

CAPÍTULO 15

HEPATITIS ALÉRGICA INDUCIDA POR FÁRMACOS

José V. Castell, Teresa Donato, Marta Castell

FÁRMACOS Y HEPATOTOXICIDAD IDIOSINCRÁSICA

Una reacción adversa es cualquier efecto no deseado, o tóxico, que aparece en el curso de la utilización terapéutica de un compuesto. Algunas de estas reacciones pueden manifestarse, en principio, en cualquier individuo expuesto al fármaco por encima de una determinada concentración (toxicidad intrínseca) y se explican como un efecto farmacológico exagerado o secundario al efecto principal. En otras ocasiones, los efectos adversos se manifiestan de forma esporádica en algunos individuos que reciben dosis terapéuticas del fármaco que no causan efectos secundarios en otros individuos, o que incluso no mostraron dichos efectos las primeras veces que se les administraron. También es frecuente que se presenten asociadas a un órgano específico y que no exista una aparente correlación entre la dosis del fármaco administrada y la magnitud del fenómeno observado, y por tanto suele referirse a ellas como reacciones *idiosincrásicas*, impredecibles. Este tipo de reacciones adversas, que no se deducen de las propiedades farmacológicas del compuesto y que difícilmente pueden ser anticipadas a partir de estudios en animales de laboratorio, son una preocupación importante durante el desarrollo de los fármacos y una desagradable sorpresa cuando acontecen en la práctica clínica (1, 2, 3).

La hepatotoxicidad por fármacos es un fenómeno que ocurre con relativa frecuencia durante las etapas preclínicas de desarrollo farmacéutico, y constituye una de las primeras causas de retirada del candidato a fármaco. Consti-

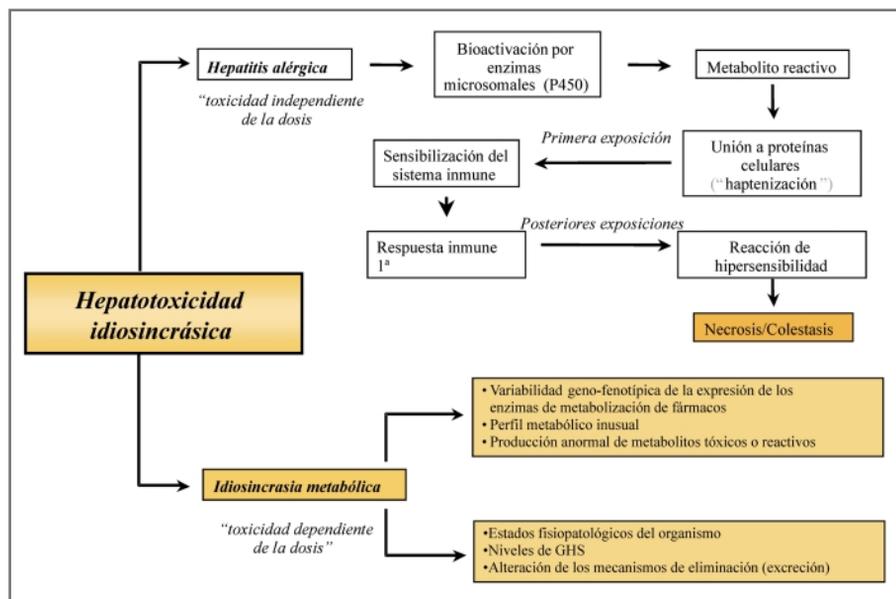


Fig. 1. Tipos de hepatotoxicidad inducida por fármacos. Los fármacos son capaces de causar reacciones adversas con claras manifestaciones hepáticas. Los fenómenos asociados a una hepatotoxicidad idiosincrásica pueden agruparse en dos categorías: los que son la consecuencia de un metabolismo anormal del fármaco, que puede ser consecuencia de la variabilidad geno-fenotípica en la expresión de las enzimas de metabolización de fármacos, estados fisiopatológicos del organismo, alteración de los mecanismos de eliminación (excreción), que se traducen en un perfil metabólico inusual, con la producción anormal de metabolitos tóxicos o reactivos (idiosincrasia metabólica), y aquellos que son la consecuencia de una respuesta exacerbada del sistema inmune dirigida contra los hepatocitos que han estado previamente en contacto con el fármaco (hepatitis alérgica). En el primer grupo, los efectos adversos son dosis-dependiente en los individuos susceptibles y pueden aparecer tras la primera administración del compuesto. En el segundo, los efectos no dependen de la dosis y normalmente se manifiestan tras varios contactos asintomáticos con el fármaco (periodo de sensibilización).

tuye asimismo una observación clínica no infrecuente durante el manejo terapéutico de los fármacos (4, 5). Los fenómenos asociados a una hepatotoxicidad idiosincrásica se pueden agrupar en dos categorías (Fig. 1): los que son consecuencia de un metabolismo anormal del fármaco administrado, con una mayor formación de metabolitos tóxicos en individuos susceptibles (idiosincrasia metabólica), y aquellos que son la consecuencia de una respuesta exacerbada del sistema inmune dirigida contra los hepatocitos que han estado en contacto con el fármaco (hepatitis alérgica). En el primer grupo, los efectos adversos son dosis-dependiente en los individuos susceptibles y pueden aparecer tras la pri-

mera administración del compuesto. En el segundo, los efectos no dependen de la dosis y normalmente se manifiestan tras varios contactos asintomáticos con el fármaco (periodo de sensibilización) (6, 7).

Hay ciertos hechos diferenciales que permiten discriminar entre la hepatitis alérgica y la toxicidad debida a una idiosincrasia metabólica. La primera se presenta siempre tras varias administraciones asintomáticas del fármaco (periodo previo de sensibilización), se observa una recurrencia de la lesión hepática tras la administración fortuita de una pequeña dosis, y con frecuencia se acompaña de eosinofilia, fiebre e infiltrado inflamatorio en el hígado. Las lesiones hepáticas debidas al metabolismo anormal del fármaco no presentan las anteriores características; sus efectos son dosis-dependiente en los individuos susceptibles y pueden aparecer incluso tras la primera administración del medicamento. De una manera simplificada cabe decir que la hepatitis alérgica inducida por fármacos es una reacción de hipersensibilidad que se manifiesta de forma específica o mayoritaria en el hígado y comparte muchos de los mecanismos que se observan en otras reacciones alérgicas, pero las razones que condicionan esta órgano-especificidad son complejas y solo ahora comienzan a ser esclarecidas.

Con relación a la idiosincrasia metabólica, es un hecho constatado la existencia de una significativa variabilidad interindividual en el metabolismo de fármacos en los diferentes individuos/grupos de población humanos. Estas diferencias interindividuales en el patrón metabólico de los fármacos son consecuencia de la significativa variabilidad de los niveles hepáticos de las enzimas implicadas en su metabolismo, cuya expresión está controlada/modulada por factores genéticos, fisiopatológicos y ambientales (8-10). Algunos de estas enzimas son polimórficas, es decir, existen variantes genéticas de las mismas (por ejemplo, ausencia del gen, formas mutadas del gen inactivas o parcialmente activas, duplicación de genes, etc.) lo que conduce a diferencias significativas de la actividad catalítica medida en el hígado. En los pasados años ha sido posible identificar y caracterizar bases moleculares de muchos polimorfismos. Entre ellos los de los citocromos CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6, CYP2E1 y la N-acetiltransferasa (NAT2) (8, 9). Los polimorfismos son solo en parte responsables de la variabilidad observada. La expresión de estos genes no sólo está controlada a nivel genético, sino que también está modulada a nivel transcripcional por otros factores tales como citocinas, hormonas (como ocurre durante ciertos estados patológicos como la inflamación), o la exposición a ciertos xe-

nobióticos que pueden actuar como inductores o inhibidores de su expresión. En definitiva, la variabilidad en la expresión de estas enzimas que tiene una base geno-fenotípica, es la responsable de las diferencias en el patrón de metabolismo de fármacos y, en consecuencia, una causa frecuente de reacciones adversas idiosincrásicas dosis-dependientes (11).

HIPERSENSIBILIDAD HEPÁTICA A FÁRMACOS: MECANISMOS DE SENSIBILIZACIÓN

La hepatitis alérgica es un tipo de toxicidad idiosincrásica consecuencia de una reacción de hipersensibilidad desencadenada por el fármaco y dirigida contra el hígado. Este fenómeno se produce en una sucesión de diferentes etapas precedida por un periodo previo de sensibilización durante el cual el paciente no manifiesta reacciones al fármaco (1). Una vez sensibilizado, la administración del fármaco provoca una reacción del sistema inmune que termina infringiendo algún tipo de daño sobre células, estructuras o funciones hepáticas.

Hay básicamente tres hipótesis que se manejan para explicar el desencadenamiento de la respuesta inmune. La primera de ellas es la hipótesis del hapteno (12), que postula que dado que la mayor parte de los fármacos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular y, en principio, con una baja capacidad inmunogénica, deben unirse previamente a macromoléculas. Durante la metabolización hepática del fármaco pueden generarse metabolitos reactivos capaces de reaccionar con macromoléculas celulares formando conjugados estables con capacidad de desencadenar una respuesta inmunológica (haptización). El grado de unión covalente del fármaco a la proteína depende de la proporción del compuesto que se convierte en una especie química reactiva, de la vida media de ésta última (por ejemplo, teniendo presente la capacidad de la célula para neutralizar y eliminar este tipo de moléculas por conjugación con glutatión) y de su reactividad hacia grupos funcionales de proteínas (13, 14). Los citocromos P450 son los que con mayor frecuencia catalizan las reacciones de bioactivación por las que el fármaco se transforma en un intermediario más reactivo y, en consecuencia, se erigen como dianas potenciales en los procesos de unión covalente. Los conjugados con ácido glucorónico o sulfato pueden sufrir con facilidad un desplazamiento nucleofílico por grupos hidroxilo o amino de

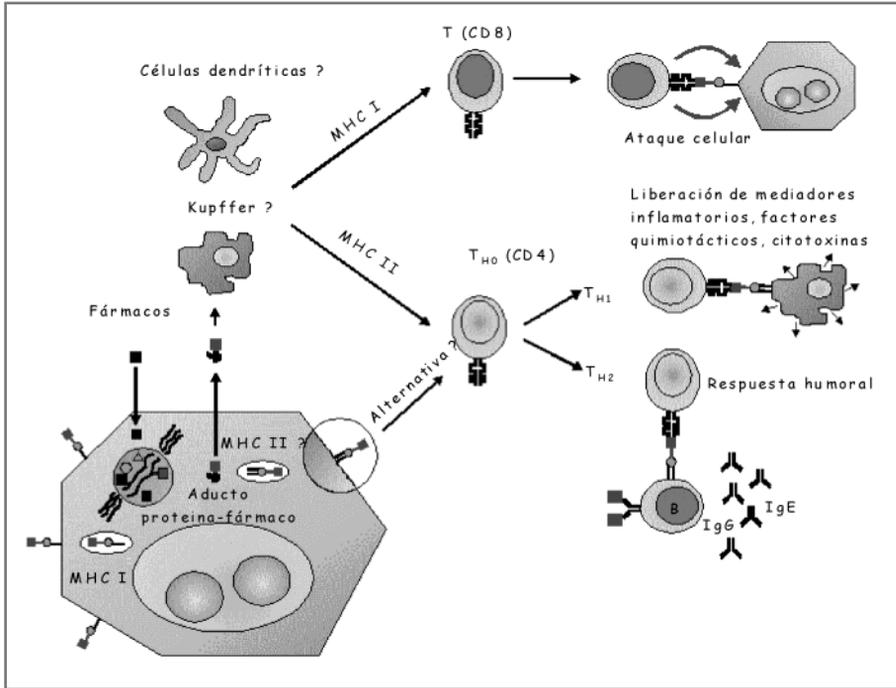


Fig. 2. Mecanismos posiblemente implicados en el desencadenamiento de una reacción de hipersensibilidad hepática a fármacos. Los fármacos, como consecuencia de reacciones de bioactivación que tienen lugar en el transcurso de su metabolismo, pueden dar origen a metabolitos intermedios más reactivos, capaces de reaccionar con moléculas celulares endógenas, principalmente proteínas. Estos intermedios dan origen a aductos fármaco-proteína, con lo que haptenizan a proteínas endógenas. Cuando esos aductos son accesibles a la vigilancia del sistema inmune, comienza una activación inmunológica dirigida contra esos neoantígenos (el fármaco). En el hígado, las células de Kupffer tienen una cierta capacidad de presentar los antígenos a linfocitos Th0 iniciando así la cadena de eventos que llevará a una activación inmune en la que predomine la respuesta celular (Th1, aumento de Tc reactivos, hipersensibilidad tipo IV), o bien de marcado cariz humoral (Th2, aumento de linfocitos B productores de anticuerpos dirigidos contra el fármaco; hipersensibilidad tipo II/I).

los aminoácidos y también constituyen un grupo importante de metabolitos reactivos con capacidad de unión covalente a proteínas (14).

El siguiente paso en el proceso de sensibilización es que el neoantígeno resulte accesible a la vigilancia del sistema inmune (Fig. 2). La vía clásica implica la captación de los aductos fármaco-proteína generados por los hepatocitos por células presentadoras de antígenos, su internalización, procesamiento y asociación con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

antes de su interacción con las células T. Es bien conocido que las células T no pueden interactuar eficazmente con tales antígenos si éstos no están presentes en las membranas celulares adecuadamente asociados con las glicoproteínas codificadas por los genes del MHC (restricción MHC). Las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad que participan en el reconocimiento de antígenos por las células T pertenecen a dos categorías diferentes. Las proteínas MHC de clase I unen péptidos procedentes de antígenos generados intracelularmente e interactúan fundamentalmente con células citotóxicas CD8⁺. Los péptidos derivados de antígenos extracelulares que han sido internalizados, y que van a interactuar con células Th (CD4⁺), son transportados hasta la superficie celular asociados a proteínas MHC de clase II. De este modo, se activarán células CD4⁺ y/o células CD8⁺ en función de cómo se presenten los antígenos (15).

La segunda de las hipótesis es la denominada de alarma propuesta por Matzinger, que postula que no es la naturaleza extraña de la molécula sino señales de alarma generadas por el organismo las que desencadenan la respuesta inmune (16, 17). En el caso de una reacción de hipersensibilidad a fármacos podría ser el daño celular causado por el fármaco (o alguno de los metabolitos) lo que causase esa señal de alarma.

La tercera de las hipótesis, formulada por Pichler, es la denominada interacción farmacológica, y se basa en la observación que algunos clones T de pacientes con historia previa de hipersensibilidad a fármacos son capaces de proliferar en presencia del fármaco y no con los aductos fármaco-proteína, lo que le llevó a proponer que quizás los fármacos pudiesen interactuar directamente con el complejo MHC/receptor de antígeno de célula T e inducir la respuesta inmune (18). Quizás las tres hipótesis no sean auto-excluyentes y la situación real es que posiblemente sean necesarios dos tipos de señales o mecanismos para ponerla en marcha: la primera sería la generación del hapteno, su presentación asociado a MHC y reconocimiento por el receptor de una célula T; la segunda señal sería la interacción de la célula T y la presentadora de antígeno vía señales coestimuladoras tales como B7. En tal caso solo una de las señales (por ejemplo, la 1^a) conduciría a la tolerancia o anergia. Las señales de alarma contribuirían a regular positivamente la expresión de dichas moléculas coestimuladoras facilitando la 2^a señal. Con esa perspectiva el fármaco podría generar la primera de las señales actuando como hapteno o interactuando con el complejo TcR/MHC, mientras que la segunda señal podría ser

un estímulo resultante de la toxicidad y lesión celular causada por el fármaco o su metabolito.

La presentación de antígenos la pueden realizar tres tipos de células profesionales: células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Existen evidencias claras de que los macrófagos hepáticos (células Kupffer) pueden internalizar y procesar los neoantígenos generados en el hígado (19-21). Tras el análisis por electroforesis de un homogenizado de células Kupffer obtenido a partir de ratas tratadas con diclofenac, un fármaco con capacidad para generar aductos con proteínas, su transferencia a membranas de nitrocelulosa e incubación con anticuerpos antidiclofenac, se observaron diferentes bandas correspondientes a aductos del fármaco. El patrón de los principales aductos del fármaco en células Kupffer fue similar al observado en homogenizado de hepatocitos. Sin embargo, cuando las células Kupffer se mantuvieron en cultivo primario la mayor parte de los aductos fármaco-proteína desaparecieron de forma rápida y sólo unos pocos pudieron ser detectados con anticuerpos anti-diclofenac (22). Esta observación, junto con el hecho de que las células Kupffer expresan proteínas MHC-II (20), sugiere el papel de estas células en el procesamiento y presentación de los neoantígenos fármaco-proteína generados por los hepatocitos (19, 20). Las células dendríticas pueden presentar antígenos tanto a través de proteínas MHC clase I como clase II. Su presencia en el entorno de los hepatocitos (a través de un tránsito sangre/linfa-sinusoide, (23)) les confiere un papel potencial en la presentación a linfocitos T de los antígenos generados en los hepatocitos.

Existen fundadas evidencias de que otras células podrían actuar como células accesorias en la presentación de antígenos. Las células endoteliales del sinusoide hepático son singulares en el sentido de que expresan citocinas, factor transformador de crecimiento- β (TGF- β), moléculas de adhesión ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) y VCAM-1, por lo que selectivamente adhieren linfocitos T CD8⁺ activados. Estas células tienen la característica de expresar moléculas coestimulantes IL-1 y B-7, y actuar como presentadoras de antígeno (19, 24) en ausencia de estimulación por citocinas, aunque su papel posiblemente esté más relacionado con la inducción de tolerancia que de sensibilización (25). Las células de Kupffer son activables por endotoxinas tales como lipopolisacárido bacteriano (LPS) y superantígenos bacterianos con la liberación de citocinas capaces de actuar sobre las células NK como las células Kupffer, lo que sugiere que podrían actuar como presentadoras de antígenos en el hígado (19, 24).

Las células de Ito (*stellate cells*) también participan en las respuestas inmunes que tienen lugar en el hígado, y lo hacen gracias a que son capaces de internalizar antígenos así como de expresar MHC clase I y II en su superficie. Las células estrelladas son las mayores productoras de matriz extracelular y están implicadas en los procesos de fibrogénesis hepática.

Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígeno más y mejor especializadas del hígado. Su origen se halla en la médula ósea y actúan como verdaderas presentadoras profesionales, migran con extraordinaria facilidad, y cumplen ese papel de vigilancia continuada tan característico del sistema inmune. En el hígado se encuentran normalmente en el área periportal en estado inmaduro. Una vez activadas, su capacidad para presentar antígenos y para migrar a los nódulos linfáticos, donde presentan los antígenos procesados a los linfocitos, aumenta extraordinariamente.

Finalmente, en el hígado se encuentra también un número significativo de linfocitos T y B. Las células T son de fenotipo CD8⁺ y CD4⁺ así como otras menos convencionales (CD4⁻, CD8⁻ doble negativas CD4⁺, CD8⁺ doble positivas). Esta singular participación de células especializadas en la presentación de antígenos así como poblaciones de linfocitos T sugieren funciones tanto de activación como de tolerancia frente a antígenos con los que el hígado puede encontrarse (bacterianos, alimentarios, fármacos, etc.) (25).

Los hepatocitos, por lo general, expresan pocas moléculas MHC clase I y no expresan proteínas MHC clase II. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, se puede producir una expresión anormal de proteínas MHC-II. El interferón-gamma (26), situaciones de estrés (27) o ciertas patologías (hepatitis autoinmune, cirrosis, colestasis) (28, 29) pueden estimular la expresión de estos genes en los hepatocitos (30). Cabe suponer que en tales situaciones de expresión de MHC-II el hepatocito podría convertirse en una célula presentadora de antígenos no profesional (accesoria) y contribuir a la respuesta inmunológica (Fig. 2). En este contexto, resulta muy sugerente el hecho de que las células T CD4⁺ de pacientes con hepatitis alérgica puedan ser inducidas a proliferar en respuesta a una combinación del fármaco y una proteína específica de la membrana hepática (31). En el caso de la hepatitis autoinmune también se ha observado que clones de células T pueden proliferar en respuesta a hepatocitos que expresan genes tanto de clase I como de clase II. En estos casos el reconocimiento de los hepatocitos por los linfocitos sensibilizados está restringido por el complejo MHC: solo los hepatocitos que expresan MHC-II son capaces de

estimular a clones T (CD4⁺), mientras que los hepatocitos que expresan MHC-I estimulan a los clones T (CD8⁺) (23). Este papel potencial de los hepatocitos como células accesorias presentadoras de antígenos en casos de hepatitis alérgica inducida por fármacos es una atractiva hipótesis que, si bien se ha sugerido a partir de evidencias experimentales, necesita confirmación sobre su funcionalidad *in vivo* (32).

¿CÓMO SE ORIGINA EL DAÑO HEPÁTICO DE ORIGEN INMUNOLÓGICO EN EL TRASCURSO DE LAS HEPATITIS ALÉRGICAS?

La relación existente entre el tipo de respuesta inmune desencadenada por un fármaco y las alteraciones hepáticas observadas a nivel clínico no se han esclarecido en su totalidad. Varios mecanismos inmunológicos se han propuesto para explicar el daño a hepatocitos que puede manifestarse clínicamente tanto en forma de necrosis celular (hepatitis citolítica) con aumento de los marcadores séricos de lesión hepática, como una disfunción celular (típicamente colestasis) con una reducida lesión hepática, o una forma mixta en la que tanto la necrosis como la colestasis son significativas (33).

En un individuo ya sensibilizado, el procesamiento de los aductos fármaco-proteína generados en el hepatocito y su unión a las proteínas MHC de clase I daría lugar a células susceptibles de ataque por células T (CD8⁺) (Fig. 3). Así por ejemplo, clones de células Tc sensibilizadas por diclofenac pueden causar daño en la membrana de hepatocitos que han sido previamente incubados con el fármaco y este ataque puede ser inhibido por la preincubación de los hepatocitos con anticuerpos anti-MHC-I (34). También se ha demostrado que el ligando de Fas participa en la inducción de daño hepático y muerte de hepatocitos (apoptosis) durante el ataque mediado por células T (35). Existen evidencias de un mecanismo de daño hepático de esta naturaleza mediado por linfocitos durante la enfermedad hepática alcohólica (36).

Las células Kupffer ejercen efectos importantes sobre el metabolismo de los hepatocitos. Pueden ser activadas por diferentes estímulos para la liberación de citocinas (TNF- α , IL-6), óxido nítrico (NO) y especies activas de oxígeno (37). Estos mediadores tienen por sí mismos efectos catabólicos muy importantes sobre los hepatocitos (38). La activación de las células Kupffer

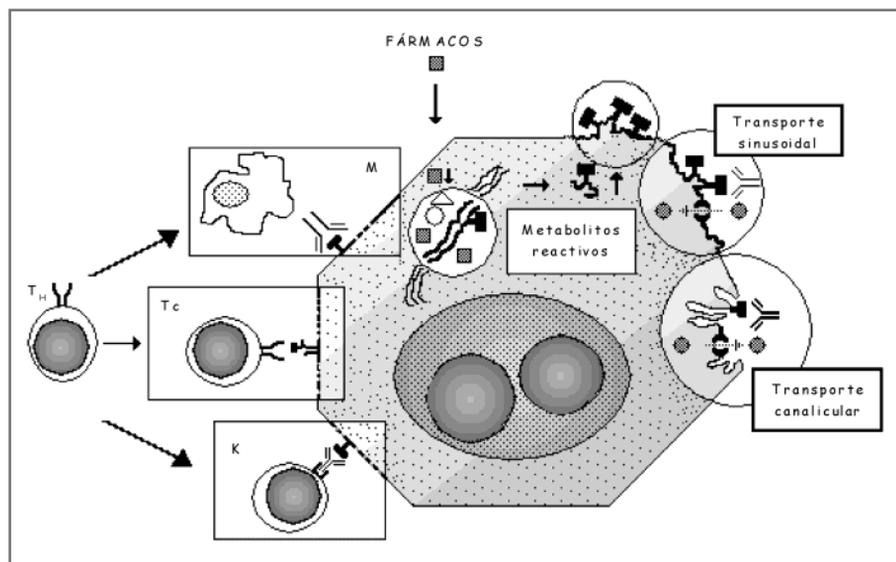


Fig. 3. Posibles mecanismos por los que puede producirse el daño hepático en la hepatitis alérgica por fármacos. En individuos sensibilizados, la formación de aductos fármaco-proteína como consecuencia del metabolismo de dicho fármaco por los hepatocitos, seguido del procesamiento de dichas proteínas hapténizadas por la maquinaria del proteasoma-ubiquitina intracelular y su asociación al complejo MHC-I, que terminará translocándose a la membrana celular, hace a los hepatocitos susceptibles de un ataque por células T (CD8⁺). Los hepatocitos apenas expresan los genes MHC-I, sin embargo la liberación de citocinas inflamatorias por los macrófagos sinusoidales contribuyen a aumentar la expresión del complejo de histocompatibilidad, y en algunos casos (TNF- α) a producir daño a los hepatocitos. Hay evidencias de que anticuerpos dirigidos contra el fármaco facilitan también el mecanismo celular de daño a los hepatocitos. Por último, se ha hipotetizado acerca del papel que la unión de anticuerpos a los antígenos expresados en la membrana del hepatocito (en concreto la membrana canalicular), podrían tener sobre los procesos de transporte. Esta situación parece ocurrir en la colestasis hepática de naturaleza alérgica, en la que no se detecta elevación de transaminasas o de γ -glutamil transpeptidasa (marcador de las células ductales).

parece ser uno de los eventos iniciales en el daño a hepatocitos causado por acetaminofeno (paracetamol) y la eliminación de estas células en un modelo *in vitro* demostró que minimiza las lesiones causadas a los hepatocitos (39). Las células Kupffer también actúan a través de la vía de activación del complemento, como se ha observado en la hepatotoxicidad producida por galactosamina (40).

Diversos datos experimentales han demostrado que las células Kupffer obtenidas a partir de hígado de rata en el que se había inducido daño por xenobióticos son capaces de producir factores quimiotácticos para diferentes cé-

lulas (41). Los leucocitos son atraídos hacia el hígado mediante mecanismos que aún no han sido esclarecidos y su interacción con células Kupffer parece adquirir una relevancia especial en los fenómenos de tolerancia antigénica en el hígado. Uno de los mecanismos propuestos sugiere la interacción de receptores de células T con el complejo antígeno-MHC clase II en la superficie de células Kupffer. Esta interacción estimularía a los linfocitos Th1 a liberar IFN- γ que, en definitiva, induciría una liberación de NO por células Kupffer que bloquearía la proliferación de los Th1. Este control *feedback* se ha propuesto como mecanismo de control de la tolerancia antigénica (42).

La existencia de anticuerpos dirigidos hacia el fármaco, o alguno de sus metabolitos, en pacientes con hepatitis alérgica sugiere que también podrían estar operando mecanismos de lesión celular mediados por anticuerpos (43) (Fig. 3). Los anticuerpos son grandes macromoléculas que no pueden entrar en las células pero sí unirse a antígenos presentes en las membranas celulares. Estudios experimentales en sistemas homólogos (hombre/hombre) y heterólogos (hombre/conejo) han evidenciado la existencia de citotoxicidad mediada por anticuerpos que actúan sobre hepatocitos haptinizados. En tales casos, las células efectoras no son linfocitos, sino macrófagos y/o células K dependientes de anticuerpos (23).

Se ha hipotetizado (44) que la unión de anticuerpos a membranas de hepatocitos haptinizados (membrana canalicular) podría tener como consecuencia la alteración de las propiedades físico-químicas de la membrana e, indirectamente, de la funcionalidad de proteínas localizadas en la misma (transportadores de aniones, enzimas, bombas de iones, etc.), y con ello del transporte de moléculas, lo que en última instancia sería responsable de una menor producción de bilis. Gómez-Lechón y cols. (44) mostraron que el suero de un paciente que padecía colestasis grave debido a una reacción alérgica a eritromicina, contenía anticuerpos contra el fármaco que marcaban intensamente el área circundante al pseudo-canalículo biliar de los hepatocitos humanos que habían sido incubados *in vitro* con el antibiótico.

La colestasis observada en la hepatitis alérgica inducida por fármacos se ha atribuido también a la presencia de una linfocina (denominada factor colestásico) producida por linfocitos de sangre periférica tras la estimulación con el fármaco en presencia de lipoproteína hepato-específica. La inyección de fracciones enriquecidas con este factor en animales de experimentación fue capaz de inducir colestasis (45).

En ocasiones se ha descrito la presencia de autoanticuerpos asociados al tratamiento con algunos fármacos. Es conocida la aparición de lupus asociado al tratamiento prolongado con algunos fármacos, que desaparece después de retirar el fármaco causante. Este síndrome difiere de las reacciones de hipersensibilidad a fármacos en el sentido de que no hay células T específicas o anticuerpos dirigidos contra el fármaco. Se han sugerido diversos mecanismos para explicar el origen de esa autoinmunidad entre los que cabe señalar la activación de los linfocitos autorreactivos y la pérdida de la autotolerancia (46).

En el caso del hígado, tanto los citocromos P450 como la UDP-glucuronil transferasas (UGTs) son con frecuencia diana de autoanticuerpos en hepatitis autoinmunes desencadenadas por fármacos. En las hepatitis autoinmunes de tipo 2 predominan anticuerpos contra microsomas, contra CYP2D6, y en un 10% de los sueros se encuentran también anticuerpos contra UGTs de la familia 1 que son las que predominan en el hígado. En un número reducido de pacientes, ciertos fármacos pueden instaurar una hepatitis inducida por fármacos que está asociada con frecuencia con autoanticuerpos dirigidos contra CYP's u otras proteínas hepáticas. Ejemplos típicos son el ácido tienílico (43, 47) con anticuerpos anti-CYP2C9, la dihidralazina con anticuerpos anti-CYP1A2, el halotano con anticuerpos anti-CYP2E1 y las hepatitis causadas por anticonvulsivos en las que se detectan anticuerpos anti-CYP3A (48).

POSIBLES ESTRATEGIAS *IN VITRO* PARA CONFIRMAR LA NATURALEZA INMUNE DE LA HEPATITIS ALÉRGICA

La hepatitis alérgica es un término clínico que con frecuencia engloba varios tipos de reacciones (alérgicas, pseudoalérgicas y autoinmunes) con mecanismos diferentes y que, por tanto, requieren estrategias diagnósticas diferentes. La reacción alérgica a fármacos clásica es un proceso de sensibilización que conduce a una respuesta inmunológica específica, mediada bien por anticuerpos (hipersensibilidad tipo I/II) o bien por linfocitos T. Un fármaco también puede originar una reacción pseudo-alérgica, fenómeno debido a mediadores celulares (inflamatorios) que pueden ser formados y liberados por mecanismos diferentes a la sensibilización inmunespecífica. Finalmente, en la hepatitis

autoinmune inducida por un fármaco, éste es el que inicia el proceso de sensibilización que más tarde se dirige contra antígenos de la propia célula (1, 6).

La naturaleza multifactorial de las reacciones hepáticas de hipersensibilidad a fármacos, y en particular el papel de metabolitos del fármaco, con frecuencia no identificados, en la generación de antígenos, ha dificultado el diagnóstico rutinario de estas enfermedades mediante técnicas inmunológicas clásicas. Las pruebas clínicas utilizadas en la actualidad para el diagnóstico de reacciones alérgicas a fármacos (por ejemplo, *prick-test*) ofrecen una ayuda limitada en los casos de hepatitis alérgica, ya que éstas raramente están mediadas por IgE. Por otro lado, las pruebas de provocación *in vivo* no suelen ser éticamente aceptables, debido al inherente riesgo para el paciente (49). Son pocas las técnicas de laboratorio que han demostrado su utilidad para establecer un diagnóstico de hepatitis alérgica cuyo valor, con frecuencia limitado, se discute a continuación.

La presencia en suero de anticuerpos dirigidos contra el fármaco constituye una prueba inequívoca de que el paciente ha sido sensibilizado. Dicha identificación se puede realizar con la ayuda de técnicas basadas en la unión de los anticuerpos al fármaco (antígeno) inmovilizado mediante su unión a una fase sólida (por ejemplo, nitrocelulosa, sephadex, placas de ELISA, etc.). Si el suero del paciente contiene inmunoglobulinas para el reconocimiento específico del fármaco se producirá la unión y permanecerán adheridas a la fase sólida. Estos complejos se visualizan con facilidad tras la incubación con un antisuero anti-inmunoglobulinas humanas marcado convenientemente con una enzima (44). Los métodos basados en la detección de anticuerpos son muy específicos pero, en general, poco sensibles. Homberg y cols. (50), tras revisar un número significativo de casos de hepatitis alérgica, encontraron: (a) pacientes con anticuerpos contra el fármaco; (b) pacientes con anticuerpos anticitocromo P450 o contra otros antígenos propios (antimitocondria, antinúcleo, antimúsculo liso) y (c) pacientes en los que no fue posible detectar la presencia de estos anticuerpos. En contra de lo esperado, el porcentaje de pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis alérgica que presentaban anticuerpos contra el fármaco fue muy bajo. Una posible explicación al elevado número de falsos negativos encontrado podría ser el hecho de que los anticuerpos se ensayan frente al fármaco sospechoso. Sin embargo, la respuesta inmunológica puede haber sido dirigida frente a sus metabolitos o frente a aductos fármaco-proteína, y no frente a la molécula original.

El diagnóstico de las hepatitis alérgicas sigue estando basado, en la mayoría de las veces, en criterios de exclusión. Pero no es simple identificar el agente causal en pacientes polimedicados, salvo en aquellos casos en los que ha habido una administración accidental del fármaco sospechoso. La existencia en pacientes de clones de células T sensibilizados frente al fármaco puede demostrarse mediante pruebas de proliferación *in vitro* al ser incubados con el fármaco sospechoso o sus metabolitos (TTL, test de transformación de linfocitos) (15, 31, 49). Esta técnica requiere la medida de la incorporación de ³H-timidina por linfocitos periféricos incubados con el fármaco. Un índice de estimulación mayor de 3 (cantidad de radioactividad incorporada por las células estimuladas *versus* no estimuladas) se considera una evidencia inequívoca de que el paciente ha sido sensibilizado contra el fármaco. El ensayo de proliferación, sin embargo, presenta ciertas desventajas (51). Se requieren varios días de incubación de las células con el fármaco (5-10 días) y la respuesta depende en un alto grado del porcentaje de células T sensibilizadas presentes en la muestra (52). En términos prácticos, su sensibilidad es baja y da lugar a casi un 50% de falsos negativos (51) que pueden deberse a varias razones entre las que se incluyen una posible respuesta inmune dirigida, no al fármaco, sino a alguno de sus metabolitos, la liberación de óxido nítrico (NO) por otras células capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T o una inadecuada presentación del antígeno, o a una baja respuesta de las células T de memoria. El uso durante el ensayo de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas puede contribuir a reducir el número de falsos negativos hasta un 20% (52).

La expresión en los linfocitos del antígeno de membrana CD69 parece ser un indicador temprano y muy ventajoso para la detección de células T sensibilizadas. Este antígeno se expresa en todas las células T, B y NK activadas, pero no en otras células mononucleares periféricas (53, 54). Unas pocas horas después del contacto con un estímulo adecuado (fármacos antigénicos, mitógenos), la proteína CD69 aparece en la membrana. Esta respuesta celular temprana precede a la aparición de los antígenos CD25 y CD71 y del receptor para IL-2 y culmina con la síntesis de ADN entre los días 5 y 7 de cultivo. El uso de anticuerpos fluorescentes contra la proteína CD69 en combinación con anticuerpos anti-CD4 y CD8 parece ser una estrategia prometedora para detectar de forma rápida y sensible la presencia de linfocitos sensibilizados contra el fármaco en el suero de pacientes (55, 56).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda recibida de Fondos FEDER (Referencia SAF2003-09353) y del Contrato de Investigación Europeo, VI Programa Marco de la Unión Europea: "Predictomics" (LSHB-CT-2004-504761).

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aductos fármaco/proteína: Entidades químicas resultantes de la unión covalente de un fármaco (o uno de sus metabolitos) a una proteína. No se trata de una asociación física del fármaco a proteínas (como ocurre durante el transporte de fármacos en la sangre), sino de una verdadera reacción química entre el fármaco y la proteína con la formación de enlaces covalentes.

Biotransformación: Conjunto de procesos celulares por los que los xenobióticos son modificados químicamente para facilitar su eliminación. Término equivalente a metabolismo de xenobióticos. En el transcurso de dichas reacciones puede haber fenómenos de bioactivación, cuando se originan metabolitos más reactivos (o más tóxicos), capaces de reaccionar con moléculas celulares endógenas.

Citocromo P450: también denominado *CYP450*, es una familia de genes que codifican enzimas denominados genéricamente monooxigenasas asociadas al citocromo P450 (o de manera más simple citocromo P450). Se trata de un conjunto de hemoproteínas (citocromos), cuyo grupo prostético *hemo* (tetraporfirina asociada a $Fe^{2/+3}$), absorbe luz a un máximo de 450 nm, cuando está reducido. Estas hemoproteínas son enzimas con actividad catalítica de monooxigenasas (oxidan y oxigenan a los substratos utilizando uno de los dos átomos del oxígeno molecular).

MHC: son las siglas de *major histocompatibility complex*, un conjunto de genes agrupados en dos grandes familias, clase I y II. Todas las células del organismo expresan proteínas de clase I, mientras que solo unas pocas células, aquellas que se dedican profesionalmente a la presentación de antígenos, expresan también genes de clase II. Dado que estos genes fueron estudiados inicialmente en leucocitos, se les denomina también HLA (*Human Leukocyte Antigen*).

Xenobiótico: Del término griego *xénos* (extraño, extranjero). Se denomina a aquellos compuestos que son ajenos, *extraños*, al metabolismo celular. Com-

puestos que, en definitiva, interaccionan con los seres vivos pero no forman parte de su metabolismo. Bajo esta denominación se incluyen productos químicos, fármacos y productos naturales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parker, C.W., *Allergic reactions in man*. *Pharmacol Rev*, 1982. 34(1): p. 85-104.
2. de Jong-van den Berg, L., *Adverse drug reactions: more than a warning!* *Pharm World Sci*, 1995. 17(6): p. 177.
3. Pichler, W.J., *Delayed drug hypersensitivity reactions*. *Ann Intern Med*, 2003. 139(8): p. 683-93.
4. Bissell, D.M., et al., *Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems*. *Hepatology*, 2001. 33(4): p. 1009-13.
5. Castell, J.V.M., M. I., *Hepatitis inducida por tóxicos. Mecanismos de toxicidad y patrones de lesión*, in *Gastroenterología y Hepatología Continuada*. 2003. p. 16-22.
6. Podevin, P. and M. Biour, *Drug-induced "allergic hepatitis"*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 1995. 13(3): p. 223-44.
7. Boelsterli, U.A., H.J. Zimmerman, and A. Kretz-Rommel, *Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: molecular mechanisms and pathology*. *Crit Rev Toxicol*, 1995. 25(3): p. 207-35.
8. Daly, A.K., *Molecular basis of polymorphic drug metabolism*. *J Mol Med*, 1995. 73(11): p. 539-53.
9. Board, P., et al., *Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families*. *Pharmacol Ther*, 1990. 48(3): p. 357-69.
10. Clarke, S.E., *In vitro assessment of human cytochrome P450*. *Xenobiotica*, 1998. 28(12): p. 1167-202.
11. Guengerich, F.P., *Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: relevance to drug metabolism and toxicity*. *Toxicol Lett*, 1994. 70(2): p. 133-8.
12. Pohl, L.R., et al., *The immunologic and metabolic basis of drug hypersensitivities*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1988. 28: p. 367-87.
13. Pumford, N.R., N.C. Halmes, and J.A. Hinson, *Covalent binding of xenobiotics to specific proteins in the liver*. *Drug Metab Rev*, 1997. 29(1-2): p. 39-57.
14. Boelsterli, U.A., *Specific targets of covalent drug-protein interactions in hepatocytes and their toxicological significance in drug-induced liver injury*. *Drug Metab Rev*, 1993. 25(4): p. 395-451.
15. Mauri-Hellweg, D., et al., *Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine*. *J Immunol*, 1995. 155(1): p. 462-72.

16. Pirmohamed, M., et al., *The danger hypothesis--potential role in idiosyncratic drug reactions*. *Toxicology*, 2002. 181-182: p. 55-63.
17. Seguin, B. and J. Uetrecht, *The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2003. 3(4): p. 235-42.
18. Pichler, W.J., *Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2002. 2(4): p. 301-5.
19. Rubinstein, D., A.K. Roska, and P.E. Lipsky, *Antigen presentation by liver sinusoidal lining cells after antigen exposure in vivo*. *J Immunol*, 1987. 138(5): p. 1377-82.
20. Squiers, E.C., M.E. Brunson, and D.R. Salomon, *Kupffer cells can present alloantigen in vitro: an effect abrogated by gadolinium*. *J Surg Res*, 1993. 55(6): p. 571-4.
21. Christen, U., M. Burgin, and J. Gut, *Halothane metabolism: Kupffer cells carry and partially process trifluoroacetylated protein adducts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 175(1): p. 256-62.
22. Gil, M.L., et al., *Immunochemical detection of protein adducts in cultured human hepatocytes exposed to diclofenac*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1272(3): p. 140-6.
23. Kudo, S., et al., *A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation*. *J Exp Med*, 1997. 185(4): p. 777-84.
24. Lohse, A.W., et al., *Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells*. *Gastroenterology*, 1996. 110(4): p. 1175-81.
25. Mackay, I.R., *Hepatoimmunology: a perspective*. *Immunol Cell Biol*, 2002. 80(1): p. 36-44.
26. Franco, A., et al., *Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes*. *Hepatology*, 1988. 8(3): p. 449-54.
27. Burke, E.C., et al., *MHC expression on human hepatocytes before and after isolation*. *Transplant Proc*, 1991. 23(1 Pt 2): p. 1428-9.
28. Franco, A., et al., *Liver-derived T cell clones in autoimmune chronic active hepatitis: accessory cell function of hepatocytes expressing class II major histocompatibility complex molecules*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1990. 54(3): p. 382-94.
29. Lobo-Yeo, A., et al., *Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study in children with liver disease*. *Hepatology*, 1990. 12(2): p. 224-32.
30. Arvieux, C., et al., *Immunogenicity of rat hepatocytes in vivo: effect of cholestasis-induced changes in major histocompatibility complex expression*. *J Hepatol*, 1993. 18(3): p. 335-41.
31. Tsutsui, H., et al., *Drug-specific T cells derived from patients with drug-induced allergic hepatitis*. *J Immunol*, 1992. 149(2): p. 706-16.
32. Castell JV, H.D., Gómez-Foix AM, Gómez-Lechón MJ, *Organ toxicity: the challenges ahead.*, in *Animal alternatives, welfare and ethics*, B.M. van Zutphen LFM, eds, Editor. 1997, Elsevier BV: Amsterdam,. p. 549-557.

33. Maria, V.A. and R.M. Victorino, Development and validation of a clinical scale for the diagnosis of drug-induced hepatitis. *Hepatology*, 1997. 26(3): p. 664-9.
34. Kretz-Rommel, A. and U.A. Boelsterli, Cytotoxic activity of T cells and non-T cells from diclofenac-immunized mice against cultured syngeneic hepatocytes exposed to diclofenac. *Hepatology*, 1995. 22(1): p. 213-22.
35. Seino, K., et al., Contribution of Fas ligand to T cell-mediated hepatic injury in mice. *Gastroenterology*, 1997. 113(4): p. 1315-22.
36. Chedid, A., et al., Cell-mediated hepatic injury in alcoholic liver disease. Veterans Affairs Cooperative Study Group 275. *Gastroenterology*, 1993. 105(1): p. 254-66.
37. Winwood, P.J. and M.J. Arthur, Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin Liver Dis*, 1993. 13(1): p. 50-9.
38. Leist, M., et al., Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J Immunol*, 1995. 154(3): p. 1307-16.
39. Goldin, R.D., et al., Role of macrophages in acetaminophen (paracetamol)-induced hepatotoxicity. *J Pathol*, 1996. 179(4): p. 432-5.
40. Matsuo, R., et al., The role of Kupffer cells in complement activation in D-Galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic injury of rats. *Acta Med Okayama*, 1992. 46(5): p. 345-54.
41. Armendariz-Borunda, J., et al., Kupffer cells from carbon tetrachloride-injured rat livers produce chemotactic factors for fibroblasts and monocytes: the role of tumor necrosis factor- α . *Hepatology*, 1991. 14(5): p. 895-900.
42. Roland, C.R., et al., Outcome of Kupffer cell antigen presentation to a cloned murine Th1 lymphocyte depends on the inducibility of nitric oxide synthase by IFN- γ . *J Immunol*, 1994. 153(12): p. 5453-64.
43. Neuberger, J., et al., Antibody mediated hepatocyte injury in methyl dopa induced hepatotoxicity. *Gut*, 1985. 26(11): p. 1233-9.
44. Gomez-Lechon, M.J., et al., Evidence of antibodies to erythromycin in serum of a patient following an episode of acute drug-induced hepatitis. *Clin Exp Allergy*, 1996. 26(5): p. 590-6.
45. Mizoguchi, Y., et al., Detection of the cholestatic factor in the liver tissue of patients with acute intrahepatic cholestasis. *Ann Allergy*, 1986. 56(4): p. 304-7.
46. Rubin, R.L., Drug-induced lupus. *Toxicology*, 2005. 209(2): p. 135-47.
47. Neuberger, J. and R. Williams, Immune mechanisms in tienilic acid associated hepatotoxicity. *Gut*, 1989. 30(4): p. 515-9.
48. Obermayer-Straub, P., C.P. Strassburg, and M.P. Manns, Target proteins in human autoimmunity: cytochromes P450 and UDP- glucuronosyltransferases. *Can J Gastroenterol*, 2000. 14(5): p. 429-39.

49. Pichler, W.J., (Diagnostic possibilities in drug allergies). *Schweiz Med Wochenschr*, 1993. 123(23): p. 1183-92.
50. Homberg, J.C., et al., Drug-induced hepatitis associated with anticytoplasmic organelle autoantibodies. *Hepatology*, 1985. 5(5): p. 722-7.
51. Berg, P.A. and E.W. Becker, The lymphocyte transformation test--a debated method for the evaluation of drug allergic hepatic injury. *J Hepatol*, 1995. 22(1): p. 115-8.
52. Maria, V.A., L. Pinto, and R.M. Victorino, Lymphocyte reactivity to ex-vivo drug antigens in drug-induced hepatitis. *J Hepatol*, 1994. 21(2): p. 151-8.
53. Lopez-Cabrera, M., et al., Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med*, 1993. 178(2): p. 537-47.
54. Borrego, F., J. Pena, and R. Solana, Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol*, 1993. 23(5): p. 1039-43.
55. Werfel, T., M. Boeker, and A. Kapp, Rapid expression of the CD69 antigen on T cells and natural killer cells upon antigenic stimulation of peripheral blood mononuclear cell suspensions. *Allergy*, 1997. 52(4): p. 465-9.
56. Sabbah, A., et al., (Study of the cell cycle using flow cytometry in drug allergy). *Allerg Immunol (Paris)*, 1993. 25(3): p. 88, 91-7.