PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CLINICA

TITULO: Identificación de marcadores genéticos en la susceptibilidad para desarrollar hepatotoxicidad

Red Ibero/ Latinoamericana de hepatopatías asociadas a medicamentos

Centro participante:
Clínica de Gastroenterología, Cátedra de Farmacología, Departamento de Toxicología, Medicina Laboral y Laboratorio clínico.
Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

Investigadores responsables: Dr. Henry Cohen
Dra. Nelia Hernández
Dra. Cristina Dacoll

1. Introducción.

Las enfermedades hepáticas debidas a fármacos se han convertido en un desafío constante para los clínicos, las agencias reguladoras y la industria farmacéutica debido sobre todo a que suponen una de las mayores causas de retirada de fármacos del mercado. Además, la carencia de marcadores específicos de toxicidad que permitan un diagnóstico etiológico de certeza, explica que muchas incidencias puedan pasar desapercibidas. Por otra parte, la hepatotoxicidad por fármacos (HTX) puede remedar en su presentación cualquier síndrome hepático agudo o crónico. La dificultad de identificarse en los estudios clínicos en fase de desarrollo, hace que sea casi imposible predecir de manera fiable la seguridad de un medicamento. Además, la ausencia de modelos animales fiables para profundizar en su patogenia, su relativa rareza, y la dificultad de establecimiento de causalidad por la ausencia de un "patrón de oro" para el diagnostico y la variabilidad étnica en la respuesta, representan un auténtico desafío clínico. Por todo ello, sería importante identificar los factores de riesgo que incrementan la susceptibilidad del individuo único en su susceptibilidad a desarrollar daño hepático tóxico.

En consecuencia, es claramente necesaria la agregación de casos de hepatotoxicidad, muy bien caracterizados para ganar conocimiento en la epidemiología y patogenia de la HTX. Esta estrategia es inaccesible para una Unidad hospitalaria trabajando de forma aislada.

En el momento actual existe un enorme interés en el panorama internacional y muy potentes iniciativas para ser capaces de armonizar la metodología de identificación de casos y aumentar el número de muestras para realizar estudios genéticos de susceptibilidad a la hepatotoxicidad, identificación de nuevos biomarcadores de daño hepático tóxico y de progresión de daño.

Se ha creado un consorcio internacional denominado **IDILIC** (Internacional Drug-Induced Liver Injury Consortium) para canalizar estos esfuerzos (realización de un análisis amplio del genoma y secuenciación) y se propone incorporar a Latinoamérica en dicho consorcio.

Este estudio de investigación se enmarca dentro de la creación de una red iberoamericana de hepatopatías asociadas a medicamentos. Tiene como objetivo incorporar a países de Latinoamérica en la identificación y caracterización de pacientes con hepatitis tóxica y formar así una amplia **red Iberoamericana**, así como la creación y mantenimiento de una base de datos de registro de los casos de hepatopatias que se diagnostiquen en los hospitales colaboradores y estudiar su posible asociación con medicamentos, lo que supone la realización de estudios fármacoepidemiológicos, genéticos, el establecimiento de causalidad y la exploración de mecanismos de actuación.

Es una red multicéntrica, multidisciplinaria de especialistas latinoamericanos en hepatología, medicina interna, pediatras y farmacólogos clínicos enfocada a la identificación y caracterización prospectiva de hepatopatias asociadas a medicamentos, siguiendo un protocolo uniforme y coordinada por el Registro Español de Hepatotoxicidad liderado por los Dres. Raúl Andrade Bellido y María Isabel Lucena con sede en Málaga, España.

Uruguay se incorpora a esta red el 14 de setiembre de 2010, a través de la Clínica de Gastroenterología del Hospital de Clínicas, Universidad de la República, con la colaboración de la Cátedra de Farmacología, el Departamento de Toxicología y Laboratorio clínico.

Entre los objetivos de formación se propone establecer un proceso estandarizado y metodológico de diagnostico y evaluación de hepatotoxidad, así como compartir las herramientas y el protocolo estructurado utilizado por el registro español de hepatotoxicidad asociada a medicamentos.

Además, este proyecto cuenta con la posibilidad de su traslación a la práctica clínica de manera inmediata con un impacto en la salud pública.

Tiene también como objetivo la creación y mantenimiento de una base de datos de pacientes latinoamericanos con hepatopatías asociadas a medicamentos que permita el registro de la información necesaria y la crear una Web de la Red Iberoamericana de Hepatotoxicidad hospedada en la página del Registro Español de Hepatotoxicidad (**www.spanishdili.uma.es**)

La colaboración pretende formar metodológicamente en aspectos farmacoepidemiológicos, estandarización de nomenclaturas y definiciones en hepatotoxicidad para conseguir una correcta caracterización fenotípica de los

casos y poder realizar análisis de las cohortes, identificación de factores de riesgo. Facilitará el intercambio de información entre ambas instituciones contratantes y permitirá la presencia de estos países latinoamericanos en foros internacionales.

2. Objetivos

Realizar estudios farmacoepidemiológicos para determinar las características del daño hepático tóxico, los principales fármacos involucrados e identificación de factores de riesgo.

Obtener muestras biológicas de pacientes con hepatitis tóxica para la realización de estudios genéticos y avanzar en el mecanismo etiopatogenico del daño tóxico.

Formular nuevas hipótesis de trabajo con el fin de responder problemas clínicos relevantes, sin fines comerciales.

3. Justificación del estudio

La incidencia real de reacciones hepatotóxicas no se conoce con exactitud; solo una minoría de casos se notifica de forma voluntaria y, frecuentemente, existe dificultad para establecer relación causal entre la determinada lesión hepática y la exposición a un fármaco concreto.

A ello se suma la ausencia de parámetros específicos de toxicidad hepática.

Este estudio permitirá la identificación de casos de sospecha de hepatotoxicidad y mantenimiento de una base de datos que permita el registro de la información necesaria

4. Aspectos éticos

El estudio se realizará de acuerdo a los requerimientos éticos nacionales e internaciones (Declaración de Helsinki, Anexo 1) y será evaluado por el Comité de ética de la Facultad de Medicina para su aprobación.
Los investigadores garantizarán la confidencialidad de los datos de los pacientes y se velará para que se cumpla en todo momento. El acceso a su información personal estará restringido al médico del estudio, colaboradores y Comité de ética, si así lo requiera.

5. Material y Metodología

Es un estudio prospectivo, multicéntrico, internacional, siendo Uruguay uno de los centros participantes. Se incluirán pacientes procedentes de la Clínica de Gastroenterología y otros centros (Públicos o Privados). Las instituciones de procedencia estarán informadas y en conformidad con la inclusión de los participantes en el estudio. Se dispondrá del aval correspondiente al centro participante previo a la inclusión del paciente.

5.a Criterios de inclusión:

Mayores de 18 años

Firmado el consentimiento informado

Paciente con sospecha de hepatotoxicidad por medicamentos, hierbas o tóxicos, actual o pasada, independientemente del tiempo en que se presentó.

5.b Criterios de exclusión:

Menores de 18 años

5.c Cronograma:

1.- Identificar el paciente con sospecha de hepatotoxicidad.

2.- Toma y firma del consentimiento informado (Anexo 2)

3.- Llenado del protocolo estructurado (Anexo 3)

4.- Obtención de muestra de sangre con su correspondiente almacenamiento y posterior envío a España (Anexo 4).

1.- Una vez identificado por parte del clínico la sospecha de hepatotoxicidad se realizará la entrevista donde se le informará sobre el protocolo y se lo invitará a participar. La metodología de recogida de información de las sospechas de hepatotoxicidad consiste en una entrevista directa con el paciente y no en la mera revisión de historias clínicas, en la cual se realiza una historia medicamentosa exhaustiva detallada para recoger información actualizada y con fechas sobre exposición a medicamentos y a otros posibles agentes etiológicos (productos de herboristería, automedicación). El proceso incluye recomendaciones a los pacientes para evitar nuevos episodios.

2. Se le solicitará al paciente la firma del consentimiento informado para participar en el estudio y para la donación de una muestra de sangre para estudios de los genes que regulan las vías del metabolismo y la respuesta inmune.

3. Para la recogida de datos se utilizará un protocolo estructurado que contiene los siguientes códigos: datos patronímicos del paciente, peso, talla, la relación temporal entre el comienzo del consumo del fármaco o la exposición al tóxico y el inicio de la enfermedad hepática y entre la suspensión del agente sospechoso y la mejora o recuperación de la disfunción hepática.
Se investigará la presencia de factores de riesgo conocidos de hepatotoxicidad como el consumo de alcohol (cantidad en conversión del volumen de bebida en gramos) o embarazo; y el resultado del daño hepático.
Se revisarán exhaustivamente los fármacos de consumo actual y los previos, productos de herboristería y posibles tóxicos.
Se excluyen otras causas de enfermedad hepática: etílica, hepatitis viral reciente por virus A (IgM anti VHA), B (IgM antiVHB) o C (anti VHC y PCR), enfermedades autoinmunes (ANA, anticuerpos antimitocondriales, anti-LKM1 y antimusculo liso) y obstrucción biliar (ecografía abdominal complementada con resonancia magnética o colangiografía endóscopica en los casos necesarios). Si el contexto clínico lo sugiere y a criterio del médico actuante, se descartará

citomegalovirus, Epstein Barr, infección por herpes virus o hepatitis E, y serología de bacterias como salmonella, campylobacter y listeria. Si el paciente es menor de 40 años se determinará la ceruloplasmina y la excreción urinaria de cobre para descartar la enfermedad de Wilson. Se evaluará asimismo la presencia de otras enfermedades metabólicas hepáticas como la Hemocromatosis, el déficit de alfa 1 antitripsina y en pacientes con historia de hipotensión reciente se descartará la presencia de hepatitis isquémica.

En casos dudosos como pacientes con marcadores de autoinmunidad, alcohólicos, enfermedad hepática previa o enfermedades sistémicas que pueden afectar al hígado se podrá realizar una biopsia hepática para obtener más información etiológica.

El protocolo con la información obtenida, se enviará (vía email) a la RED IBERO/LATINOAMERICANA DE HEPATOPATÍAS ASOCIADAS A MEDICAMENTOS. Los casos serán revisados por el médico responsable y posteriormente evaluados por tres expertos independientes del centro coordinador (Málaga) quienes valorarán la causalidad, primero por juicio clínico y posteriormente mediante la aplicación de la escala Council for Internacional Organizations of Medical Sciences (CIOMS, Anexo 5). Dicha escala se basa en un sistema de puntuación estandarizado según diferentes criterios (cronológicos, evolución, factores de riesgo, fármaco concomitante, exclusión de causas alternativas no farmacológicas, información previa de hepatotoxicidad del fármaco, reexposición), finalmente el resultado se traslada a categorías de sospecha divididas en: definida o altamente probable (> 8 puntos), probable (6-8 puntos), posible (3-5 puntos), improbable (< 2 puntos) y excluida (≤ 0 puntos). Únicamente los casos valorados por la escala CIOMS como posible, probable o definida se incluirán en la base de datos.

La definición y clasificación del tipo de lesión fueron establecidas mediante la aplicación de los criterios derivados de la reunión del grupo Internacional de Consenso y recientemente actualizados (Benichou, J Hepatol 1990, Fontana et al., Hepatology 2010) que definen lesión hepática al incremento de dos veces sobre el límite superior a la normalidad (LSN) en alanino aminotransferasa (ALT) o bilirrubina conjugada; o a la combinación del incremento de aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA) y bilirrubina total siendo uno de

ellos 3 veces > LSN. Clasifican el tipo de lesión en base a los hallazgos anatomopatológicos o alternativamente en base a los hallazgos bioquímicos si no se disponía de biopsia. El daño hepático se determina como hepatocelular cuando el radio ALT/FA era >5, como colestásica <2 y mixta >2 pero <5. Se utilizarán para dicha clasificación, los primeros valores analíticos realizados al paciente. Finalmente, se intenta establecer el mecanismo patogénico del daño hepático clasificándolo en intrínseco o idiosincrásico, y este último a su vez en metabólico o inmunoalérgico si presenta datos de hipersensibilidad como fiebre, exantema y presencia de eosinófilos en sangre o en la biopsia hepática.

Los fármacos responsables de la reacción hepática se clasificarán de acuerdo con el *Anatomical Therapeutic Classification* (ATC) recomendado por *WHO-Europe.* (Anexo 6)

4.- Se realizará la recolección de la muestra de sangre para el estudio genético de la susceptibilidad, su almacenamiento y posterior envío.
Los estudios genéticos consistirán en un análisis amplio del genoma y estudios específicos en polimorfismos de enzimas involucrados en el metabolismo, transporte, detoxificación de los fármacos y respuesta inmune.
El día de la entrevista o un día a coordinar (de preferencia en la semana siguiente) se realizará la extracción de sangre. La misma se llevará a cabo en el Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas cuyo personal estará informado de las condiciones de toma y preparado de la muestra según exigencias del protocolo (Anexo 4). Además de las muestras que requieren preparación (tubos lila y amarillo), se colectará una muestra de 5 mL de sangre en tubo rosa que conforme se extrae se congela a -80ºC. Este no necesita preparación ni fraccionamiento. Las muestras, una vez preparadas, se almacenarán en un congelador a -80º C en el Instituto de Donación de Órganos y Tejidos sito en el 4to piso del Hospital de Clínicas, hasta proceder a su envío a Málaga.
Los tubos requeridos para la muestra serán enviados desde el centro coordinador español y serán procesadas en el Laboratorio de Maribel Lucena, Departamento de Farmacología y Pediatria, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga y el laboratorio Ann Daly de la Universidad de Newcastle.

Cada 4 meses se enviarán las muestras de sangre que hayan sido recolectadas durante ese período. Para el envío de las muestras de sangre se preparará un paquete con hielo seco (2-3 kg de hielo seco es necesario para asegurar que las muestras permanezcan congeladas durante el transporte). Se evitará hacer los envíos durante los fines de semana.

7. Confidencialidad de datos

En la información que se recoja durante la realización de este estudio no aparecerá el nombre del paciente, ni ningún otro dato que permita identificarle. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código aleatorio de manera que sólo el médico del estudio y colaboradores podrá relacionar dichos datos con un determinado paciente y su historia clínica.
Si bien los datos se obtienen en forma nominada, serán analizados en forma anónima.
El acceso a la información personal de cada paciente quedará restringido al médico del estudio, colaboradores y Comité Ético de Investigación.

7.1 Código aleatorio

El código asignado al paciente tendrá por una combinación de números aleatorios que estará ligada a la información del nombre del paciente. Esto figurará en una base independiente que no es de acceso al público y que garantiza el anonimato de la muestra.

8. Análisis de datos

El análisis de los datos permitirá identificar posibles nuevas asociaciones y cuantificar el riesgo.
Una vez que se envía una sospecha de toxicidad hepática al centro coordinador se analiza la información remitida en el protocolo estructurado que

se ha diseñado para ello, se valoran las respuestas emitidas en cada apartado y si está correctamente completado, se estudia la posible imputación al fármaco más probable, se estudia la posibilidad/sospecha de ser la reacción producto de una interacción farmacológica, se analizan las principales causas hepáticas excluidas y finalmente si se considera la reacción relacionada con la ingesta de un fármaco(s) tras evaluación por 3 expertos independientes, se le aplica la escala de CIOMS para asignarle una puntuación numérica que es convertida en una categoría de probabilidad de sospecha de la hepatotoxicidad. Posteriormente los protocolos se introducen en la base de datos generada RegHepatox y son archivados.

Las nuevas incidencias serán analizadas para identificar posibles señales de alerta, nuevas asociaciones y cuantificar el riesgo.

Las muestras de sangre y los datos obtenidos serán conservados por tiempo indeterminado. En caso de retirarme del estudio no se continuarán utilizando las muestras de sangre, las cuales serán destruidas.

9. Financiación

La financiación del estudio se hará con recursos provenientes del grupo español para el Estudio de las Hepatopatías asociadas a Medicamentos. El paciente no asumirá ningún gasto vinculado al estudio.

10. Publicaciones

Realizar un análisis final de toda la información generada y publicación en una revista indexada.

Se presentará una memoria final de actividades y se procederá a difundir los datos obtenidos en Congresos de la Especialidad y en Revistas médicas de alto índice de impacto. La contribución en término de reclutamiento de pacientes será un criterio de primer orden para la autoría en estos artículos.

La directora del grupo investigador se compromete a entregar un informe final correspondiente a cada año y el envío del informe y de los resultados junto con

la discusión a los centros participantes. El grupo se compromete a publicar las conclusiones que se deriven del proyecto. Las publicaciones se realizarán en revistas científicas, congresos nacionales e internacionales y en la página we

11. Propuesta de calendario

Fechas estimadas

Septiembre 2010	Presentación del proyecto a los centros colaboradores
	Creación de un Comité Científico
Diciembre 2010	Identificación y caracterización de pacientes con hepatopatías idiomáticas (DILI de cada centro colaborador Entrevistar a los pacientes y recoger información sobre exposición a medicamentos y a otros posibles agentes etiológicos.
Diciembre 2010	Recogida de muestras de pacientes con hepatotoxicidad para la realización de estudios genéticos y de biomarcadores
Enero 2011	Envío de muestras al centro coordinador cada 4 meses
	Seguimiento de los pacientes con DILI Analizar los datos para identificar posibles nuevas asociaciones y, en la medida de lo posible, cuantificar el riesgo.
Diciembre 2011	Evaluación primer año seguimiento
Febrero 2012	Realizar un informe final correspondiente a cada año y

	envío del informe de los resultados y discusión en los centros participantes
	Publicación de los principales resultados de estos estudios en comunicaciones a Congresos y en revistas de alto factor de impacto.

12. Bibliografía

1. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a Frech population-based study. Hepatology 2002;36:451-5.

2. Andrade RJ, Lucena MI, Fernández MC, et al. Drug-Induced Liver Injury: An análisis of 461 incidences submitted to the Spanish Registry over a 10-year period. Gastrenterology 2005;129:512-21.

3. Bénichou C. Criteria for drug-induced liver disorders. Report of an International Consensus meeting. J Hepatol 1990;11:272-276.

4. Fontana RJ, Seeff LB, Andrade RJ, et al. Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: Summary of a clinical research workshop. Hepatology. 2010 Mar 26.

5. Lucena MI, Camargo R, Andrade RJ, et al. Comparison of two clinical scales for causality assessment in hepatotoxicity.. Hepatology. 2001 Jan;33(1):123-30.

6. Zimmerman HJ. Hepatotoxicity. The adverse effects of Drug and Others Chemicals on the liver (2nd edn). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

7. Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky HL, et al. Causes, clinical features and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. Gastroenterology 2008;135:1924-1934.

8. Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, et al. HLA-B*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. Nat Genet 2009;41:816-819.

13. Anexos

1. Declaración de Helsinki
2. Consentimiento informado
3. Hoja de recolección de datos e historia del paciente. Protocolo estructurado.
4. Pautas de la recogida de muestras de sangre para estudio de hepatotoxicidad.
5. Escala Council for Internacional Organizations of Medical Sciences (CIOMS)
6. Anatomical Therapeutic Classification (ATC) recomendado por WHO-Europe (copia en CD).