mecanismo implicado. Su trascendencia en el tratamiento es alta, ya que es la causa de retrasos y reducciones de dosis en la quimioterapia.

El registro de hepatopatías asociadas a medicamentos en la infancia ha demostrado ser un instrumento útil para mejorar la detección de casos de hepatotoxicidad y acercarnos a la realidad epidemiológica del DILI en pediatría.

Creemos que se debe profundizar en la relación entre el genotipo y la susceptibilidad o resistencia individual a desarrollar enfermedad hepática idiosincrásica debida a fármacos en la población pediátrica, promoviendo nuevos estudios que ayuden a identificar todos los posibles factores genéticos implicados en la hepatotoxicidad por fármacos, incluyendo cistostáticos, en la infancia.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Giri S, Nieber K, Bader A. Hepatotoxicity and hepatic metabolism of available drugs: current problems and possible solutions in preclinical stages. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010 Aug;6(8):895-917.
2. Henk van den Berg, Nanda Tak. Licensing and labeling of drug in a pediatric oncology ward. *BJCP.* 2011;72:474-81.
3. Murray KF, Hadzic N, Wirth S, Bassett M, Kelly D. Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Oct;47(4):395-405.
4. Yun Z, Yong-gang L, Jia-bo W, Shu-hong L, Li-fu W, Yan-ling Z, Yun-feng B, Zhong-xia W, Xiao-he X. Causes, Features, and Outcomes of Drug-Induced Liver Injury in 69 Children from China. *Gut Liver.* 2015 Jul; 9(4):525–533.
5. Ferrajolo C, M. C. Verhamme K, Trifirò G, Jong G, Picelli G, Giaquinto C, Mazzaglia G, Stricker B, Rossi F, Capuano A, Sturkenboom M. Antibiotic-Induced Liver Injury in Paediatric Outpatients: A Case-Control Study in Primary Care Databases. *Drug Saf.* 2017; 40(4):305–315
6. Navarro, V. J. & J. R. Senior. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 2006;354(7):731-9.
7. Wiela-Hojenska A, Gorczyńska E, Orzechowska-Juzwenko K, et al: Metabolic functions of the liver during chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Pharm Ther.* 2001 Jun;39(6):246-50.
8. Andrade RJ, Robles M, Ulzurrun E, Lucena MI. Drug-induced liver injury: insights from genetic studies. *Pharmacogenomics* 2009 Sep;10 (9):1467-1487.
9. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia: progress through collaboration. *J Clin Oncol.* 2015; 33:2938– 2948.
10. Wanless IR. Anatomy, histology, embryology, and developmental anomalies of the liver. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, eds. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease.* 7th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2002:1195–1201
11. Haubitz M, Bohnenstengel F, Brunkhorst et al. Cyclophosphamide pharmacokinetics and dose requirements in patients with renal insufficiency. *Kidney Int.* 2002; 61: 1495-1501.
12. Lee WM. Drug-induced Acute Liver Failure. *Clin Liver Dis* 2013;17(4):575-586.
13. Pineiro-Carrero VM, Pineiro EO. Liver. *Pediatrics.* 2004 Apr;113(4 Suppl):1097-1106.
14. Simon T, Becquemont L, Mary-Krause M, de Waziers I, Beaune P, Funck-Brentano C, et al. Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and tacrine hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Apr;67(4):432-437.

15. Nies AT, Schwab M, Keppler D. Interplay of conjugating enzymes with OATP uptake transporters and ABCC/MRP efflux pumps in the elimination of drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 May;4(5):545- 568.
16. Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, et al. Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology*. 2006 May;130(6):1793-1806.
17. Ismail, M.G., Hausler, S., Stuermer, C.A., Guyot, C., Meier, P.J., Roth, J. et al. ABC-transporters are localized in caveolin-1-positive and reggie-1-negative and reggie-2-negative microdomains of the canalicular membrane in rat hepatocytes, *Hepatology*. 2009;49:1673–1682
18. Pauli-Magnus C, Meier PJ. Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology*. 2006 Oct;44(4):778-787.
19. Tujios S, Fontana RJ. Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Apr;8(4):202-211.
20. Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet*. 2000 Oct 7;356(9237):1255-1259.
21. Bakke OM, Manocchia M, de Abajo F, Kaitin KI, Lasagna L. Drug safety discontinuations in the United Kingdom, the United States, and Spain from 1974 through 1993: a regulatory perspective. *Clin Pharmacol Ther*. 1995 Jul; 58(1):108-117.
22. Sarges P, Steinberg JM, Lewis JH. Drug-Induced Liver Injury: Highlights from a Review of the 2015 Literature. *Drug Saf*. 2016 Sep;39(9):801-21
23. Roth RA, Ganey PE. Intrinsic versus Idiosyncratic Drug-Induced Hepatotoxicity - Two Villains or One? *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Mar;332(3):692-697.
24. Watkins PB, Kaplowitz N, Slattery JT, Colonese CR, Colucci SV, Stewart PW, et al. Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006 Jul 5; 296(1):87-93.
25. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Acetaminophen-related Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*. 2013 May 11;17(4):587-607.
26. Fontana RJ. Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives. *Gastroenterology*. 2014 Apr;146(4):914-928.
27. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Jun;4(6):489-499.
28. De Lemos AS, Foureau DM, Jacobs C, Ahrens W, Russo MW, Bonkovsky HL. Drug-induced liver injury with autoimmune features. *Semin Liver Dis*. 2014 May;34(2):194-204.
29. Njoku DB. Drug-induced hepatotoxicity: metabolic, genetic and immunological basis. *Int J Mol Sci* . 2014 Apr 22;15(4):6990-7003.

30. Iverson SL, Uetrecht JP. Identification of a reactive metabolite of terbinafine: insights into terbinafine induced hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2001 Feb;14(2):175-181.
31. Herrero-Herrero JJ, Garcia-Aparicio J. Corticosteroid therapy in a case of severe cholestatic hepatitis associated with amoxicillin-clavulanate. *J Med Toxicol*. 2010 Dec;6(4):420-423.
32. Au A, Aziz Baba A, Goh AS, Wahid Fadilah SA, Teh A, Rosline H, et al. Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomed Pharmacother*. 2014 Apr;68(3):343-349.
33. Lang C, Meier Y, Stieger B, Beuers U, Lang T, Kerb R, et al. Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Jan;17(1):47-60.
34. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin Liver Dis*. 1998;18(2):105-114.
35. Jaeschke H FAU - Gores, Gregory, J., FAU GG, FAU CA, FAU HJ, Pessayre D FAU - Lemasters, John, J., Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2002; 65:166-176.
36. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet*. 1998 Nov;20(3):233-238.
37. Laskin DL, Laskin JD. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. *Toxicology*. 2001 Mar 7;160(1-3):111-118.
38. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*. 1997 Jun;61(6):647-653.
39. Jones DP, Lemasters JJ, Han D, Boelsterli UA, Kaplowitz N. Mechanisms of pathogenesis in drug hepatotoxicity putting the stress on mitochondria. *Mol Interv*. 2010 Apr;10(2):98-111.
40. Boelsterli UA, Lim PL. Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Apr 1;220(1):92-107.
41. Alachkar H, Fulton N, Sanford B, Malnassy G. Expression and polymorphism (rs4880) of mitochondrial superoxide dismutase (SOD2) and asparaginase induced hepatotoxicity in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2017 Jun;17(3):274-279.
42. Kass GE, Price SC. Role of mitochondria in drug-induced cholestatic injury. *Clin Liver Dis*. 2008 Feb;12(1):27-51, vii.
43. Lucena MI, Garcia-Martin E, Andrade RJ, Martinez C, Stephens C, Ruiz JD, et al. Mitochondrial superoxide dismutase and glutathione peroxidase in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2010 Jul;52(1):303-312.

44. Bourdi M, Eiras DP, Holt MP, Webster MR, Reilly TP, Welch KD, et al. Role of IL-6 in an IL-10 and IL-4 double knockout mouse model uniquely susceptible to acetaminophen-induced liver injury. *Chem Res Toxicol*. 2007 Feb;20(2):208-216.
45. Watkins PB. Biomarkers for the diagnosis and management of drug-induced liver injury. *Semin Liver Dis*. 2009 Nov; 29(4):393-399.
46. Andrade RJ, Lucena MI, Alonso A, Garcia-Cortes M, Garcia-Ruiz E, Benitez R, et al. HLA class II genotype influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease. *Hepatology*. 2004 Jun;39(6):1603-1612.
47. O'Donohue J, Oien KA, Donaldson P, Underhill J, Clare M, MacSween RN, et al. Co-amoxiclav jaundice: clinical and histological features and HLA class II association. *Gut*. 2000 Nov;47(5):717-720.
48. Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, Shen Y, Pe'er I, Floratos A, et al. HLA-B*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nat Genet*. 2009 Jul;41(7):816-819.
49. McKenzie R, Fried MW, Sallie R, Conjeevaram H, Di Bisceglie AM, Park Y, et al. Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 1995 Oct 26;333(17):1099-1105.
50. Ruiz Montero A., Durán Quintana J.A., Jiménez Sáenz M., Abadín Delgado J.A. A strategy to improve the detection of drug-induced hepatotoxicity. *Rev Esp Enferm Dig*. 2005 Mar;97(3):155-60.
51. Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ, Larrey D, Molokhia M, Takikawa H, et al. Case Definition and Phenotype Standardization in Drug-Induced Liver Injury. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Jun;89(6):806-15.
52. Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries. *J Clin Epidemiol*. 1993 Nov;46(11):1323-1330.
53. Benichou C, Danan G, Flahault A. Causality assessment of adverse reactions to drugs--II. An original model for validation of drug causality assessment methods: case reports with positive rechallenge. *J Clin Epidemiol*. 1993 Nov;46(11):1331-1336.
54. Faich GA, Castle W, Bankowski Z. International reporting on adverse drug reactions: the CIOMS project. CIOMS ADR Working Group. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1990 Apr;28(4):133-138.
55. Peire MA, Lucena MI, Ruiz-Extremera A, Jara P, Romero-Gonzalez J, Andrade RJ. Drug-induced hepatotoxicity in children. Where we are and where we are going. *An Esp Pediatr*. 2002 May;56(5):434-442.
56. Molleston JP, Fontana RJ, Lopez MJ, Kleiner DE, Gu J, Chalasani N, et al. Characteristics of idiosyncratic drug-induced liver injury in children: results from the DILIN prospective study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011 Aug;53(2):182-189.

57. Amin MD, Harpavat S, Leung DH. Drug-induced liver injury in children. *Curr Opin Pediatr*. 2015 Oct;27(5):625-633.
58. Benichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol* 1990 Sep;11(2):272-276
59. Chen M, Suzuki A, Borlak J, Andrade RJ, Lucena MI. Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *J Hepatol*. 2015 Aug;63(2):503- 514.
60. Chalasani N, Bonkovsky HL, Fontana R, Lee W, Stolz A, Talwalkar J, et al. Features and Outcomes of 899 Patients With Drug-Induced Liver Injury: The DILIN Prospective Study. *Gastroenterology*. 2015 Jun;148(7):1340-52.
61. Lucena MI, Andrade RJ, Kaplowitz N, Garcia-Cortes M, Fernandez MC, Romero-Gomez M, et al. Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex. *Hepatology*. 2009 Jun;49(6):2001-2009.
62. Mitchell SJ, Hilmer SN Associate P. Drug-induced liver injury in older adults. *Ther Adv Drug Saf*. 2010 Dec;1(2):65-77.
63. Fountain FF, Tolley E, Chrisman CR, Self TH. Isoniazid hepatotoxicity associated with treatment of latent tuberculosis infection: a 7-year evaluation from a public health tuberculosis clinic. *Chest*. 2005 Jul;128(1):116-123.
64. Felker D, Lynn A, Wang S, Johnson DE. Evidence for a potential protective effect of carnitine/pantothenic acid co-treatment on valproic acid-induced hepatotoxicity. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2014;7(2):211-218.
65. De Abajo FJ, Montero D, Madurga M, Garcia Rodriguez LA. Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *Br J Clin Pharmacol*. 2004 Jul;58(1):71-80.
66. Larrey D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. *Semin Liver Dis*. 2002;22(2):145-155.
67. Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC, Pelaez G, Pachkoria K, Garcia-Ruiz E, et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology*. 2005 Aug;129(2):512-521.
68. Bjornsson ES, Bergmann OM, Bjornsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(7):1419-25, 1425.e1-3; quiz e19-20.
69. Wang JY, Liu CH, Hu FC, Chang HC, Liu JL, Chen JM, et al. Risk factors of hepatitis during antituberculous treatment and implications of hepatitis virus load. *J Infect*. 2011 Jun;62(6):448-455.
70. Andrade RJ, Lopez-Ortega S, Lopez-Vega MC, Robles M, Cueto I, Lucena MI. Idiosyncratic drug hepatotoxicity: a 2008 update. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2008 Mar;1(2):261-276.

71. Medina-Caliz I, Robles-Diaz M, Garcia-Munoz B, Stephens C, Ortega-Alonso A, Garcia-Cortes M, et al. Definition and risk factors for chronicity following acute idiosyncratic drug-induced liver injury. *J Hepatol*. 2016 Sep;65(3):532-542.
72. Tilling L, Townsend S, David J. Methotrexate and hepatic toxicity in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin Drug Investig*. 2006;26(2):55-62.
73. Lucena MI, Andrade RJ, Vicioso L, Gonzalez FJ, Pachkoria K, Garcia-Munoz B. Prolonged cholestasis after raloxifene and fenofibrate interaction: A case report. *World J Gastroenterol*. 2006 Aug 28;12(32):5244-5246.
74. Larrey D. Drug-induced liver diseases. *J Hepatol*. 2000;32(1 Suppl):77-88.
75. Aithal GP, Grove JI. Genome-Wide Association Studies in Drug-Induced Liver Injury: Step Change in Understanding the Pathogenesis. *Semin Liver Dis*. 2015 Nov;35(4):421-431.
76. Lucena MI, Molokhia M, Shen Y, Urban TJ, Aithal GP, Andrade RJ, et al. Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA class I and II alleles. *Gastroenterology*. 2011 Jul;141(1):338-347.
77. Schaid DJ, Spraggs CF, McDonnell SK, Parham LR, Cox CJ, Ejlertsen B, et al. Prospective validation of HLA-DRB1*07:01 allele carriage as a predictive risk factor for lapatinib-induced liver injury. *J Clin Oncol*. 2014 Aug 1;32(22):2296-2303.
78. Singer JB, Lewitzky S, Leroy E, Yang F, Zhao X, Klickstein L, et al. A genome-wide study identifies HLA alleles associated with lumiracoxib-related liver injury. *Nat Genet*. 2010 Aug;42(8):711-714.
79. Alfirevic A, Gonzalez-Galarza F, Bell C, Martinsson K, Platt V, Bretland G, et al. In silico analysis of HLA associations with drug-induced liver injury: use of a HLA-genotyped DNA archive from healthy volunteers. *Genome Med*. 2012 Jun 25;4(6):51.
80. Ortega-Alonso A, Stephens C, Lucena MI, Andrade RJ. Case Characterization, Clinical Features and Risk Factors in Drug-Induced Liver Injury. *Int J Mol Sci* 2016 May 12;17(5):10.
81. Aithal GP, Ramsay L, Daly AK, Sonchit N, Leathart JB, Alexander G, et al. Hepatic adducts, circulating antibodies, and cytokine polymorphisms in patients with diclofenac hepatotoxicity. *Hepatology*. 2004 May;39(5):1430-1440.
82. Pachkoria K, Lucena MI, Crespo E, Ruiz-Cabello F, Lopez-Ortega S, Fernandez MA, et al. Analysis of IL-10, IL-4 and TNF-alpha polymorphisms in drug-induced liver injury (DILI) and its outcome. *J Hepatol*. 2008 Jul;49(1):107-114.
83. Maria VA, Victorino RM. Development and validation of a clinical scale for the diagnosis of drug induced hepatitis. *Hepatology*. 1997 Sep;26(3):664-669.
84. Garcia-Cortes M, Stephens C, Lucena MI, Fernandez-Castaner A, Andrade RJ. Causality Assessment Methods In Drug Induced Liver Injury: Strengths And Weaknesses. *J Hepatol*. 2011 Sep;55(3):683-691.

85. Lucena MI, Andrade RJ. Increasing the detection of hepatotoxic response in clinical practice: a quality commitment. *Rev Esp Enferm Dig.* 2005 Mar;97(3):145-153.
86. Lindquist M. Data quality management in pharmacovigilance. *Drug Saf.* 2004;27(12):857-870.
87. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology.* 2002 Aug;36(2):451-455.
88. Ocete Hita E, Martin Garcia JA, Gimenez Sanchez F, Flores Gonzalez JC, Abril Molina A, Salmeron Escobar J, et al. Hepatotoxicity due to drugs or natural products in children. *An Pediatr (Barc)* 2012 Sep 24.
89. Hita EO, Garcia JA, Gonzalez JC, Molina AA, Cordero MA, Escobar JS, et al. Amoxicillin-clavulanic acid hepatotoxicity in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012 Dec;55(6):663-667.
90. Ocete-Hita E, Sameron-Fernandez MJ, Gonzalez Gomez JM, Urrutia Maldonado E, Salmeron Ruiz M, Ruiz-Extremuera A, et al. Hepatotoxicity from the Consumption of Herbalist Products by a Paediatric Population. *Nutr Hosp.* 2015 Aug 1;32(2):652-655.
91. Fontana RJ, Watkins PB, Bonkovsky HL, Chalasani N, Davern T, Serrano J, et al. Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) prospective study: rationale, design and conduct. *Drug Saf* 2009;32(1):55-68.
92. Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract* 2010;2010:240365.
93. Marcadante K, Behrman R, Jenson H, Kliegman RM. Nelson. *Pediatría Esencial.* Séptima ed.: Elsevier; España, 2015. ISBN: 9788490228012
94. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006 Feb 24;124(4):783-801.
95. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 2005 Jun;5(6):472-484.
96. Ahmed R, Bevan MJ, Reiner SL, Fearon DT. The precursors of memory: models and controversies. *Nat Rev Immunol* 2009 Sep;9(9):662-668.
97. Murphy K., Travers P. & Walport M. (2012) *Janeway's Immunobiology* (8th Ed.) Garland Science, Nueva York
98. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 2009 May;229(1):5-11.
99. Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2009 May;229(1):41-66.
100. Regueiro J.R., López C., González S. & Martínez E. (2011) *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune.* (4ª Ed.) Editorial Médica Panamericana, Madrid

101. O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 2006 Jan;117(1):1-10.
102. McQueen KL, Parham P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol* 2002 Oct;14(5):615-621
103. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008 May;9(5):495-502.
104. Lopez-Botet M, Fontan G, Garcia Rodriguez MC, de Landazuri MO. Relationship between IL 2 synthesis and the proliferative response to PHA in different primary immunodeficiencies. *J Immunol* 1982 Feb;128(2):679-683.
105. Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol* 2011 Dec;46(4):216-228.
106. Kelley J, Walter L, Trowsdale J. Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genetics* 2005;1:129-139.
107. Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology* 2010 Jan;129(1):8-19.
108. Garcia CA, Robinson J, Guethlein LA, Parham P, Madrigal JA, Marsh SG. Human KIR sequences 2003. *Immunogenetics* 2003 Jul;55(4):227-239.
109. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006 Mar 20;203(3):633-645.
110. Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, et al. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet* 2007 Sep;39(9):1114-1119.
111. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 2011 Mar;132(3):315-325.
112. Dunphy SE, Guinan KJ, Chorcora CN, Jayaraman J, Traherne JA, Trowsdale J, et al. 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. *Genes Immun* 2015 Jul- Aug;16(5):301-310.
113. Vojvodic S, Ademovic-Sazdanic D. KIR and HLA haplotype analysis in a family lacking the KIR 2DL1- 2DP1 genes. *Balkan J Med Genet* 2015 Dec 30;18(1):55-64.
114. Martin AM, Kulski JK, Gaudieri S, Witt CS, Freitas EM, Trowsdale J, et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene* 2004 Jun 23;335:121-131.
115. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002 Dec;190:40-52.

116. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* (2002) 20:217-51
117. Schmitt N, Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr Opin Immunol* 2015 Jun;34:130-136.
118. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-190.
119. Beebe AM, Cua DJ, de Waal Malefyt R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). *Cytokine Growth Factor Rev* 2002 Aug-Oct;13(4-5):403-412.
120. Iañez Pareja E. curso de inmunología General. Seminarios de la universidad de Granada, 1999. Disponible online en <https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/inmuno.htm>.
121. Alhamad EH, Cal JG, Shakoor Z, Almogren A, AlBoukai AA. Cytokine gene polymorphisms and serum cytokine levels in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Med Genet* 2013 Jul 1;14:66-2350-14- 66.
122. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL-10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*. 1997;46:20-8.
123. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8.
124. Qidwai T, Khan F. Tumour Necrosis Factor Gene Polymorphism and Disease Prevalence. *Scand J Immunol* 2011;74(6):522-547.
125. Chen S, Wang Q, Wu Z, Wu Q, Li P, Li Y, et al. Associations between TNF-alpha-308A/G polymorphism and susceptibility with dermatomyositis: a meta-analysis. *PLoS One* 2014 Aug 7;9(8):e102841.
126. Gajewski PD, Hengstler JG, Golka K, Falkenstein M, Beste C. The functional tumor necrosis factor alpha (308A/G) polymorphism modulates attentional selection in elderly individuals. *Neurobiol Aging* 2013 Nov;34(11):2694.e1-2694.e12.
127. Al-Mohaya MA, Al-Otaibi L, Al-Harhi F, Al Bakr E, Arfin M, Al-Asmari A. Association of genetic polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 gene with oral lichen planus susceptibility. *BMC Oral Health* 2016 Aug 20;16(1):76-016-0277.
128. Reichert S, Schlitt A, Benten AC, Hofmann B, Schaller HG, Schulz S. Data on IL-6 c.-174 G>C genotype and allele frequencies in patients with coronary heart disease in dependence of cardiovascular outcome. *Data Brief* 2016 Jul 16;8:1295-1299.
129. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. The major histocompatibility complex and its functions. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* New York; 2001

130. Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 1997 Apr 18;89(2):167-170.
131. Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med* 1990 Feb 22;322(8):510-517.
132. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 2008 Aug;8(8):607-618.
133. Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000 Mar 20;191(6):927-936.
134. Shah RR. Can pharmacogenetics help rescue drugs withdrawn from the market? *Pharmacogenomics* 2006 Sep;7(6):889-908.
135. Romon I, Montes C, Ligeiro D, Trindade H, Sanchez-Mazas A, Nunes JM, et al. Mapping the HLA diversity of the Iberian Peninsula. *Hum Immunol* 2016 Jul 1.
136. Eade OE, Grice D, Krawitt EL, Trowell J, Albertini R, Festenstein H, et al. HLA A and B locus antigens in patients with unexplained hepatitis following halothane anaesthesia. *Tissue Antigens* 1981;17(4):428-432.
137. Otsuka S, Yamamoto M, Kasuya S, Ohtomo H, Yamamoto Y, Yoshida TO, et al. HLA antigens in patients with unexplained hepatitis following halothane anesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1985 Jul;29(5):497-501.
138. Berson A, Freneaux E, Larrey D, Lepage V, Douay C, Mallet C, et al. Possible role of HLA in hepatotoxicity. An exploratory study in 71 patients with drug-induced idiosyncratic hepatitis. *J Hepatol* 1994 Mar;20(3):336-342.
139. Thatishetty AV, Agresti N, O'Brien CB. Chemotherapy-Induced Hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease* 2013 November 1;17(4):671-686.
140. Ohta Y, Matsura T, Kitagawa A, Tokunaga K, Yamada K. Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species contribute to the development of Dgalactosamine-induced liver injury in rats. *Free Radic Res* 2007;41:135-44.
141. Hadi NR, Al-Amran FG, Swadi A. Metformin ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Pharmacother* 2012;3:248-53
142. Vincenzi B, Armento G, Spalato Ceruso M, Catania G, Lealos M, Santini D, et al. Drug-induced hepatotoxicity in cancer patients - implication for treatment. *Expert Opin Drug Saf* 2016 Sep;15(9):1219-1238.
143. Stanulla M, Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2009 Jan;46(1):52-63.

144. Šumar JS, Rašković AL, Kolarović JL, Milanović IM, Konstantinidis NV, Milijašević BŽ, et al. The influence of detoxification agents on the intensity of side effects caused by medium-high doses of methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia: Case series. *Hospital Pharmacology- International Multidisciplinary Journal* 2014;1(2):61-67.
145. Astigarraga I. Histiocitosis. En: Moro M, Malaga S, Madero L. Cruz, tratado de Pediatría. 11 ed. Madrid, Editorial Médica Panamericana; 2014. P. 1967-71.
146. Vaiselbuch SR, Bryceson YT, Allen CE, Abla O. Updates on histiocytic disorder. *Pediatr Blood Cancer*. 2014; 61: 1329-35
147. Silverman LB, Sallan SE. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. *Curr Opin Hematol*. 2003;10(4):290-6.
148. Rocha JC, Cheng C, Liu W. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005;105(12):4752-8.
149. Kara M, Kelly MD. Acute Lymphoblastic Leukemia. En: Weiner MA, Cairo MS, eds. *Pediatric Hematology/Oncology Secrets*. Philadelphia. Hanley and Belfus Inc.; 2002. p. 109-14.
150. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG. Acute Lymphoblastic Leukemia. Principles and practice of pediatric oncology. En: Pizzo A, Poplack D, eds. Capítulo 19. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2011. p. 518-65.
151. Pui CH, Carrol WL, Meschini S, Arceci R. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 551-65.
152. Hutchinson RJ., Gaynon PS, Sather H., et al. Intensification of therapy for children with lower-risk acute lymphoblastic leukemia: long-term follow-up of patients treated on Children's Cancer Group Trial 1881. *J Clin Oncol*. 2003; 21(9): 1790-7.
153. Pui CH, Campana D, Evans E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia – current status and future perspectives. *Lancet Oncol*. 2001; 2: 597-607.
154. Ravindranath Y. MBBS. Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2003; 15: 23-35.
155. SEHOP 2014. Protocolo Leucemia Aguda Linfoblástica/ SEHOP-PETHEMA 2014 (online). Disponible en <http://www.sehop.org>
156. George P, Hernandez K, Hustu O, Borella L, Holton C, Pinkel D. A study of total therapy of acute lymphocytic leukemia in children. *J. Pediatr*. 1968;72:399-408.
157. Aur RJ, Simon J, Hustu O, Walters T, Borella L, Pratts C y cols. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. *Blood* 1972;37:272-281
158. Riehm K [Structure of the skull in early man as an expression of his life in the forest and his subsequent development]. *Gegenbaurs Morphol Jahrb*. 1980;126:884-99

159. Bhatia S, Landier W, Hageman L, Kim H, Chen Y, Crews KR. 6MP adherence in a multiracial cohort of children with acute lymphocytic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2014;124:2345-53.
160. Moriyama T, Relling MV, Yang JJ. Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015;125:3988-95.
161. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, Yang JJ; Dandekar S, Patel JP. Relapse specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Genet* 2013b;45:290-4.
162. Mulligan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith e, Dalton JD. Genome-wide analysis of genetic alteretions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*.2007;446:758-64.
163. Ribera JM 2017. Leucemia aguda linfoblástica: de la aminopterina a los CART. LIX Congreso nacional de la Sociedad Española de Hemtología y Hemoterapia. Málaga.
164. Denton CC, Rawlins YA, Oberley Mj, Bhojwani D, Orgel E. Predictors of hepatotoxicity and pancreatitis in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated according to contemporary regimens. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;65:e26891.
165. Hamilton M, Wolf JL, Rusk J, et al. Effects of smoking on the pharmacokinetics of erlotinib. *Clin Cancer Res* 2006;12:2166–71.
166. Ramadori G, Cameron S. Effects of systemic chemotherapy on the liver. *Ann Hepatol*. 2010 Apr-Jun;9(2):133-43.
167. Zafrani ES, Leclercq B, Vernant JP, et al. Massive blastic infiltration of the liver: a cause of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1983;3:428–32.
168. Halonen P, Mattila J, Ruuska T, Salo MK, Makiperna A. Liver histology after current intensified therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: microvesicular fatty change and siderosis are the main findings. *Med Pediatr Oncol* 2003;40:148-54.
169. Halonen P, Salo MK, Schmiegelow K, Makiperna A. Investigation of the mechanisms of therapy- related hypoglycaemia in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Acta Paediatr* 2003; 92:37-42.
170. Fu SH, Flannery AH, Thompson Bastin ML. Acute Hepatotoxicity After High-Dose Cytarabine for the Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia: A Case Report. *Hosp Pharm* 2019 Jun;54(3):160-164.
171. Marasco G, Scaioli E, Renzulli M, Colecchia A, Golfieri R, Festi D, Bazzoli F, Digby RJ, Belluzzi A. MRI Patterns in a Case of 6-Thioguanine-Related Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2016 Jun;111(6):767.

172. Citterio Quentin A, El Mahmoudi A, Perret T, Conway A, Ryan A, Beringer A, Lanchaux A, Bouliou R. Red Blood cell IMPDH activity in adults and children with or without azathioprine: Relationship between thiopurine metabolites, ITPA and TPMT activities. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2019 May;124(5):600-606.
173. Milosevic G, Kotur N, Krstovski N, Lazic J, Zukic B, Stankovic B, Janic D, Katsila T, Patrinos GP, Pavlovic S, Dokmanovic L. Variants in TPMT, ITPA, ABCC4 and ABCB1 Genes As Predictors of 6-mercaptopurine Induced Toxicity in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Med Biochem*. 2018 Jul 1;37(3):320-327.
174. Stocco G, Franca R, Verzegnassi F, Londero M, Rabusin M, Decorti G. Multilocus genotypes of relevance for drug metabolizing enzymes and therapy with thio - purines in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Front Genet*. 2013;3:1.
175. Azimi F, Mortazavi Y, Alavi S, Khalili M, Ramazani A. Frequency of ITPA gene polymorphisms in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia and prediction of its myelosuppressive effects. *Leuk Res*. 2015;39(10):1048.
176. Banerjee M, Marensi V, Conseil G, Le XC, Cole SP5, Leslie EM. Polymorphic variants of MRP4/ABCC4 differentially modulate the transport of methylated arsenic metabolites and physiological organic anions. *Biochem Pharmacol*. 2016 Nov 15;120:72-82.
177. Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Piñan MA, Sanchez de Toledo J, Garcia de Andoin N, Garcia-Miguel P. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23:53.
178. Rajalingham S, Lai Chan GC, Koh E, Leong KP. Methotrexate Hepatotoxicity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *ScientificWorldJournal*.2014;2104:823763
179. Kumari TP, Shanvas A, Mathews A, Kusumakumary P. Hepatocellular carcinoma: a rare late event in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000;22:289.
180. Moya P, Corominas H, Salazar J, Baiget M. Farmacogenetica del metotrexato. *Reumatol Clin Supl*. 2016;11(1):8-15.
181. Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Del Moral-Hernandez O, Illades-Aguir B, Gómez-Santamaria J, Rivera-Ramírez AB, Saavedra-Herrera MV, Jimenez-López MA, Leyva-Vázquez MA. Deregulation of folate pathway gene expression correlates with poor prognosis in acute leukemia. *Oncol Lett*. 2019 Sep;18(3):3115-3127.
182. Salazar J, Moya P, Altes A, Diaz-Torne C, Casademont J, Cerda-Gabaro D, et al. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? *Pharmacogenomics*. 2014;15:1079-90.

183. Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, Milic V, Novakovic I, Damjanovic T, et al. Association of the TYMS 3G/3G genotype with poor response and GGH 354GG genotype with the bone marrow toxicity of the methotrexate in RA patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69:377-83.
184. Plaza-Plaza JC, Aguilera M, Cañadas-Garre M, Chemello C, González-Utrilla A, Faus Dader MJ, et al. Pharmacogenetic polymorphisms contributing to toxicity induced by methotrexate in the southern Spanish population with rheumatoid arthritis. *OMICS.* 2012;16:589-95.
185. Samara SA, Irshaid YM, Mustafa KN. Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2014;52:746-55.
186. Yanagimachi M, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Miyamae T, et al. Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71:237-43.
187. Khorwal G, Chauhan R, Nagar M. Effect of cyclophosphamide on liver in albino rats: a comparative dose dependent histomorphological study. *International Journal of Biomedical and Advance Research.* 2017;8(3):102–107
188. Nandini B, Sneha Guruprasad K, Supriya P, Vidya M. Toxic Effects of Different Doses of Cyclophosphamide on Liver and Kidney Tissue in Swiss Albino Mice: A Histopathological Study. *Ethiop J Health Sci.* 2018 Nov; 28(6): 711–716.
189. Helsby NA, Yong M, van Kan M, de Zoysa JR, Burns KE. The importance of both CYP2C19 and CYP2B6 germline variations in cyclophosphamide pharmacokinetics and clinical outcomes. *Br J Clin Pharmacol.* 2019 Sep;85(9):1925-1934.
190. Shu W, Guan S, Yang X, Liang L, Li J, Chen Z, Zhang Y, Chen L, Wang X, Huang M. Genetic markers in CYP2C19 and CYP2B6 for prediction of cyclophosphamide's 4-hydroxylation, efficacy and side effects in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Clin Pharmacol.* 2016 Feb;81(2):327-40.
191. DeLeve LD. Cancer chemotherapy. In, Kaplowitz N, DeLeve LD, eds. *Drug-induced liver disease.* 3rd ed. Amsterdam Elsevier, 2013, p. 551.
192. Tang C, Lindsay J, Gill A, Kerridge I. Defibrotide Use in Vincristine-induced Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017 Aug;17(8):539-541.
193. Aldoss I, Douer D, Behrendt CE, Chaudhary P, Mohrbacher A, Vrona J, Pullarkat V. Toxicity profile of repeated doses of PEG-asparaginase incorporated into a pediatric-type

- regimen for adult acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol*. 2016 Apr;96(4):375-80. doi: 10.1111/ejh.12600.
194. Fernández Delgado R, Mares Diago FJ. Linfomas no Hodgkin. En: Madero L, Lasssaleta A, Sevilla J. *Hematología y oncología pediátricas*. 3ª edición. Madrid, Editorial Ergón; 2015. p 533-42.
195. Schmidt S, Burkhardt B. Lymphoblastic lymphoma in childhood and adolescent. *Pediatr Hematol Oncol*. 2013; 6: 484-508.
196. Van Vueren A, Meyer-Wentrup. New targets for antibody therapy of pediatric B cell lymphoma. *Pediatric Blood Cancer*. 2014; 61: 2158-63.
197. Aburto M, Capelastegui A. Histiocitosis de células de Langerhans pulmonar en adultos: una vieja desconocida. *Med Clin (Barc)* 2014; 143: 444-5.
198. Astigarraga I. Histiocitosis. En: Madero L, Lasssaleta A, Sevilla J. *Hematología y oncología pediátricas*. 3ª edición. Madrid, Editorial Ergón; 2015. p 543-49.
199. Demellawy DE, Young LJ, De Nanassy J, et al. Langerhans cell histiocytosis: a comprehensive review. *Royal Collage of Pthologist of Australasia*. 2015; 47: 294-301.
200. LCH-IV International Collaborative Treatment Protocol for Children and Adolescents with Langerhans cell histiocytosis. EudraCT Nr.: 2011.
201. Barrett JS, Patel D, Dombrowsky E, Bajaj G, Skolnik JM. Risk assessment of drug interaction potential and concomitant dosing pattern on targeted toxicities in pediatric cancer patients. *AAPS J*, 2013; 15: 775-786
202. Hunt CM, Papay JI, Stanulovic V, Regev A. Drug rechallenge following drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2017; 66: 646-654
203. Ghabril M, Chalasani N, Björnsson E. Drug-induced liver injury: A clinical update. *Curr Opin Gastroenterol*, 2010; 26: 222-226
204. Licata A. Adverse drug reactions and organ damage: The liver. *Eur J Intern Med*. 2016; 28: 9-16
205. Mansfield SA, Rudek MA, Vulih D, Smith GL, Harris PJ, Ivy SP. The effect of hepatic impairment on outcomes in phase I. Clinical trials in cancer subjects. *Clin Cancer Res*. 2016; 22: 5472-5476.
206. Floyd J, Mirza I, Sachs B, Perry MC. Hepatotoxicity of chemotherapy. *Seminars in Oncology*. 2006; 33: 50-67.
207. Senior JR. Unintended hepatic adverse events associated with cancer chemotherapy. *Toxicol Pathol*. 2010; 38: 142-147

208. Parks D, Lin X, Painter JL, Cheng J, Hunt CM *et al.* A proposed modification to Hy's law and Edish criteria in oncology clinical trials using aggregated historical data. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2013; 22: 571-578.
209. Yi ES, Choi YB, Choi R, Lee NH, Lee JW, Yoo KH¹, Sung KW, Lee SY, Koo HH. NUDT15 Variants Cause Hematopoietic Toxicity with Low 6-TGN Levels in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res Treat.* 2018 Jul; 50 (3): 872-882.
210. He J, Liu L. Significance of NUDT15 gene in individualized treatment with 6-mercaptopurine in children with acute lymphoblastic leukemia. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2019 Jan; 21 (1): 100-104.
211. Stephens C, Moreno-Casares A, Lopez-Nevot MA, García-Cortés M, Medina Caliz I, Hallal H, et al. Killer Inmunoglobulin-Like Receptor Profiles are not associated with risk of amoxicillin-clavulanate induced liver injury in Spanish patients. *Front Pharmacol.* 2016 Aug26;7:280.
212. Groenen PM. Conference scene: Four decades of modern pharmacogenomics: from promise to clinical utility. *Pharmacogenomics.* 2011 septembre 1;12(9):1249-1252.

12. ANEXOS

ANEXO 1: Escasa de causalidad CIOMS/RUCAM

PATRÓN ENZIMÁTICO	TIPO HEPATOCELULAR		TIPO COLESTÁSICO O MIXTO		
TIEMPO DESDE INICIO					
Incompatible	La reacción ocurre antes de la ingesta del fármaco, o más de 10 días después de finalizar (excepto para fármacos de metabolismo lento)		La 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 documentación.
	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 días o > 90 días	> 25 días	< 5 días o > 90 d	> 90 días	+ 1
CON FINAL DEL TRATAMIENTO					
- Compatible	< 15 días	< 15 días	< 30 días	< 30 días	+ 1
EVOLUCIÓN	Diferencia entre el pico de ALT y el límite superior de valores normales		Diferencia entre el pico de FA y el límite superior de valores normales		
DESPUÉS DE CESAR LA INGESTA					
- Altamente 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
- Inconcluso.	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 LO CONTINÚA TOMANDO					
- Inconclusivo.	En todas las situaciones.		En todas las situaciones.		0
FACTORES DE RIESGO	Etanol		Etanol o embarazo		
Presencia					+ 1
Ausencia					0
Edad > 50 años					+ 1
Edad < 50 años					0
TRATAMIENTO CONCOMITANTE					
- No o no información o tratamiento concomitante con incompatibilidad desde el inicio del tratamiento.					0
- Tratamiento concomitante compatible o sugestiva desde el inicio del 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): Reciente infección viral con VHA (IgM antiVHA) oVHB (IgM antiVHB) o VHC (anti VHC y test no A no B), obstrucción biliar (ultrasonografía), alcoholismo (AST/ALT > 2), historia reciente de hipotensión aguda (particularmente si hay enfermedad cardíaca).	- Todas las causas (grupos I y II) razonablemente descartadas.				+ 2
	- Las 6 causas del grupo I razonablemente descartadas.				+ 1
GRUPO II: Complicaciones de enfermedad subyacente: clínica y/o biológico. Contexto sugerente de infección por CMV, VEB o herpes virus.	- 4 ó 5 causas del grupo I razonablemente descartadas.				0
	- 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 ADMINISTRACIÓN					
- Positiva.	Duplica ALT con el fármaco a solas. Duplica ALT con los fármacos juntos dados al mismo tiempo en la primera introducción.		Duplica FA (o TB) con el fármaco a solas. Duplica FA (o TB) con los fármacos juntos dados al mismo tiempo en la primera introducción.		+ 3
- Compatible.	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.		+ 1
- Negativa.	Otras situaciones.		Otras situaciones.		- 2
- No dada o no interpretable.					0
Definida o altamente probable > 8. Probable 8-6. Posible 3-5. Improbable 1- 2					

ANEXO 2: Protocolo de recogida de datos de los casos sospechosos de DILI

N.º de Historia clínica . _____
 Nombre, apellidos _____
 Edad (fecha nacimiento) _____
 Sexo: 1. Varón 2. Mujer _____
 Peso (kg) _____
 Talla (cm) _____
 Superficie corporal (SC peso talla/3.600) (m2) _____
 Procedencia: 1. Hospital 2. Atención primaria _____
 Localidad: 1, Almería; 2, Cádiz; 3, Córdoba; 4, Granada; 5, Huelva; 6, Jaén; 7, Málaga; 8, Sevilla; 9, Madrid; 10, Otro _____
Medicamento(s) sospechoso(s) de causar la reacción (principio activo)
Especialidad farmacéutica (nombre comercial)
 Dosis diaria total (mg) _____
 Intervalo (h) _____
 Vía administración: 1, Oral; 2, intravenoso; 3, intramuscular; 4, sublingual; 5, rectal; 6, aerosol; 7, tópica; 8, otros . _____
 Indicación que motivó su prescripción: _____
 Fechas del tratamiento: desde (día/mes/año) _____
 hasta (día/mes/año) _____
 Duración del tratamiento (días) _____
 Dentro de este período ¿cuándo apareció la reacción _____
 ¿Desapareció la reacción al suspender la medicación?
 1, Sí; 2, no; 3, no procede _____
 ¿Reapareció al reemprender el medicamento?
 1, Sí; 2, no; 3, no procede _____
 Tiempo de resolución de la reacción (días) _____
Descripción de la(s) reacción(es) adversa(s)
 (incluyendo resultados relevantes de exploración o de laboratorio) y signos/síntomas extrahepáticos
 Astenia, anorexia: 1, sí; 2, no Exantema: 1, sí; 2, no Prurito: 1, sí; 2, no
 Ictericia: 1, sí; 2, no Eosinofilia: 1, sí; 2, no Fiebre: 1, sí; 2, no
Medicamentos concomitantes
 Prescritos o por automedicaciones ingeridos por la madre en período de lactancia (excluyendo los usos para tratar la reacción adversa)

Preparado	Dosis diaria	Vía	Indicación	Duración
_____	Desde _____	_____	_____	Hasta _____
_____	Desde _____	_____	_____	Hasta _____
_____	Desde _____	_____	_____	Hasta _____
_____	Desde _____	_____	_____	Hasta _____
_____	Desde _____	_____	_____	Hasta _____

(Continuación)

Datos importantes de la historia clínica

Alergias, metabopatías congénitas, test de Apgar, peso al nacer, tipo alimentación, estado nutricional, antecedentes obstétricos, test de Coombs, medicamentos ingeridos por la madre en la gestación y la lactancia

Pruebas diagnósticas

ECG, TC, colangiografía, niveles plasmáticos de medicamento y/o sus metabolitos, etc.

Biopsia hepática

Descripción y fecha de su realización

Determinación de niveles plasmáticos

Desenlace de la reacción (señale lo que proceda)

Resolución espontánea, requirió tratamiento, persistencia de la reacción adversa, necesidad de hospitalización, necesidad de prolongar

hospitalización previa, incapacidad permanente o significativa, recuperación, la vida del paciente ha estado en peligro, fallecimiento

Antes del tratamiento (fecha) Inicial (fecha) Evolución (fecha)

Evolución (fecha) Al alta (fecha)

Datos bioquímicos

Glucosa

Urea

Creatinina

Proteínas totales

Albúmina

Alfa-1 (g/l)

Alfa-2

Beta

Gamma globulinas

Bilirrubina total (n _____)

Bilirrubina directa

AST (rango _____)

ALT (rango _____)

GGT (rango _____)

Fosfatasa alcalina (rango _____)

Hierro

Transferrina

Cobre

Ceruloplasmina

Inmunoglobulina M

Inmunoglobulina G

Inmunoglobulina A

Hemograma

Hemates

Hemoglobina

Hematócrito

VCM

VSG

Plaquetas

Actividad de protrombina

Leucocitos

Polimorfonucleares

Linfocitos

Monocitos

Eosinófilos

Basófilos

Iniciales (fecha) Evolución (fecha) Alta (fecha)

Marcadores

IgM anti-HVA

HBsAg

Anti-HBc

Anti-HCV: ELISA

Anti-HCV: RIBA

Anti-HCV: PCR

Anti-HEV

CMV IgM

VEB IgM

Otros

Autoanticuerpos

ANA

AML

AMA

Anti-LKM-1

Factor reumatoide

Alfa-1-antitripsina (n ...)

Células LE

(continuación)

Tabla 1 (Continuación)

Exclusión de otras causas

Malformaciones congénitas

- Atresia de vías biliares
- Quiste congénito de colédoco
- Enfermedad de Caroli
- Estenosis de colédoco terminal

Tumores hepáticos y de vías biliares

Tóxicos

- Alcohol
- Tóxicos industriales (colas, pegamentos, barnices, juguetes de vinilo, etc.)
- Drogas ilegales
- Toxinas (plantas, hongos)

Enfermedades neuropáticas

Enfermedades sistémicas con afectación hepática

- Enfermedad inflamatoria intestinal
- Artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico
- Poliarteritis nodosa
- Insuficiencia cardíaca
- Hipo o hipertiroidismo
- Transfusiones múltiples
- Traumatismos graves abdominales
- Anoxia, hipoxia

Vacunas

Anemias hemolíticas

- Congénitas
- Adquiridas

Hepatitis posquirúrgicas

- Anestesia por halotano
- Infecciones bacterianas
- Hipoxia
- Hipotensión
- Otros fármacos

Embarazo

Tanajeros

Hiperbilirrubinemia fisiológica

- Recién nacido
- Lactancia materna

Infecciones víricas

- Hepatitis A, B, C, D
- Citomegalovirus
- Toxoplasma
- Epstein-Barr
- SIDA
- Sarampión
- Herpes simple
- Virus de la varicela-zoster
- Rubéola
- Coxsackie
- Echovirus

Infecciones protozoarias:

- Toxoplasma

Pneumocystis carinii

Infecciones bacterianas

- Sepsis, salmonelosis, brucelosis

Parasitosis intestinales

Alteraciones metabólicas

- Síndrome de Gilbert
- Enfermedad de Wilson
- Déficit de alfa-1-antitripsina
- Fibrosis quística
- Glicogenosis
- Galactosemia

Tirosinemia

ANEXO III: Recogida de muestras de sangre para el protocolo de estudio de hepatopatías asociadas a medicamentos en pediatría.

Se recogerán de los pacientes en los que se sospeche hepatopatía asociada al consumo de fármacos:

- 2 tubos de sangre total en EDTA (K2E, tapón lila) de 4.0ml ó 3.5ml.
- 1 tubo para la separación del suero (bioquímica, tapón amarillo) de 8.5ml.

Se guardan los tubos en la nevera (2-8 °C) y a los 15 min aproximadamente se centrifugan a: 4°C, 3000 rpm, 15 min. Los tubos después de la centrifugación se alicuotan en tubos eppendorf de 1.5 ml y se guarden a -80°C.

Los tubos tienen que estar identificados con el nombre, apellidos del paciente y la fecha extracción así como el tipo de muestra (suero, plasma o células) (esto último si están alicuotadas).

Si resulta más conveniente se puede proceder a la separación de los elementos y congelación a -80°C.

Extracción de 10 ml de sangre en un tubo con EDTA (tapa lila). Tubo de bioquímica. Proceder rápidamente a centrifugar. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos. Aspirar con pipeta Pasteur el plasma sobrenadante sin tocar la capa de células blancas que cubre a las células rojas, y pasarlo a tubos eppendorf etiquetarlos y congelar a -80°. Del tubo de bioquímica extraer el suero, alicuotar y congelar a -80°C. Tapar el tubo con la sangre, mezclarlo y verterlo haciendo alicuotas en tubos eppendorf (2-3). Etiquetarlos y congelar a -20°C.

Mandar a Granada a través de servicio de mensajería urgente para que lleguen en 24-48 horas.

INSTRUCCION ESPECÍFICA PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y DATOS ASOCIADOS AL NODO DEL COMPLEJO HOSPITALARIO GRANADA DEL BIOBANCO PARA INVESTIGACION DEL SSPA desde los centros participantes en el estudio "Análisis de factores inmunogenéticos (HLA, polimorfismos IL-10 y genotipo KIR) en la hepatotoxicidad idiosincrásica en población pediátrica. Consolidación del Registro (Código de Registro en Biobanco 037120008)

Identificación de donantes: Se incluirán en el estudio todos los donantes pediátricos, neonatos y niños que, a juicio del médico responsable en los diferentes hospitales participantes, presenten una sospecha de hepatopatía asociada a la ingesta de medicamentos, productos de herboristería, drogas o tóxicos.

Criterios de inclusión: Niños con edad comprendida de 0 a 15 años

La señal de alerta que hará sospechar toxicidad hepática medicamentosa, puede ser una de las siguientes:

- a) > 2LSN (límite superior de la normalidad) de GPT;
- b) > 0,6 mg/dL de bilirrubina conjugada;
- c) > 80 U/L de GOT, > 2 mg/dL de bilirrubina total y >516 U/L de isoenzima hepática de la fosfatasa alcalina (simultáneamente).

Basta la existencia de una de ellas para generar la sospecha.

Todos los casos serán notificados mediante el protocolo estructurado (consultar página web: www.proyecto-paidosham.es/)



TOMA DE MUESTRAS

Cuando esté establecido el diagnóstico de hepatotoxicidad se tomarán dos muestras de sangre de cada paciente,

- Extraer 2 tubos de hemograma (tapón morado)
- Extraer 2 tubos de bioquímica (tapón amarillo)

****En caso de que la extracción sea dificultosa se obtendrá como mínimo un tubo de cada.**



Los tubos deben enviarse identificados, bien con un código rotulado a mano o pegatina.



ENVIO DE MUESTRAS

- Las muestras se enviarán dentro de contenedores de bioseguridad adecuados

- (si no se dispone de ellos contactar previamente con el biobanco Telf. 958 023 651 para que los proporcione)



Se enviará junto a las muestras el formulario: Datos de la donación, indicando el código con el que se han identificado los tubos y una copia del Consentimiento Informado.



Para la tramitar la **RECOGIDA** y envío de las muestras el Hospital Remitente se pondrá en contacto con el Biobanco **el día anterior** o el mismo día **antes de las 11:00:**

Benilde Ayala 958 023 651 /671 599 548
benilde.ayala.exts@juntadeandalucia.es
biobanco.hsc.sspa@juntadeandalucia.es



El Biobanco **enviará al mensajero que recogerá el paquete antes de las 14:00**



ANEXO IV: Consentimiento informado para la donación de muestras biológicas al Biobanco.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. Nodo del Hospital Universitario San Cecilio

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

.....

DNI / NIE: NºSeg. Social:

Apellidos y nombre del/de la representante legal:

.....

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre Fecha Firma

.....

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro bajo mi responsabilidad que he leído y comprendido el Formulario de Información, del que se me ha entregado un ejemplar.

He recibido suficiente información sobre la donación de muestras biológicas

de..... al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quienme ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

-Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencia al que va a someterse o se ha sometido.

.....

.....

Tomadas mediante el procedimiento expreso.....

Asimismo, consiento el tratamiento de los datos clínicos asociados a las muestras.
Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

* Codificada (serán posible volver a ligarlas identificadas con un código que protege mi identidad, siendo conmigo) o

* Anonimizada (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo establecer restricciones respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en

.....

Autorizo que se pueda contactar conmigo posteriormente: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de

hacerlo:.....

Autorizo recibir información sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo revocar, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En _____, a _____ de _____ de _____

Fdo. EL/LA REPRESENTANTE LEGAL
(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)