



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química, Bioquímica e Farmácia

Biomarcadores para Avaliação da Lesão Hepática Induzida por Fármacos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Duarte Leandro Ferreira Gomes

Orientação de:

Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto

Coorientação de:

Professora Doutora Custódia Fonseca

2014



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química, Bioquímica e Farmácia

Biomarcadores para Avaliação da Lesão Hepática Induzida por Fármacos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Duarte Leandro Ferreira Gomes

Orientação de:

Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto

Coorientação de:

Professora Doutora Custódia Fonseca

2014

Biomarcadores para Avaliação da Lesão Hepática Induzida por Fármacos

Declaração de Autoria do Trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Duarte Leandro Ferreira Gomes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Resumo

A lesão hepática induzida por fármacos (LHIF) constitui uma das principais causas de falha hepática nos países industrializados. Embora a incidência de casos de hepatotoxicidade severa seja baixa, a ocorrência de falha hepática aguda provocada por fármacos está associada a elevada taxa de mortalidade e morbidade, na ausência de transplante hepático. A detecção precoce da presença de lesão é de extrema importância para o estabelecimento de um diagnóstico correto e seguimento da evolução do processo patológico, visando a minimização do risco de insuficiência hepática.

A inexistência, até à data, de um biomarcador específico para o diagnóstico diferencial de LHIF, implica o recurso aos comuns marcadores de função hepática. Com o desenvolvimento deste trabalho de revisão bibliográfica pretende-se descrever os biomarcadores com utilidade clínica na detecção e acompanhamento do processo lesivo do fígado. São referidos os biomarcadores clássicos, ou seja, constituintes do painel de marcadores atualmente utilizados e, novos biomarcadores, cujo potencial para utilização como complemento e como alternativa aos anteriores tem sido estudado.

Num plano posterior, é feita uma abordagem aos fármacos associados a maior ocorrência de hepatotoxicidade. Antibióticos, antituberculosos, antiepiléticos e anti-inflamatórios são os grupos de fármacos responsáveis pelo maior número de notificações em sistemas de farmacovigilância de alguns países.

Palavras-chave: hepatotoxicidade, fármacos, biomarcadores, diagnóstico

Abstract

In industrialized countries, the drug-induced liver injury is a major cause of liver failure. Although the incidence of severe liver toxicity is low, the occurrence of acute liver failure caused by drugs is associated with high mortality and morbidity in the absence of liver transplantation. Early detection of the presence of injury is extremely important to establish a correct diagnosis and management of evolution of the disease process, aimed at minimizing the risk of liver failure.

The absence until now of a specific biomarker for the differential diagnosis of LHIF involves the use of common markers of liver function. With the development of this work of literature review is intended to describe biomarkers with clinical utility in the detection and monitoring of liver lesion process. Classic biomarkers, ie, constituents of the markers currently used panel, are referred and also new biomarkers, whose potential for use as a complement and an alternative to the first ones has been studied.

Later, it's made an approach to drugs associated with increased hepatotoxicity. Antibiotics, anti-tuberculosis, anti-epileptic and anti-inflammatory drugs are the group responsible for the largest number of notifications in the pharmacovigilance systems of some countries.

Keywords: hepatotoxicity, biomarkers, drugs, diagnostic

Abreviaturas

Acetil-CoA – Acetil Coenzima A

AINEs - anti-inflamatórios não esteroides

ALP – Fosfatase Alcalina

ALT - Alanina amino transferase

AST – Aspartato amino transferase

CYP – citocromo P450

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FHA – Falha hepática aguda

GGT – Gama glutamil transferase

GLDH – Glutamato Desidrogenase

GST – Glutationa S-transferase

IMC – Índice de massa corporal

HMGB1 - High-mobility group box-1 protein

K18 – Citoqueratina 18

LHA – Lesão hepática aguda

LHIF – Lesão hepática induzida por fármacos

miRNA – Micro RNA

NAT – N-acetiltransferase

OMS – Organização Mundial de Saúde

UGT – UDP-glucoroniltransferase

ULN – Upper Limite Normal

Índice

1. Introdução	10
2. O Fígado	12
Fisiologia	13
Sistema Porta e Circulação Enterohepática.....	15
Metabolismo de Fármacos no Fígado	15
Fisiopatologia Hepática.....	17
Lesão Hepática Induzida por Fármacos (LHIF)	18
3. Biomarcadores utilizados no diagnóstico	20
Biomarcadores Tradicionais	20
AST e ALT	21
GGT e ALP	22
Bilirrubina	24
Biomarcadores com futura utilização clínica	25
MicroRNA (miRNA).....	25
Glutathione S-Transferase α	27
HMGB1 e Citoqueratina 18	28
Glutamato Desidrogenase	31
Proteína F.....	32
Arginase I.....	35
4. Fármacos associados a disfunção hepática	37
Paracetamol	37
Antibacterianos	39
Amoxicilina/Ácido Clavulâmico	40
Minociclina	42
Nitrofurantoína.....	44

Antituberculosos – Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida.....	45
Antiepiléticos.....	48
Ácido Valpróico	49
Fenitoína	50
Carbamazepina.....	51
Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs).....	51
Diclofenac	52
Nimesulida	53
5. Conclusões	55
6. Bibliografia	56

1. Introdução

A Lesão Hepática Induzida por Fármacos constitui um problema de saúde pública, representando a principal causa de Falha Hepática Aguda (FHA) nos Estados Unidos da América e no Reino Unido. Este problema revela, igualmente, impacto na indústria farmacêutica assumindo-se como a principal causa para retirada do mercado de fármacos previamente aprovados.¹

A LHIF provoca ampla variedade de apresentações clínicas, podendo simular quase todas as formas de lesões agudas e crónicas. Por este motivo, o estabelecimento de um diagnóstico preciso tem-se mostrado muito difícil. O diagnóstico de causalidade assenta, essencialmente, na exclusão de outras causas de disfunção hepática, quando verificado um painel de biomarcadores hepáticos com valores anormais.²

Um biomarcador pode ser definido como um parâmetro biológico que é objetivamente medido e avaliado como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica.³

As características ideais de um biomarcador de lesão hepática incluem: especificidade para o tecido hepático, forte correlação com alterações histomorfológicas hepáticas bem definidas, adaptação dos testes de rastreio a modalidades de alto rendimento e comercialmente disponíveis, acessibilidade à amostra por métodos não invasivos e aplicação a modelos animais em fase pré-clínica. Atualmente, a grande limitação dos marcadores utilizados prende-se ao facto de apesar de sensíveis, estes não serem específicos para o tecido hepático.⁴

A alanina aminotransferase (ALT) é considerada o biomarcador de hepatotoxicidade com maior sensibilidade e especificidade. Contudo, as fontes não hepáticas de ALT podem, inadvertidamente, aumentar o risco de falsos positivos. Neste sentido, novos biomarcadores têm sido avaliados quanto à especificidade hepática e ao potencial preditivo de LHIF mais preciso.⁵

Vários fármacos têm sido associados à ocorrência de hepatotoxicidade, havendo casos bem documentados. O paracetamol é o caso mais reportado e, segundo estudos recentes, é responsável por cerca de 50% dos casos de FHA nos EUA, e entre 20 e 40 transplantes hepáticos anuais no Reino Unido. O paracetamol difere dos outros fármacos uma vez que o processo de hepatotoxicidade é dependente da dose. A maioria dos casos de LHIF está associada a reações idiossincráticas e, por isso, relativamente inesperadas.^{2,6}

A suscetibilidade para a ocorrência de toxicidade é influenciada por diversos fatores. Obviamente, um historial de patologia hepática ou de consumo excessivo de álcool aumentam o risco de desenvolver condição patológica. Outros fatores como idade avançada, tratamento concomitante com vários fármacos e predisposição genética mostram, igualmente, ter influência no desenrolar de hepatotoxicidade.⁷

2. O Fígado

O aparelho digestivo é constituído pelo tubo digestivo, o qual se estende da boca ao ânus, e pelas glândulas anexas, responsáveis pela segregação de fluidos para o tubo digestivo, como é o caso do fígado. O fígado é o maior órgão interno do corpo humano, pesando cerca de 1,36 quilogramas, e localiza-se no quadrante superior direito do abdómen. Atendendo à arquitetura básica, este é constituído por dois lobos principais, o esquerdo e o direito, e por dois lobos menores, o caudado e o quadrado. Os vários vasos, tal como a veia porta e a artéria hepática, os canais e os nervos que entram e saem do fígado, convergem para um local comum, o hilo hepático, situado na face inferior do órgão (Figura 1).⁸

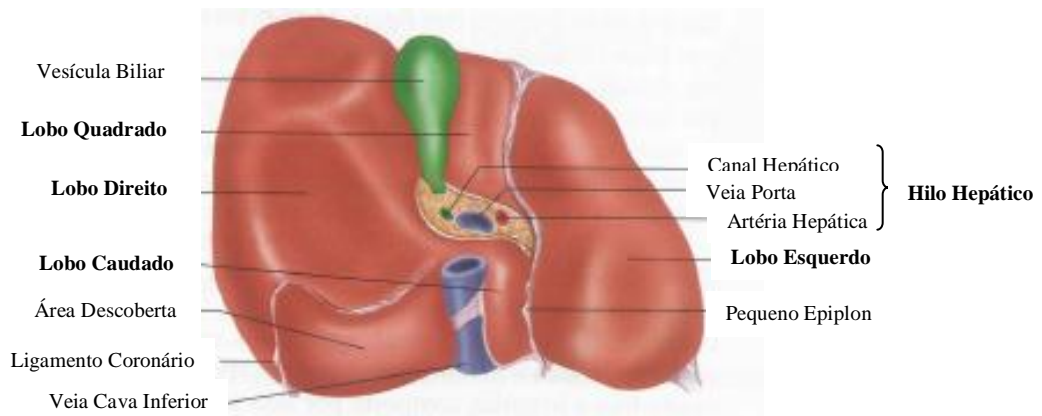


Figura 1- Face inferior do fígado. Adaptado de Seeley *et al.*, 2005.

O fígado encontra-se revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo e por peritoneu visceral, exceto uma pequena área que é rodeada pelo ligamento coronário, designada por área descoberta. A cápsula de tecido conjuntivo ramifica-se, enviando uma rede de septos para o parênquima hepático, os quais constituem o seu principal suporte.⁸

Os septos de tecido conjuntivo dividem e separam o fígado nas suas unidades básicas, os lóbulos hepáticos. São estruturas hexagonais construídas em torno de uma veia central e possuem em cada vértice um sistema porta constituído por três vasos – artéria hepática, veia porta hepática e ducto ou canal hepático. As veias centrais unem-se para formar as veias hepáticas que desaguam para a veia cava inferior. Os lóbulos são constituídos por várias placas de hepatócitos, as células funcionais do fígado, que irradiam a partir das veias centrais, tendo cada placa, geralmente, duas células de espessura.^{8,9}

Entre as placas de hepatócitos encontram-se os sinusóides hepáticos. São vasos sanguíneos de diâmetro muito reduzido, revestidos por dois tipos de células: células

endoteliais comuns, finas e dispersas, e células de Kupffer, que desempenham função fagocitária. Os sinusoides recebem sangue rico em nutrientes e pobre em oxigénio, proveniente do trato gastrointestinal, através de vénulas que derivam da veia porta. De igual modo, recebem, por intermédio de arteríolas hepáticas, sangue rico em oxigénio vindo das artérias hepáticas. Após o contacto com os hepatócitos, o sangue abandona os lóbulos hepáticos através das veias centrais e, posteriormente, o fígado através das veias hepáticas.^{8,9}

Entre os hepatócitos encontram-se, ainda, pequenos canais designados canalículos biliares, que transportam a bÍlis até ao sistema porta, para que ocorra a sua excreção através dos canais hepáticos aí localizados.⁸

Fisiologia

O fígado assume um variado role de funções vitais para o organismo, possíveis devido à elevada taxa metabólica demonstrada pelos hepatócitos. Às funções de processamento e síntese de substâncias, aliam-se a capacidade de armazenamento, destoxificação e defesa do organismo.⁸

A produção de bÍlis é uma das funções mais importantes desempenhadas pelo fígado. Ao nível da digestão, os sais biliares emulsionam as partículas lipídicas, facilitando a sua digestão por ação enzimática. Por outro lado, a bÍlis é a principal via para excreção de produtos metabólicos e substâncias lipossolúveis através das fezes.⁸

O fígado é responsável pelo metabolismo dos macronutrientes, como é o caso dos hidratos de carbono, das proteínas e dos lípidos. A biotransformação destes substratos encontra-se interligada com o armazenamento dos produtos das reações. Assim, o fígado possibilita a manutenção dos níveis normais de glicémia. Quando o nível de glucose circulante no sangue é elevado, ocorre captação desta e armazenamento sob a forma de glicogénio. Contrariamente, em casos de hipoglicémia, ocorre a gluconeogénese como mecanismo compensatório para normalizar a quantidade de glucose em circulação.⁹

Relativamente ao metabolismo dos lípidos, este ocorre visando a obtenção de energia. Inicialmente, é necessário que ocorra a quebra dos triglicerídeos em glicerol, que pode ser utilizado para a obtenção de glucose via gluconeogénese, e ácidos gordos. Através de processos oxidativos, os ácidos gordos originam acetil coenzima A (acetil-CoA) que é utilizado no ciclo de Krebs para produção de energia. As reações de oxidação que permitem a

obtenção de acetil-CoA ocorrem em todas as células do organismo, sendo que nas células hepáticas a velocidade é significativamente superior. Como tal, nos hepatócitos ocorre produção de acetil-CoA e posterior envio para outros tecidos. A maioria do colesterol sintetizado no fígado é eliminado na bÍlis. O remanescente é enviado para os restantes tecidos para aproveitamento por parte das células para formar membranas, estruturas internas e substâncias importantes para o funcionamento celular.⁹

Por último, o metabolismo das proteínas por parte do fígado é de extrema importância. Para que os aminoácidos possam ser utilizados em diversas reações no organismo, é necessária uma desaminação prévia que ocorre essencialmente no fígado. Este processo origina grandes quantidades de amónia, substância que apresenta elevada toxicidade e é eliminada através da sua conversão em ureia por parte das células hepáticas. É de realçar, ainda, a capacidade de síntese de alguns aminoácidos e o papel deste órgão na síntese de grande parte das proteínas plasmáticas, como a albumina, a heparina e alguns fatores de coagulação.^{8,9}

A função de armazenamento é importante principalmente para vitaminas, como é o caso das vitaminas A, D e B₁₂, e para o ferro. O ferro é armazenado sob a forma de ferritina, sendo que a atuação do fígado ao nível deste composto visa a estabilidade dos seus níveis em circulação, tal como no caso da glucose.⁹

O fígado apresenta, ainda, uma ligeira função de defesa do organismo. As células de Kupffer, localizadas ao longo dos sinusoides hepáticos, fagocitam glóbulos brancos e vermelhos velhos, algumas bactérias e detritos que alcancem o fígado através da circulação sanguínea.⁸

Finalmente, o fígado desempenha um papel essencial na destoxificação quer de xenobióticos, quer de produtos nocivos resultantes de processos endógenos, como é o caso da amónia, referido anteriormente. Ao nível dos hepatócitos, o processo de destoxificação ocorre por alteração estrutural das substâncias, tornando-as menos tóxicas e/ou mais fáceis de eliminar, podendo a eliminação ocorrer por via biliar ou por via renal, após passagem pela circulação sanguínea no último caso. Este processo é muito importante para o metabolismo e eliminação de fármacos, assim como dos seus metabolitos.⁸

Sistema Porta e Circulação Enterohepática

O sistema porta trata-se de um sistema vascular que se estende dos capilares das vísceras abdominais, como o estômago, intestinos e baço, até aos capilares sinusoidais hepáticos, sendo responsável pelo transporte do sangue proveniente destes locais até ao fígado. A veia porta, maior veia deste sistema, resulta da convergência das várias veias que drenam as vísceras, e penetra no fígado permitindo a chegada do sangue aos hepatócitos. Como explicado anteriormente, o sangue dos sinusoides hepáticos é recebido pelas veias centrais dos lóbulos hepáticos que drenam para as veias hepáticas e, posteriormente, para a veia cava inferior. O sangue que entra no fígado através da veia porta é rico em nutrientes e outras substâncias, que após biotransformação nos hepatócitos, tornam-se passíveis de serem eliminadas. A eliminação pode ocorrer por via biliar ou, nos casos de substâncias hidrossolúveis, através da urina, após transporte pelo sangue até aos rins.⁸

O termo circulação enterohepática é utilizado para referir um ciclo no qual os fármacos ou seus metabolitos são excretados na bÍlis e, depois, reabsorvidos no intestino delgado, voltando ao fígado através da veia porta. Tal facto, poderá aumentar a biodisponibilidade de determinados fármacos, tendo implicações na farmacocinética dos mesmos. De igual modo, a circulação enterohepática pode ter efeitos nefastos no organismo, aumentando a exposição a determinados compostos nocivos para o mesmo.¹⁰

Metabolismo de Fármacos no Fígado

A maioria dos fármacos são quimicamente modificados ou metabolizados no organismo, sendo poucos os casos em que são eliminados sem sofrer qualquer processo metabólico. Os processos bioquímicos responsáveis pelo metabolismo dos fármacos, determinam, em grande parte, a duração de ação desses fármacos, a sua eliminação e possível toxicidade associada.¹¹

Vários locais do organismo estão envolvidos no metabolismo de fármacos. Todavia, o fígado constitui o tecido com atividade metabólica mais elevada, por unidade de peso, assumindo-se como o principal local de metabolismo de fármacos, contribuindo para tal, a elevada concentração enzimática aí encontrada. Assim sendo, o principal objetivo do metabolismo hepático de fármacos é produzir compostos mais polares, facilitando a sua

excreção através de fluidos corporais, como a bÍlis e a urina, as principais vias de eliminação. Geralmente, o metabolismo do fármaco diminui o seu efeito terapêutico, inativando-o. Contudo, há situações em que um precursor inativo se transforma num composto ativo, como  o caso dos pro-fármacos, ou, ainda, o metabolismo pode originar um metabolito tóxico.¹¹

Regra geral, o metabolismo de fármacos divide-se em duas fases distintas, ditas fase I e fase II, nas quais ocorrem diferentes tipos de reações, catalisadas por enzimas distintas. Alguns fármacos estão sujeitos apenas a reações de uma fase, sendo que a maioria experimentam reações das duas fases, consecutivamente.¹¹

O principal local de metabolismo no hepatócito é o retículo endoplasmático liso, mais precisamente, nos microsomas, nos quais estão contidas as enzimas responsáveis. É neste local que se encontra a família das citocromo P450 monooxigenases (CYPs), a família de enzimas com maior intervenção ao nível do metabolismo de fármacos. Os CYPs são enzimas de fase I e catalisam reações de oxidação, o tipo de reação mais comum nesta fase.¹¹

Existem, ainda, outros tipos de reações de fase I que não são mediadas por CYPs. Podem ocorrer reações de hidrólise, catalisadas por esterases e amidases, reações de redução mediadas por redutases e, por último, reações de oxidação mediadas por monooxigenases dependentes de flavina ou monoamina oxigenases.^{10,11}

As reações de fase II são designadas por reações de conjugação, uma vez que, envolvem a adição de uma espécie endógena, aumentando a polaridade do substrato. As principais reações de fase II incluem a glucuronidação, a sulfatação e a acetilação. A glucuronidação apresenta-se como a principal reação de fase II na via de metabolismo de fármacos. Contempla a transferência de ácido glucurnico para o substrato, mediada por uma família de enzimas designadas UDP-glucuroniltransferases (UGTs). A sulfatação  uma reação através da qual as sulfotranferases transformam fenóis, hidroxilaminas ou álcoois em esteres de sulfato. Por fim, outro tipo de reação de fase II com relativa importância é a acetilação de aminas, aromáticas ou alifáticas, e grupos hidroxilo, catalisada pelas N-acetiltransferases (NATs).^{10,11}

Após terminadas as reações de fase II, nem todos os metabolitos são farmacologicamente inativos. Alguns apresentam atividade terapêutica, enquanto outros se tornam altamente reativos e tóxicos.¹⁰

O metabolismo hepático de fármacos pode ser influenciado por diversos fatores fisiológicos ou patológicos. Entre os fatores fisiológicos destacam-se: a idade, o sexo, a presença de polimorfismos nas enzimas intervenientes no metabolismo e a alimentação.

Quanto aos fatores patológicos, é fulcral qualquer patologia hepática que condicione o normal funcionamento dos hepatócitos. É de salientar, também, a influência do reduzido fluxo sanguíneo em casos de insuficiência hepática e qualquer patologia inerente aos rins.¹¹

Fisiopatologia Hepática

Tradicionalmente, a lesão hepática é classificada em aguda ou crónica, atendendo ao padrão de cronicidade da doença. Quase na totalidade dos casos, esta lesão apresenta-se sob a forma de hepatite, definida como processo inflamatório do fígado. A hepatite aguda refere-se a uma lesão direcionada para os hepatócitos, que ocorre de forma abrupta e durante um curto período de tempo. A etiologia é variada, sendo a hepatite viral a forma mais comum. Pode, também, resultar de toxicidade induzida por diversas fontes, nomeadamente etanol e fármacos, igualmente importantes no contexto clínico e estatístico da doença. Existem, ainda, outras causas menos comuns como a autoimune e a isquémia ou choque hepático. O resultado da hepatite aguda é variável. Na maior parte dos casos ocorre recuperação, com regeneração e funcionamento normal do órgão. Em alguns casos a recuperação não é possível, havendo desenvolvimento de hepatite crónica. Numa pequena percentagem dos casos, o nível de destruição do fígado é elevado, o que leva a FHA, sendo necessário recorrer a um transplante.^{12, 13}

A hepatite crónica assume-se como uma lesão contínua dos hepatócitos por um período de tempo superior a 6 meses. É caracterizada por persistente inflamação e necrose do fígado, frequentemente acompanhadas de fibrose. Pode progredir para cirrose, a qual leva a insuficiência hepática geralmente, e aumenta a predisposição para desenvolvimento de hepatocarcinoma. A hepatite crónica assume-se, assim, como uma condição com elevado risco de morbilidade e mortalidade associado. A causa mais comum é a infeção pelo vírus da hepatite B ou pelo vírus da hepatite C, sendo este último o grande responsável pelo maior número de casos de hepatite crónica em todo o mundo. Contudo, existem outros fatores desencadeantes de hepatite crónica, sendo a lesão hepática induzida por consumo excessivo de álcool um dos mais documentados nos países desenvolvidos.¹³

Relativamente à manifestação da doença hepática, esta mostra-se, muitas vezes, sintomaticamente silenciosa até um estadio avançado. A hepatite aguda pode ser assintomática, mas frequentemente ocorre icterícia, o sintoma primário de lesão hepática. No

caso das hepatites virais, inicialmente, podem ocorrer sintomas comuns de infecção como estados febris e dores musculares e articulares. Por sua vez, a maioria dos casos de hepatite crônica é assintomática. Pode ocorrer icterícia e podem estar presentes sintomas não específicos como fadiga, fraqueza, falta de concentração e depressão. Apesar deste quadro clínico relativamente leve, a evolução da doença poderá culminar na cirrose.¹³

A cirrose define-se anatomicamente como fibrose difusa com regeneração nodular e representa o estadió final no processo de cicatrização e regeneração do fígado na lesão crônica. Implica a morte de hepatócitos e a sua substituição por tecido conjuntivo fibroso e, apesar de todas as patologias hepáticas crônicas poderem conduzir a cirrose, a maioria dos casos tem a hepatite crônica na sua origem. A perda de hepatócitos tem como consequência a diminuição da função hepática podendo ocorrer falha do órgão e, consequentemente, a morte.¹³

Lesão Hepática Induzida por Fármacos

A FHA caracteriza-se por uma rápida deterioração da função hepática em indivíduos sem patologia hepática pré-existente. Como resultado, ocorre perda de função metabólica e imunológica, um certo grau de alteração mental (encefalopatia), alteração ao nível do perfil de coagulação e, em casos extremos, progressiva falência multiorgânica. A FHA, apesar de rara, assume uma condição portadora de elevado grau de morbidade e mortalidade. As principais causas são a LHIF, as hepatites virais, as doenças hepáticas autoimunes e o choque hepático provocado por isquémia.¹⁴

A LHIF refere-se à lesão hepática induzida por um fármaco ou por um produto vegetal farmacologicamente ativo, caracterizada por resultados anormais em testes bioquímicos hepáticos ou por presença de disfunção hepática. Em muitos casos, a lesão é resultado de respostas metabólicas idiossincráticas ou reações inesperadas, ou seja, independentes da dose. Contrariamente, existem casos de toxicidade dose-dependentes, como o exemplo do paracetamol.^{6,15}

Segundo um modelo explicativo simplificado, o mecanismo de lesão da LHIF divide-se em três momentos. Primariamente, um fármaco ou metabolito induz stress celular, provoca ativação de reações imunológicas e/ou debilita a função mitocondrial, levando, como consequência, ao segundo momento, no qual ocorre alteração da permeabilidade mitocondrial.

Por último, dá-se a morte celular devida a necrose ou apoptose. Atendendo à natureza idiossincrática de muitos casos de LHIF, torna-se importante a consideração pela influência genética.¹⁵

A sintomatologia é variada, encontrando-se, geralmente, os sintomas habituais associados à lesão aguda do fígado, tais como icterícia, fadiga, náusea, dor abdominal e febre. Quanto ao padrão clínico, a LHIF é classificada em hepatocelular, colestática ou mista, podendo o padrão ser estabelecido com base nos sintomas apresentados e/ou no perfil laboratorial.¹⁶

Devido ao facto de ainda não existir um biomarcador específico da LHIF, o diagnóstico primário é baseado na exclusão de outros fatores capazes de induzir lesão hepática aguda. No caso de suspeita de LHIF, o diagnóstico inclui a avaliação clínica e bioquímica, podendo em alguns casos incluir a avaliação histológica recorrendo a biópsia. A avaliação clínica assume grande importância no diagnóstico, nomeadamente, a tentativa de estabelecer o tempo de latência da LHIF, ou seja, o intervalo entre o primeiro dia de exposição ao agente suspeito e o dia de aparecimento dos sintomas, de forma a tentar confirmar a associação entre o agente e o aparecimento da lesão. O historial farmacológico do doente, no que diz respeito à toma concomitante de outros fármacos, assim como o historial de consumo de álcool são igualmente importantes para o diagnóstico de LHIF. Na análise bioquímica, atualmente procede-se à medição dos biomarcadores mais comuns como a ALT, a aspartato aminotransferase (AST), a fosfatase alcalina (ALP), a gama glutamiltransferase (GGT) e a bilirrubina.¹⁶

O prognóstico é, obviamente, dependente do grau de lesão hepática apresentado no momento do diagnóstico da LHIF. Para a maioria dos casos de doentes com LHIF aguda, é esperada uma recuperação completa após a suspensão da utilização do agente causal. Por sua vez, o prognóstico é mau para um doente que apresente FHA com encefalopatia e alteração da coagulação, sendo eminente a necessidade de recorrer a transplante hepático. A percentagem de casos que evolui para doença hepática crónica é relativamente baixa e caracteriza-se pela presença de valores elevados dos parâmetros bioquímicos, 6 meses após o diagnóstico de LHIF.⁶

3. Biomarcadores utilizados no diagnóstico

Biomarcadores Tradicionais

Atualmente, ainda não se encontra disponível um marcador biológico com especificidade e sensibilidade necessárias para a detecção e diagnóstico diferencial de LHIF, pelo que se recorre aos comuns marcadores de avaliação hepática.

A primeira linha de biomarcadores a dosear na presença ou suspeita de LHIF contempla: a aspartato aminotransferase, a alanina aminotransferase, a fosfatase alcalina, a gama glutamil transferase e a bilirrubina total (Tabela 1). O doseamento conjunto da AST, da ALT, da ALP e da GGT plasmáticas é extremamente útil para diferenciação entre padrão hepatocelular ou colestático da doença.⁵

Tabela 1 - Parâmetros bioquímicos atualmente utilizados na monitorização da função e lesão hepática. Adaptado de Antoine *et al.*, 2009.

Biomarcador	Intervalo Normal de Referência
Alanina Aminotransferase (ALT)	5-40 U/L
Aspartato Aminotransferase (AST)	10-40 U/L
Fosfatase Alcalina (ALP)	30-120 U/L
Gama Glutamil Transferase (GGT)	0-51 U/L
Bilirrubina Total	2-14 µmol/L

Recentemente, um grupo internacional de especialistas publicou um conjunto de guidelines para o diagnóstico de LHIF. Perante pacientes sem historial prévio de patologia hepática, um dos seguintes critérios deve estar presente: $ALT \geq 5 \times ULN$ (Upper Limite Normal); $ALP \geq 2 \times ULN$; ou $ALT \geq 3 \times ULN$ e bilirrubina total $> 2 \times ULN$.¹⁷

A ALT é considerada o marcador com maior sensibilidade e relativamente mais específico para hepatotoxicidade. No entanto, a influência de fontes não hepáticas nos valores de ALT promove o risco de falsos positivos. Como tal, vários potenciais novos biomarcadores tem sido estudados e tem sido avaliada a sua utilidade adicional relativamente ao painel de marcadores atualmente utilizados.⁵

A maioria dos casos de LHIF é assintomático até atingir um estadió avançado em que já se encontram presentes lesões histológicas. Como tal, torna-se essencial um diagnóstico precoce, antecedente ao aparecimento de lesões estruturais que possam conduzir a falha hepática.

AST e ALT

A aspartato aminotransferase, também designada por transaminase glutâmico oxalacética (GOT), é uma enzima com localização, predominantemente, mitocondrial e uma menor fração citosólica. Apresenta-se distribuída por vários tecidos do organismo, nomeadamente, coração, músculo esquelético, rins, cérebro e pulmões, o que diminui a sua especificidade para a lesão hepática.¹⁸

Resultados obtidos mostram que em casos de lesão aguda provocada por isquemia ou toxicidade induzida por um composto, a atividade da AST é elevada, podendo ser mais de 10 vezes superior ao limite normal, atingindo um pico nas primeiras 24 horas após o evento, e regressando a valores normais até 7 dias após o mesmo. Para valores plasmáticos de AST superiores a 200 U/L, a sensibilidade e a especificidade deste marcador é 91% e 95%, respetivamente.^{18,19}

Apesar de a AST continuar a ter ampla utilização, esta é, geralmente, feita em concomitância com a ALT, sendo que o valor da relação entre ambas é um importante indicador de severidade no diagnóstico da lesão hepática.²⁰

A alanina aminotransferase, também designada por transaminase pirúvico oxaloacética, é uma enzima com localização citosólica, que se encontra primordialmente no fígado. Esta, também pode ser encontrada nos rins e, em muito menores quantidades, no coração e músculo esquelético. A atividade da ALT plasmática é o indicador utilizado com maior frequência na deteção de hepatotoxicidade e é considerado o biomarcador de eleição na lesão hepática.^{4,19}

Atualmente, o valor limite considerado normal é aproximadamente 40 U/L, havendo a possibilidade de variação interlaboratorial. Tal como a AST, a atividade da ALT pode ser mais de 10 vezes superior ao limite normal (ULN), em casos de lesão hepática aguda. Apesar de inicialmente os valores da AST serem superiores aos da ALT, se a lesão persistir, os níveis

da ALT tornam-se superiores aos da AST passadas 24-48 horas, resultado do seu tempo de meia-vida plasmática mais elevado.^{21,22}

A utilização da ALT como marcador biológico no diagnóstico diferencial de LHIF é relativamente limitado. Embora na presença de valores plasmáticos de ALT superiores a 300 U/L, a sensibilidade seja 96% e a especificidade 94% para lesão hepática aguda, várias etiologias podem ser consideradas, nomeadamente hepatite viral aguda, hepatite isquémica, hepatite auto-imune ou oclusão biliar aguda.^{16,21} Tal facto, é apoiado por um estudo no qual, de um total de 129 indivíduos que apresentavam valores de ALT mais de 10 vezes superiores ao limite normal, apenas 25 (19,4%) foram diagnosticados com LHIF, sendo os restantes diagnosticados com outras patologias.²³

Os níveis de ALT são influenciados por vários fatores não patológicos: género (valores mais elevados no homem do que na mulher), índice de massa corporal (IMC), nível de triglicérides e colesterol total, consumo de álcool, exercício físico e variação circadiana (valores mais elevados durante o dia, com pico à tarde).²²

A ALT constitui um excelente marcador biológico para a deteção precoce de lesão hepática. No entanto, a presença de valores elevados para esta enzima requer uma avaliação clínica apropriada, com doseamento de outros parâmetros e conhecimento do historial clínico do indivíduo, com vista ao estabelecimento de um diagnóstico preciso.^{21,22}

A razão AST/ALT é um parâmetro com grande utilidade no diagnóstico de doença hepática, principalmente ao nível do conhecimento da extensão da lesão. Geralmente, valores de AST/ALT ≥ 1 estão associados a lesão severa, na qual a lesão celular se estende à mitocôndria. Esta situação é característica na presença de cirrose.²⁰

GGT e ALP

A fosfatase alcalina é uma proteína membranar envolvida no transporte de metabolitos através das membranas celulares, e com origem em dois tecidos principais: hepático e ósseo. No entanto, esta está presente em outros locais do organismo, tal como rins, intestinos, placenta e leucócitos. Patologias do fígado e dos ossos são a causa mais comum de elevação dos valores da ALP. Níveis elevados desta enzima também podem ter origem fisiológica. Por exemplo, na adolescência, os valores podem atingir o dobro em relação aos considerados

normais, consequência do crescimento ósseo verificado nesta fase de desenvolvimento estrutural.

A ALP hepática está presente no epitélio dos canalículos biliares. A colestase promove o aumento da síntese e a sua libertação da superfície celular. O aumento dos valores de ALP acontece 1-2 dias após o evento de obstrução biliar e a sua meia-vida é de aproximadamente 1 semana, e o grau de alteração enzimática parece não ter relevância para um diagnóstico preciso, sendo essencial a observação de sintomas e o conhecimento do historial do paciente.

Nos casos em que a LHIF apresenta um padrão colestático, existe um aumento de ALP, embora o grau de alteração seja variável. Em casos agudos de obstrução biliar, a alteração ALP pode ser acompanhada por um pico dos níveis das transaminases e elevação da bilirrubina conjugada.

Perante valores elevados de ALP, o primeiro passo é identificar a origem da enzima. Na ausência de sintomas ou indicações que permitam inferir acerca da causa, recomenda-se o doseamento de outros biomarcadores com atividade no tecido hepático e ausentes no osso. O marcador preferencial para complementar a informação fornecida pela ALP é a gama glutamil transferase (GGT).

A gama glutamil transferase é uma enzima membranar com função importante no metabolismo da glutatona, metabolizando a glutatona reduzida extracelular e repondo a glutatona intracelular através da reutilização de aminoácidos percussores. Por ordem decrescente de concentração, a GGT localiza-se nos rins, fígado, pâncreas e intestinos. No entanto, a sua atividade plasmática provém maioritariamente do fígado, onde se localiza no epitélio dos canalículos biliares.^{24,25}

O mecanismo de alteração da GGT é semelhante ao da ALP. Podem surgir níveis elevados desta enzima devido a patologias não hepáticas, tais como, doença pulmonar obstrutiva crónica, falha renal e patologia pancreática. O tempo de meia-vida da GGT é aproximadamente 10 dias, podendo atingir os 28 dias em casos de lesão hepática induzida pelo consumo de álcool.²⁶

Os níveis plasmáticos de GGT sofrem, igualmente, influência de alguns fatores não patológicos. Estudos mostram que os valores de GGT são influenciados pelo género, idade, IMC e consumo de álcool. Como tal, os valores desta enzima são superiores nos homens, aumentam a partir dos 40 anos, aproximadamente, e apresentam proporcionalidade direta com o IMC e o consumo de álcool.²⁷

A GGT mostra-se ligeiramente mais sensível do que ALP na doença hepática obstrutiva. Contudo, atendendo aos motivos já enumerados, este marcador biológico apresenta falta de especificidade para a doença hepática. Como tal, a sua utilização deve ser feita em concomitância com outros marcadores, nomeadamente, reservada para identificação da causa de alteração dos valores de ALP.^{25,28}

Bilirrubina

A icterícia, caracterizada pela coloração amarela da pele e mucosas, deve-se ao aumento de bilirrubina em circulação. Esta condição é clinicamente evidente quando os valores de bilirrubina plasmática são $>34 \mu\text{mol/L}$, ou seja, mais do dobro do valor limite normal ($<18 \mu\text{mol/L}$). É a manifestação clínica mais específica e, geralmente, a primeira de disfunção hepática. No entanto, a icterícia pode não estar presente em muitos indivíduos com lesão hepática (principalmente em situações crónicas), ou a sua manifestação ser devida a etiologia não hepatopatológica como, por exemplo, hiperprodução de bilirrubina devido a hemólise aumentada ou distúrbios no metabolismo desta com origem genética.²⁹

A bilirrubina é um produto da degradação da hemoglobina, mais precisamente do grupo heme, ocorrida no baço. A bilirrubina, que é insolúvel, circula ligada à albumina até atingir o fígado onde, por ação da UGT, é conjugada com ácido glucorónico, tornando-se solúvel e possível de eliminar através da bÍlis. No intestino delgado, a bilirrubina é metabolizada e maioritariamente excretada nas fezes. Uma pequena parte é reabsorvida através do epitélio intestinal e é excretada na urina. Em condições patológicas, nas quais a bilirrubina conjugada não consegue atingir o intestino, a sua excreção passa a acontecer principalmente por via renal.³⁰ Como referido anteriormente, apesar de a icterícia poder ter origem no aumento de bilirrubina não conjugada, em casos de produção aumentada de bilirrubina ou deficiência ao nível da sua conjugação, a causa mais comum de icterícia é a acumulação de bilirrubina conjugada devido a lesão hepatocelular, colestase ou obstrução biliar.³¹

Em indivíduos saudáveis, a bilirrubina conjugada encontra-se ausente da circulação sanguínea, fruto da eficácia do processo de excreção biliar. A bilirrubina conjugada plasmática pode ser doseada por 2 métodos espectralométricos: bilirrubina direta e bilirrubina total. O primeiro mede a bilirrubina conjugada e δ -bilirrubina (bilirrubina ligada a

albumina), e apenas uma pequena percentagem de bilirrubina não conjugada. O método de doseamento da bilirrubina total, como o próprio termo indica, mede todas as formas de bilirrubina. No entanto, a presença de bilirrubina conjugada na urina continua a ser um bom indicador de lesão hepática.^{25,31}

A avaliação dos valores de bilirrubina deve ser enquadrada no painel dos restantes marcadores biológicos de lesão hepática. Assim, hiperbilirrubinemia em concomitância com valores marcadamente elevados das transaminases, poderá sugerir lesão aguda de origem toxica ou isquémica, enquanto que hiperbilirrubinemia e valores elevados de ALP poderá sugerir um padrão colestático provocado por fármacos.²⁶

Biomarcadores com futura utilização clínica

MicroRNA

Recentemente, os microRNA (miRNA) têm sido descritos como potenciais biomarcadores de lesão hepática aguda. miRNA são moléculas de RNA curtas (18-25 nucleotídeos) e não codantes, que tem como função reprimir um conjunto variado de mRNA e, deste modo, regular o fenótipo celular. Estão envolvidos em vários processos celulares, nomeadamente, diferenciação, proliferação e apoptose. Apesar de existir uma grande variedade de miRNAs expressos em diferentes tecidos, estas moléculas apresentam elevada especificidade tecidual.³²

No fígado, o miRNA com maior expressão é o miR-122, seguido do miR-192. Alguns fatores de transcrição específicos do tecido hepático (HNF1 α , HNF3 α e HNF3 β) foram associados à função regulatória do miR-122.³³

Wang et al., 2009 verificaram que em ratinhos tratados com acetaminofeno, o miRNA-122 e o miRNA-192 apresentam os valores plasmáticos mais elevados. No entanto, os valores destes no tecido hepático apresentam uma diminuição, explicada pela provável perda de integridade dos hepatócitos e consequente perda das moléculas para a circulação.

Os miRNA plasmáticos são quantificados através do método de *Real Time PCR*, utilizando *primers* específicos. O tempo de meia-vida dos miRNA plasmáticos ainda não é concretamente conhecido. No entanto, estudos indicam que é significativamente inferior ao da ALT.³³

Dados indicam que comparativamente com a ALT, os miRNA plasmáticos apresentam maior sensibilidade em situação de LHIF, verificando-se elevação dos valores 1 hora após administração de acetaminofeno e deteção de doses mais baixas. De igual modo, perante uma situação de LHIF, a variação dos valores dos miRNA é inferior quando comparada com a variação apresentada pela ALT (Figura 2).³⁴

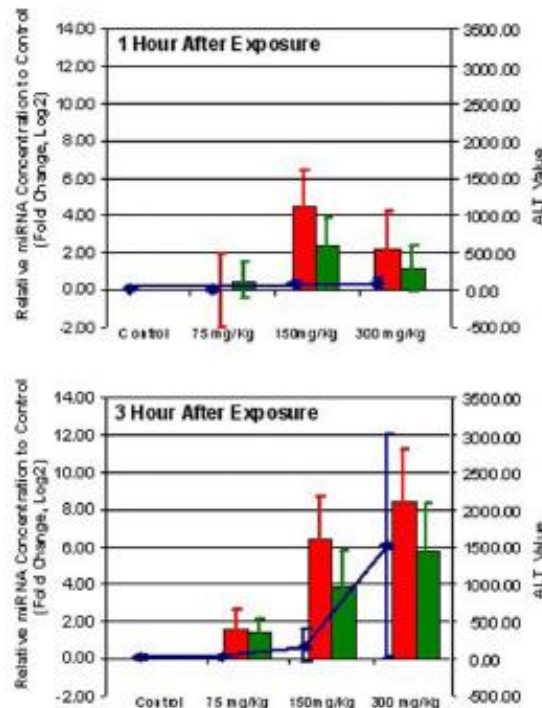


Figura 2 - Comparação dos valores plasmáticos de ALT e miRNA 1 e 3 horas após tratamento com diferentes doses de acetaminofeno. Adaptado de *Wang et al.*, 2009.

Lewis et al., 2011 observaram que os níveis plasmáticos de miRNA-122 se encontram elevados tanto em quadros de lesão hepática aguda induzida por acetaminofeno como em quadros de lesão hepática aguda com diferente etiologia, enquanto o miRNA-192 plasmático apenas se encontra elevado no primeiro caso. De igual modo, o miRNA-122 mostra correlação com o pico de atividade da ALT plasmática, facto não observado para o miRNA-192.

Está descrito que a elevação significativa dos níveis de ALT pode estar associada a situações de dano muscular, nomeadamente, após esforço físico intenso, o que pode contribuir para o aparecimento de falsos positivos no diagnóstico de lesão hepática. Por sua vez, o miRNA-122 parece não ser afetado por esta condição.³⁵

A doença renal aparece muitas vezes associada a condições patológicas hepáticas. Em indivíduos com doença renal crónica, os miRNA plasmáticos apresentam um ligeiro aumento.

Em contrapartida, na mesma situação, o miRNA-122 não apresenta qualquer correlação com a creatinina plasmática, um marcador biológico da função renal.³³

Os miRNA plasmáticos hepáticos demonstram valor acrescentado na deteção e diagnóstico de lesão hepática aguda, e mostram futuro potencial para biomarcadores de LHIF. Estes apresentam maior especificidade e sensibilidade comparativamente à ALT, sendo que, entre eles, o miRNA-122 apresenta maior especificidade do que o miRNA-192 para a lesão hepática aguda.^{33,34}

Contudo, estudos futuros são necessários com vista a obter uma melhor definição do processo de libertação celular dos miRNA e se essa libertação está diretamente relacionada com o processo lesivo. Deve ser investigado, também, o valor prognóstico que este marcador poderá evidenciar em situações de LHIF. Em termos laboratoriais, é necessário proceder a uma normalização de recolha, quantificação e avaliação dos valores.³²

Glutathione S-Transferase α

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima de fase II com função de destoxificação, responsável pela conjugação de glutathione reduzida com inúmeros substratos endógenos ou exógenos. Perante a presença de xenobióticos, nomeadamente fármacos, a síntese GST é induzida, desempenhando um papel importante na eliminação de metabolitos tóxicos, geralmente resultantes da fase I do metabolismo. Nos humanos existem 4 isoenzimas da GST (α , π , μ e θ), sendo que a predominante no fígado é a α , a qual se encontra no citosol do hepatócito.³⁶

Perante lesão dos hepatócitos, a GST α é libertada para a circulação sanguínea, onde o tempo de meia-vida é aproximadamente 1 hora, podendo ser medida pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).³⁶

Giffen et al., 2002 testaram a utilidade diagnóstica da GST α para hepatotoxicidade aguda, comparando com os valores plasmáticos de AST e ALT. Para tal, utilizaram ratos aos quais foi administrada uma dose oral única de 3 compostos, descritos anteriormente como indutores de elevada toxicidade e consequente necrose dos hepatócitos.

A elevação dos níveis plasmáticos de GST α foi concordante com a análise histopatológica de amostras de tecido. Adicionalmente, a variação dos valores desta enzima nos animais tratados relativamente ao controlo foi superior à variação da AST e ALT nas

mesmas condições. Contudo, a elevação dos valores de GST α não mostrou acontecer primariamente à verificada para as outras enzimas. De igual forma, a especificidade da GST α para o tecido hepático não é assegurada uma vez que esta enzima também é encontrada nos rins. Embora as variações com origem neste órgão não sejam elevadas, podem interferir nos valores de diagnóstico de patologia hepática.³⁷

Em outro estudo envolvendo ratos e administração de ácido valpróico durante 14 dias, os valores de GST α plasmática mostraram-se aumentados a partir do 4º dia, dia em que foi diagnosticada hepatotoxicidade com base nas amostras histológicas, caracterizada por inflamação, cicatrização e necrose. Num modelo que apresentou inflamação no 2º dia (pré-necrose), verificou-se um aumento de GST α , embora os valores não tenham apresentado significado estatístico.³⁸

A GST α não transmite informação adicional relativamente ao momento de exposição ao agente causal nem ao prognóstico, comparativamente aos marcadores já utilizados. A sua utilização terá utilidade na interpretação de valores elevados das transaminases na lesão hepática.

HMGB1 e Citoqueratina 18

High-mobility group box-1 protein (HMGB1) é um constituinte nuclear que se encontra estruturalmente ligado à cromatina. Este é passivamente libertado para o meio extracelular quando a integridade membranar da célula é comprometida, como acontece em situação de necrose, atuando como indicador de dano e morte celular. Por outro lado, o HMGB1 é também ativamente secretado por monócitos e macrófagos numa forma hiperacetilada, desenvolvendo uma ação pró-inflamatória. Em situações de apoptose, os valores de HMGB1 em circulação são, geralmente, baixos.³⁹

As citoqueratinas são proteínas que constituem filamentos presentes nas células epiteliais, responsáveis pela manutenção da integridade e estrutura destas. A expressão destas proteínas ocorre consoante especificidade celular, pelo que a citoqueratina 18 (K18) é expressa no epitélio glandular. As citoqueratinas sofrem reorganizações durante vários eventos celulares, tais como a apoptose, situação na qual a K18 é clivada por ação das caspases dando origem a fragmentos (cK18). K18 e cK18 circulantes podem ser detetados por ELISA e utilizados como indicadores de necrose e apoptose, respetivamente.⁴⁰

A necrose hepatocelular é a forma de lesão mais comum nos casos de hepatotoxicidade induzida por paracetamol. Estudos de overdose deste fármaco induzida em modelos animais têm evidenciado bons resultados quanto à utilização de HMGB1 e K18 como indicadores de necrose.

Estudos recentes têm sugerido a utilização de HMGB1, K18 e cK18 em complemento dos marcadores tradicionais, com o objetivo de se obter um diagnóstico diferencial quanto à relevância clínica da lesão hepática.

Antoine *et al.*, 2012 estudaram a utilidade destes biomarcadores na identificação do mecanismo de lesão, o seu valor prognóstico e a relação com o resultado clínico de pacientes com hepatotoxicidade induzida por paracetamol. Neste estudo foram observados 84 pacientes com idade superior a 16 anos, admitidos em dois centros hospitalares (Reino Unido e EUA) com diagnóstico de overdose de paracetamol. Os pacientes foram divididos em dois grupos, consoante apresentassem valores normais ou anormais nos testes de função hepática. Todos receberam tratamento com N-acetilcisteína e os parâmetros clínicos e laboratoriais foram registados diariamente ao longo do tempo de hospitalização.

Observou-se uma forte correlação entre a atividade da ALT e HMGB1 ($R^2 = 0.60$, $p < 0.0001$) e entre a atividade de ALT e K18 ($R^2 = 0.58$, $p < 0.0001$) (Figura 3).⁴¹

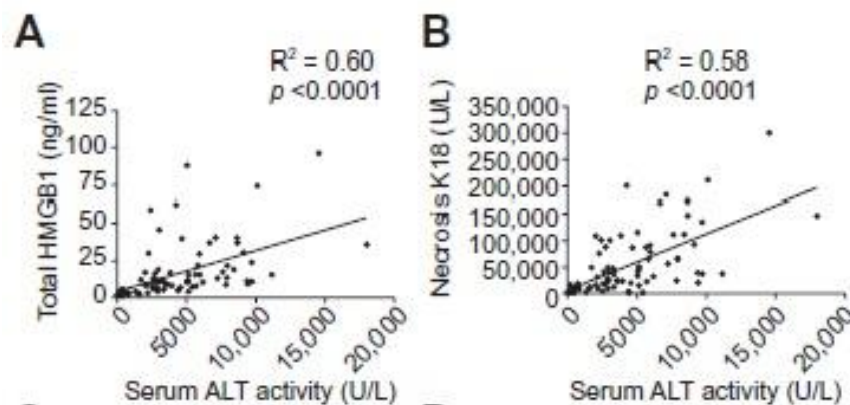


Figura 3 - Quantificação de HMGB1 e K18 e correlação com atividade de ALT. Adaptado de Antoine *et al.*, 2012.

Os novos biomarcadores demonstraram sensibilidade superior à ALT. Tal facto ficou evidenciado no caso de um paciente que apresentou testes de função hepática normais no momento de admissão hospitalar e, posteriormente, desenvolveu lesão hepática. HMGB1 e K18 apresentaram valores significativamente elevados 24 horas antes do aumento de atividade da ALT (Figura 4).⁴¹

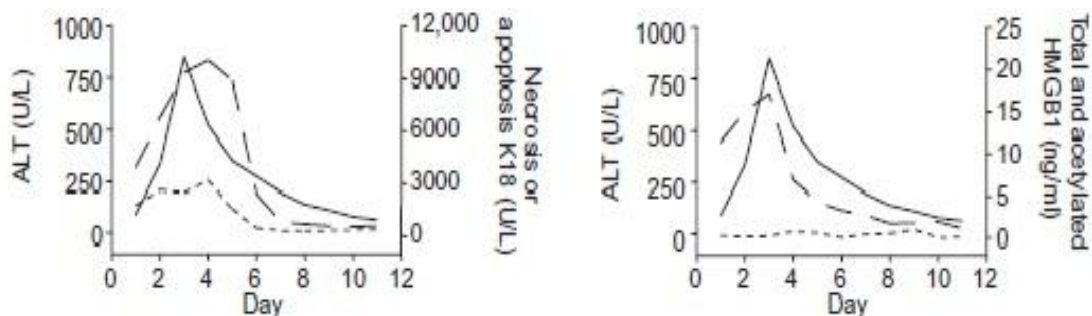


Figura 4 - Evolução temporal do perfil das formas moleculares de HMGB1 e K18 comparativamente à atividade de ALP. HMGB1 total (traço longo); HMGB1 hiperacetilado (traço curto); K18 (traço longo); cK18 (traço curto); atividade da ALT (traço contínuo). Adaptado de Antoine *et al.*, 2012.

O potencial de prognóstico dos novos biomarcadores mostrou ser superior ao da ALT. Atendendo aos valores observados no grupo de indivíduos com testes de função hepática anormais no momento de admissão hospitalar, verificou-se uma média de valores de HMGB1 e K18 significativamente superior nos pacientes que viriam a morrer ou ser submetidos a transplante do que nos pacientes que recuperaram. Os valores médios da atividade da ALT entre os dois grupos não apresentaram grande variação (Tabela 2).⁴¹

Tabela 2 - Valor prognóstico de HMGB1 e K18 no contexto de overdose de paracetamol. Adaptado de Antoine *et al.*, 2012.

	Recuperação	Morte/Transplante Hepático
Número de pacientes	51	27
Atividade da ALT (U/L)	4005,1 (2595,1-7280,8)	3334,0 (1777,4-6226,3)
K18 (U/L)	23.383,8 (8171,7-55.931,4)	64.151,0 (20.070,1-110.381,5)*
HMGB1 Total (ng/ml)	8,9 (4,5-15,2)	15,9 (8,2-40,1)*

Os valores apresentados correspondem à média e à variação interquartil. *p <0,01.

Num outro estudo, HMGB1 e K18 foram utilizados com o objetivo de determinar o potencial de lesão associado a elevação das transaminases em indivíduos sujeitos a tratamento com colestiramina. A colestiramina é um fármaco antilipídémico que apesar de nunca ter sido associado a situações de lesão hepática, é responsável por elevação assintomática do valor de ALT.

Indivíduos saudáveis foram tratados com colestiramina e, posteriormente, foram determinados os valores de ALT, AST e ALP. Apenas os pacientes que apresentaram níveis

de ALT superiores a $3 \times$ ULN foram admitidos para monitorização com os biomarcadores experimentais. É importante referir que as elevações enzimáticas foram assintomáticas e retornaram para níveis normais no intervalo de 2 semanas.⁴²

Observou-se elevação dos valores de HMGB1, K18 e cK18, evidenciando a ocorrência de necrose/apoptose induzidas pela colestiramina. Os autores compararam os valores obtidos neste estudo com os valores obtidos por Antoine *et al.* no seu trabalho experimental no contexto de lesão hepática aguda induzida por paracetamol. Observaram que os valores por si obtidos se enquadravam no intervalo de valores descritos por Antoine *et al.*, havendo um contraste claro entre uma situação assintomática e clinicamente insignificante no primeiro caso, e uma situação de lesão aguda no segundo.⁴²

HMGB1 e K18 apresentam sensibilidade e potencial de prognóstico superiores, comparativamente ao painel de biomarcadores tradicionalmente utilizados na determinação de LHIF, podendo vir a demonstrar importância na interpretação da progressão e resolução de quadros clínicos. No entanto, para a futura validação destes biomarcadores, são necessários mais estudos com outros fármacos, com populações LHIF negativas e LHIF positivas, e perceber qual a relação entre a amplitude da elevação dos valores e a extensão da lesão hepática.^{41,42}

Glutamato Desidrogenase

A glutamato desidrogenase (GLDH) é uma enzima chave no metabolismo de aminoácidos e na desintoxicação da amónia, como parte do ciclo de ureia, e localiza-se nas mitocôndrias. Encontra-se, predominantemente, nas mitocôndrias ricas em matriz, como as encontradas no fígado. Embora a GLDH também esteja presente nos tecidos renal e nervoso, estes libertam o conteúdo celular de células danificadas para o lúmen tubular e fluido cerebrospinal, respetivamente, ao invés do plasma, como acontece na lesão hepatocelular. Como tal, esta enzima apresenta relativa especificidade hepática.^{43,44}

O tamanho elevado da GLDH retarda a sua libertação das células danificadas, pelo que o seu aparecimento em circulação é considerado um indicativo de necrose celular. Dado a libertação desta enzima ser consequência de dano estrutural da mitocôndria e da membrana celular, a atividade plasmática desta pode ser mais elevada em casos de hepatotoxicidade com envolvimento de dano mitocondrial.⁴³

A utilização da GLDH como biomarcador de LHA tem sido documentada em vários casos utilizando ratos. A atividade plasmática desta enzima foi determinada e comparada com as atividades da ALT, AST, ALP e SDH, em situações de diferentes tipos de lesão hepática e exposição a vários compostos capazes de provocar lesão significativa, tais como dexametasona, paracetamol e isoniazida, entre outros. Comparativamente às outras enzimas, as elevações dos valores da atividade da GLDH apresentaram maior magnitude e persistiu mais tempo em circulação após os tratamentos. Esta enzima demonstrou maior especificidade tecidual e maior sensibilidade relativamente às transaminases.^{44,45}

A GLDH demonstrou ser um biomarcador de LHA induzida por fármacos mais eficaz do que a ALT, AST e ALP nos modelos animais. Futuramente, deveriam ser feitas investigações em humanos, com o objetivo de avaliar o desempenho diagnóstico da GLDH e comparar com os biomarcadores hepáticos tradicionais e com marcadores mais recentes.

Proteína F

A proteína F do soro, também designada como 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPD), é uma proteína chave no catabolismo da tirosina. Esta é produzida predominantemente no fígado e em menor quantidade nos rins. Em indivíduos saudáveis, a concentração plasmática de proteína F é baixa.⁴⁶

A proteína F foi medida através de radioimunoensaio em pacientes com diferentes patologias, demonstrando elevação nos portadores de lesão hepática provocada por diversas etiologias, nomeadamente, consumo excessivo de álcool (Figura 5).⁴⁷

Nos pacientes com patologias hepáticas, excluindo consumo excessivo de álcool, a concentração plasmática de proteína F estava aumentada em 91% dos casos. Ainda neste grupo, a concentração desta enzima demonstrou correlação significativa com a AST ($r = 0,62$; $p < 0,001$; Figura 6) e ALT ($r = 0,83$; $p < 0,001$). No total dos pacientes com lesão hepática, a concentração de proteína F apresentou valores anormais em 92%, evidenciando sensibilidade significativa. Por outro lado, a observação de elevações desta enzima nos pacientes com patologia não hepática determinou uma sensibilidade de 96%. A proteína F mostrou ser um marcador de lesão hepática mais sensível e específico do que os marcadores convencionais (ALT, AST, ALP e GGT).⁴⁷

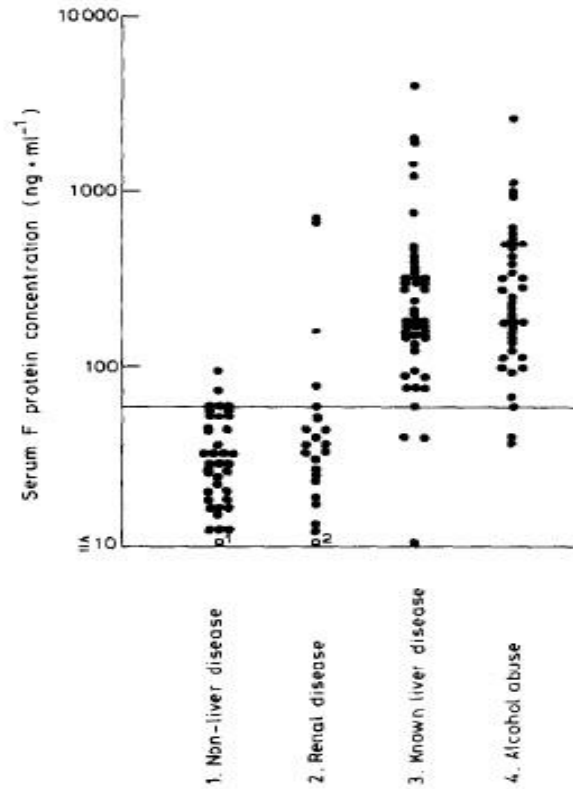


Figura 5 - Concentração de proteína F em pacientes com diferentes quadros clínicos. A linha indica o limite considerado normal. Adaptado de Foster *et al.*, 1989.

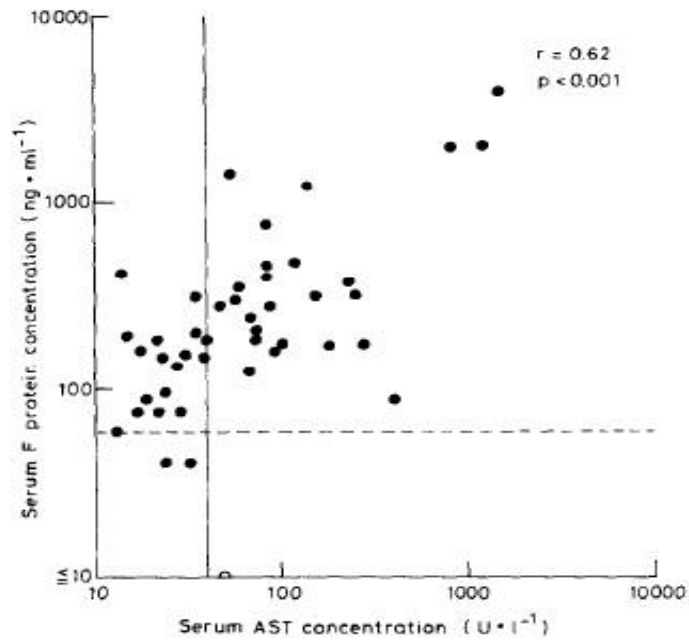


Figura 6 - Concentração de proteína F e atividade de AST nos pacientes com patologia hepática. As linhas indicam os limites considerados normais. Adaptado de Foster *et al.*, 1989.

Num outro estudo, a proteína F foi doseada em pacientes que se encontravam a tomar antiepiléticos. O valor desta enzima estava ligeiramente elevado em 6%, 22% e 13% dos pacientes que tomavam carbamazepina, fenitoína e ácido valpróico, respetivamente. Por sua vez, a GGT apenas mostrou elevação nos casos da carbamazepina e da fenitoína. A ALP apresentou atividade aumentada em 13%, 25% e 4% dos pacientes com carbamazepina, fenitoína e ácido valpróico, respetivamente. A atividade da GGT e a proteína F obtiveram um coeficiente de correlação de 0,56 para a carbamazepina e de 0,64 para a fenitoína, ambos com significância estatística. Os níveis aumentados de proteína F nos pacientes com ácido valpróico, comparativamente à ausência da GGT e aos poucos casos de elevação da ALP, levaram os autores a sugerir o valor da proteína F como indicador de disfunção hepática associada a antiepiléticos.⁴⁸

O desenvolvimento de reagentes e testes comerciais mais acessíveis, permitiriam potenciar o desenvolvimento deste biomarcador. De igual modo, mais estudos seriam proveitosos para confirmação dos trabalhos existentes.

Arginase I

A arginase é uma enzima que catalisa a hidrólise da arginina em ornitina e ureia, admitindo-se um papel importante na regulação dos níveis de arginina. São conhecidas duas isoformas desta enzima, arginase I e II, sendo que a primeira é altamente abundante no citosol hepático. A arginase II localiza-se na matriz mitocondrial e apresenta expressão reduzida e ampla distribuição tecidual.⁴⁹

A atividade da arginase I foi medida em pacientes sujeitos a transplante hepático devido a falha hepática. As medições foram efetuadas em momentos pré e pós-transplante, e foram comparadas com a atividade da ALT e da AST. A arginase demonstrou uma correlação significativa com as outras enzimas, obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,65 e 0,47 ($p < 0,05$) com a ALT e AST, respetivamente.⁴⁹

Noutro estudo, foi avaliada a utilidade da arginase em situações de lesão hepática aguda e crónica induzida por tioacetamida em ratos, através de medição da atividade por método imunoenzimático. No modelo de lesão aguda, a concentração de arginase I aumentou significativamente 8 horas após o tratamento, enquanto a ALT e a AST aumentaram 24 horas

após o mesmo. De igual modo, a extensão da elevação foi superior para arginase I (Figura 7).⁵⁰

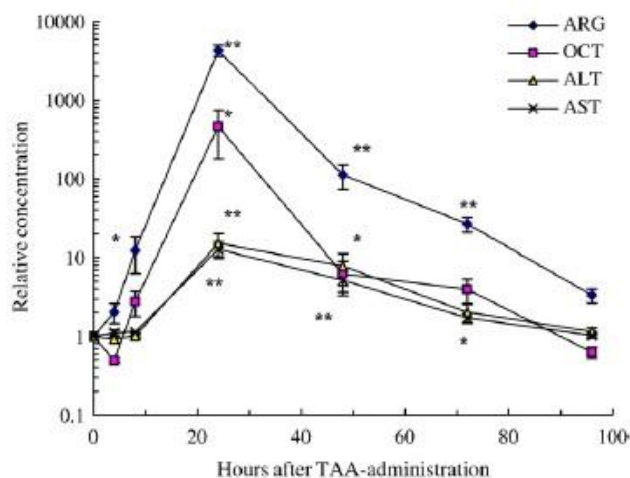


Figura 7 - Variação das concentrações enzimáticas no modelo de lesão hepática aguda. Adaptado de Murayama *et al.*, 2007. (*p < 0,05; **p < 0,01).

No modelo de lesão crónica, a concentração de arginase I aumentou 8 semanas após o início do tratamento, enquanto a ALT e AST aumentaram apenas após 12 semanas. Neste modelo, a extensão da elevação foi novamente superior na arginase I.⁵⁰

A arginase I mostrou ser um biomarcador útil na avaliação da lesão hepatocelular e demonstrou potencialidade para utilização clínica. Todavia, o facto de esta enzima ter sido analisada num conjunto limitado de estudos, justifica a necessidade de mais trabalho preliminar, nomeadamente ao nível de modelos mais semelhantes à realidade clínica.

4. Fármacos associados a disfunção hepática

Paracetamol

O paracetamol, também designado por acetaminofeno, é um dos fármacos não sujeitos a receita médica mais utilizados em todo o mundo, contribuindo para esta estatística a facilidade de acesso ao mesmo e o reduzido custo. O paracetamol é um fármaco com espectro de ação semelhante aos AINEs, o qual apresenta ação analgésica e antipirética, e muito reduzida ação anti-inflamatória. O poder analgésico é inferior ao dos NSAID, contudo o paracetamol é preferido muitas vezes por apresentar melhor tolerância.⁵¹

Apesar da segurança apresentada em doses terapêuticas, a overdose de paracetamol pode resultar em lesão hepática, o que tem sido apoiado por inúmeros estudos que apontam esta como uma das causas mais comuns de falha hepática aguda em países ocidentais.⁵²

Em condições normais, o metabolismo do paracetamol acontece, maioritariamente, por glucoronidação, catalisada pela UGT, e por sulfatação, mediada por sulfotransferases. Uma pequena percentagem ($\approx 10\%$) é metabolizada por CYP, principalmente pelo CYP 2E1, resultando o metabolito NAPQI (*N-acetil-p-enzoquinone imine*), responsável pela toxicidade hepática associada ao paracetamol. A destoxificação deste metabolito ocorre por conjugação com glutathione reduzida (GSH), mediada pela GST. Em casos de sobredosagem, ocorre saturação das duas principais vias do metabolismo e, conseqüentemente, o aumento de formação de NAPQI, que em grandes quantidades irá levar ao esgotamento da GSH e à acumulação no tecido hepático (Figura 8).

Embora o NAPQI se ligue covalentemente a várias proteínas celulares, este não parece ser o motivo da toxicidade. A toxicidade associada a este metabolito é devida a um conjunto de acontecimentos consecutivos que começa com o esgotamento da GSH citosólica. Em consequência, ocorre diminuição da GSH mitocondrial, uma vez que esta estrutura não produz GSH, o que leva a stress oxidativo. Ocorre aumento da permeabilidade da mitocôndria e conseqüente morte do hepatócito. O DNA libertado pelas células mortas induz a produção de citocinas e o associado processo inflamatório do fígado.⁵³

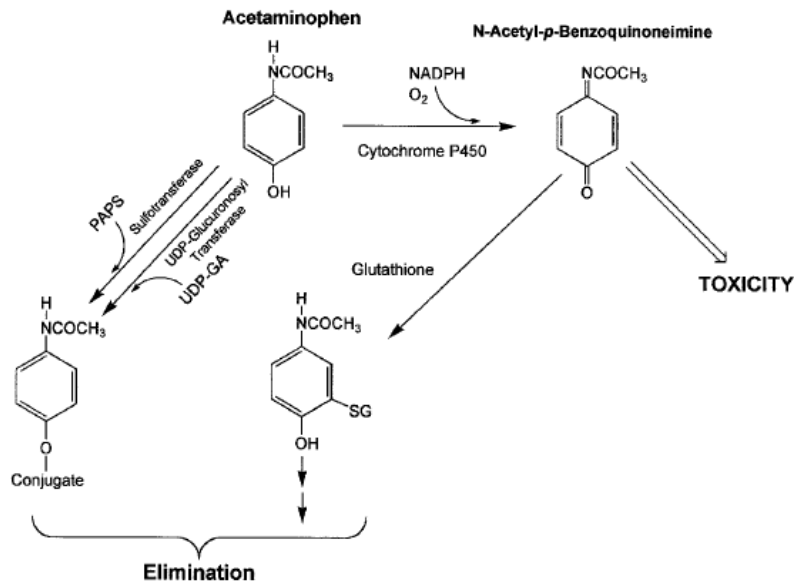


Figura 8 - Esquemática do metabolismo do paracetamol. Adaptado de James et al., 2003.

Em geral, a lesão do fígado surge 12-72 horas após a ingestão, enquanto a falha hepática poderá acontecer 72-96 horas após a mesma. A N-acetilcisteína, precursor na síntese de GSH, é o antídoto utilizado em situações de sobredosagem de paracetamol, podendo prevenir a lesão hepática se administrada até 12 horas após uma toma única do fármaco.⁵⁴

Antoine et al., 2013 estudaram um grupo de 129 indivíduos admitidos no mesmo hospital após historial de ingestão de uma dose excessiva única de paracetamol, os quais ficaram propostos para internamento para tratamento com N-acetilcisteína por via intravascular. O critério de aceitação para o tratamento foi o intervalo entre a ingestão de paracetamol e a apresentação no hospital ser no máximo 15 horas. No momento de apresentação hospitalar foram recolhidas amostras sanguíneas para análise dos biomarcadores plasmáticos (Tabela 3). Além dos marcadores apresentados, foi doseada também a atividade do miRNA-122.

Tabela 3 - Valores dos marcadores plasmáticos no momento de apresentação hospitalar dos indivíduos. Adaptado de Antoine et al., 2013.

Parâmetro	Valor Médio (Valor Mínimo-Valor Máximo)
Bilirrubina (µmol/L)	5,0 (7,0-11,0)
Atividade ALT (IU/L)	22,0 (16,0-57,5)
Atividade ALP (IU/L)	75,0 (60,5-94,5)
Atividade GGT (IU/L)	24,0 (15,0-46,0)

É de salientar que no momento de apresentação hospitalar dos indivíduos, os valores médios dos vários biomarcadores se encontravam dentro dos valores normais descritos para cada.

Dos 129 indivíduos, 98 apresentaram pico de atividade plasmática de ALT $< 3 \times$ ULN (ULN = 50), ou seja, excluídos da consideração de presença de lesão hepática aguda. No entanto, 15 destes indivíduos vieram a desenvolver lesão hepática aguda durante o internamento. Os autores salientaram que, ao contrário da ALT, os valores de miRNA-122 plasmático destes 15 indivíduos no momento da apresentação eram superiores aos dos restantes 83, o que pode indicar potencial valor do miRNA-122 no prognóstico de ALI em sobredosagem de paracetamol.⁵⁵

O estudo evidenciou também a maior sensibilidade do miRNA-122 relativamente à ALT, uma vez que permitiu uma deteção mais precoce e, também, com valor de prognóstico para indivíduos que viriam a desenvolver LHIF.⁵⁵

Este estudo demonstrou a lacuna dos correntes marcadores hepáticos no que se refere à tardia deteção e ao fraco valor de prognóstico de desenvolvimento de ALI perante overdose de paracetamol. Demonstrou, também, que as boas indicações dadas pelo mRNA-122 devem ser levadas em conta e a sua introdução na prática clínica corrente considerada.

Num outro estudo, desta vez envolvendo indivíduos com falha hepática aguda (FHA) devida a overdose de paracetamol, os valores plasmáticos das transaminases foram muito elevados. Assim, o valor médio de ALT foi 5156 UI/L e de AST foi 8126 UI/L, indicando a severidade da lesão apresentada pelos indivíduos, o que condiz com a condição clínica dos mesmos, uma vez que estes já apresentavam coagulopatia e algum grau de encefalopatia no momento do estudo.⁵⁶

Nos EUA o paracetamol é responsável por aproximadamente 50% dos casos de FHA, englobando overdoses não intencionais e overdoses intencionais em tentativas de suicídio.⁶

Antibacterianos

Os antibacterianos apresentam-se, na literatura, como o grupo farmacoterapêutico mais implicado em reações de hepatotoxicidade. Suzuki *et al.*, 2010 criaram uma lista de fármacos baseada em sistemas de notificação de LHIF de três países, nomeadamente, Espanha, Suécia e EUA. Após a observação do número de registos para cada fármaco,

constatou-se que o grupo dos fármacos antibacterianos era o mais representado no topo do número de registos.⁵⁷

Apesar de menos de 10% dos casos de LHIF progredirem para FHA, mais de 80% dos pacientes que desenvolvem esta condição necessitam de transplante hepático. Nos Estados Unidos da América, entre os anos de 1987 e 2006, foi contabilizado o número de transplantes hepáticos devido a FHA causada por fármacos, excluindo o paracetamol. Verificou-se que num total de 215 casos de transplantes, 85 estavam ligados a fármacos antibacterianos, sendo este o grupo responsável por maior número de ocorrências (Figura 9).⁵⁸

Embora esta classe de fármacos seja a mais implicada na quantidade de registos de LHIF, admite-se que este facto se deve à sua vasta prescrição, assim como uma elevada taxa de exposição a estes fármacos por parte da população. Atendendo à ampla utilização dos antibacterianos, considera-se que os eventos de hepatotoxicidade devem ser classificados como pouco frequentes, variando, geralmente, entre 1-10 casos por 100.000 prescrições.⁵⁹

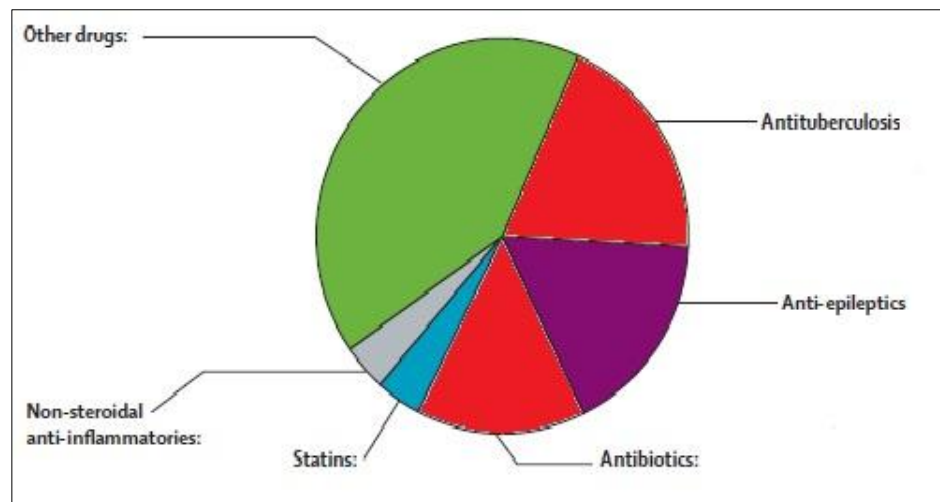


Figura 9 - Classes de fármacos implicadas em transplantes hepáticos nos USA, 1987-2006. Adaptado de Bernal *et al.*, 2010.

Amoxicilina/Ácido Clavulâmico

Amoxicilina/Ácido Clavulâmico consiste numa combinação do antibiótico amoxicilina e do inibidor da β -lactamase, o ácido clavulâmico. É um antibiótico de largo espectro que possui atividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, principalmente utilizado em infeções respiratórias e cutâneas.

O aparecimento de efeitos adversos, nomeadamente a nível hepático, é relativamente raro. Contudo, devido ao facto da amoxicilina/ácido clavulâmico ser um dos antibióticos mais prescritos mundialmente, apresenta-se como o fármaco responsável pelo maior número de registos de LHIF. Tanto no sistema de registo espanhol, como no americano, a amoxicilina/ácido clavulâmico foi o fármaco com mais casos associados, 131 no total.⁵⁷ Um estudo realizado no Reino Unido envolveu 800 pacientes com icterícia devida a diversas causas, e determinou que a incidência de hepatotoxicidade induzida por este antibiótico era 9,91 casos por 100.000 prescrições.⁵⁹

A lesão hepática provocada pela amoxicilina/ácido clavulâmico apresenta, maioritariamente, um padrão colestático. Apesar do mecanismo que conduz à lesão ainda não ser claro, admite-se que o ácido clavulâmico seja o responsável e haja envolvimento do sistema imunitário, com base em achados histológicos. A apresentação clínica pode incluir vários sintomas, tais como, náuseas, vómitos, dor abdominal, febre, prurido e icterícia, sendo este último a manifestação mais frequente. O característico aparecimento tardio dos sintomas dificulta a deteção precoce. Apenas uma minoria dos pacientes desenvolve os sintomas durante a administração do fármaco. Na maioria dos casos, o aparecimento dos sintomas ocorre entre 14 e 18 dias após a suspensão do tratamento. A normalização dos parâmetros bioquímicos hepáticos ocorre dentro de 12 a 16 semanas após descontinuação do fármaco. A incidência de hepatotoxicidade fatal provocada pela amoxicilina/ácido clavulâmico é muito reduzida, sendo na ordem de 1 em vários milhões.^{59,60}

Embora o número de registos de LHIF em sistemas de farmacovigilância seja considerável, os casos reportados na literatura são escassos. Beraldo *et al.*, 2013 reportaram o caso de um indivíduo do sexo masculino, 63 anos, admitido num hospital no Brasil com um quadro clínico no qual se destacou a presença icterícia, prurido generalizado e náusea esporádica sem vómitos. Os sintomas apresentados duravam há cinco dias. O historial clínico do paciente não evidenciou qualquer evento digno de nota. A medicação habitual apenas incluía um fármaco anti-hipertensor em toma única diária. O consumo de álcool era esporádico e tratava-se de um indivíduo não fumador. No historial de prescrições do paciente detetou-se a prescrição de 500mg de amoxicilina/ácido clavulâmico 3 vezes/dia durante 21 dias, iniciada há 45 dias.⁶¹

Os resultados dos testes bioquímicos no momento de admissão hospitalar foram: AST: 78 IU/L, ALT: 200 IU/L, ALP: 60 IU/L, GGT: 33 IU/L, bilirrubina total: 83 mg/L. A suspeita de LHIF foi confirmada pela biópsia hepática que demonstrou hepatite colestática. A resolução

total dos sintomas e a normalização dos testes hepáticos ocorreu, aproximadamente, 4 meses após o aparecimento dos sintomas.⁶¹

Num outro caso, um indivíduo do sexo feminino, 40 anos, apresentou-se numa unidade hospitalar com um histórico de náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, prurido, febre moderada e icterícia. A paciente não possuía qualquer evento de patologia hepática no seu historial clínico. Este apenas incluía alguns eventos de alergia sazonal. De igual modo, declarou ausência de consumo de álcool. O perfil farmacoterapêutico incluía medicação habitual, sobre a qual nunca havia sido relatado qualquer efeito adverso. No historial constava, ainda, a prescrição de amoxicilina/ácido clavulâmico durante 18 dias, iniciada há 6 semanas.⁶²

Os resultados dos testes bioquímicos no momento de admissão hospitalar foram: bilirrubina total: 10.3 mg/dl, ALP: 436 U/L, ALT 142 U/L, AST 116 U/L. Toda a medicação foi descontinuada à exceção de um inalador β -agonista. Sem uma etiologia clara para evento, o quadro clínico do paciente progrediu positivamente e os testes de função hepática normalizaram passadas algumas semanas.⁶²

Dois meses após a saída do hospital, o paciente teve um episódio de sinusite aguda e foi prescrito novamente amoxicilina/ácido clavulâmico. Uns dias após o início do tratamento, o paciente apresentou-se no hospital com um quadro clínico que englobava náuseas, vômitos, dor abdominal e prurido. Não havia sinais de icterícia. Os resultados dos testes hepáticos foram: bilirrubina total: 1.2 mg/dl, ALT: 199 U/L, AST: 99 U/L, ALP: 362 U/L. A suspeita de LHIF provocada por este antibiótico levou à interrupção do tratamento. O paciente recuperou quase completamente em 2 semanas e os testes de função hepática normalizaram passados alguns meses.⁶²

Minociclina

A minociclina é um antibiótico, derivado semissintético das tetraciclinas, amplamente utilizado em tratamentos de acne prolongados. Tem sido implicada em eventos de hepatotoxicidade, normalmente traduzidos por hepatite. A hepatite induzida por minociclina tem sido associada à presença de anticorpos antinucleares, níveis elevados de gama-globulinas e achados morfológicos semelhantes aos característicos da hepatite autoimune. Analogamente à amoxicilina/ácido clavulâmico, o mecanismo exato pelo qual a minociclina

induz lesão do tecido hepático permanece desconhecido. O prognóstico é variável. As evidências sugerem que na maioria dos casos, os pacientes sintomáticos apresentam um desenvolvimento favorável após a suspensão da medicação. Contudo, há relatos de casos mais graves com ocorrência de falha hepática e, conseqüentemente, necessidade de transplante hepático. Há, também, casos descritos em que a hepatotoxicidade foi fatal. No entanto, a ocorrência de casos mais graves é escassa.^{59,60}

Goldstein *et al.*, 2000 reportaram quatro casos diagnosticados com hepatite induzida por minociclina. Em todos, a minociclina foi prescrita para tratamento de acne. O período de exposição ao fármaco previamente à apresentação hospitalar foi distinto em cada caso. Como tal, o paciente 1 esteve exposto ao fármaco durante 1 ano, enquanto o paciente 2 esteve apenas 4 meses. O paciente 3 tomou minociclina, intermitentemente, durante 12 anos. Por sua vez, o paciente 4 realizou o tratamento durante 2 anos, também não continuamente. Os três pacientes apresentavam idades compreendidas entre 16 e 22 anos, e outro tinha 52 anos. Os quatro procuraram cuidados médicos devido a sintomas de fadiga e náuseas. Um dos pacientes apresentou mialgia e outro apresentou artrite de causa inespecífica. Os valores dos parâmetros bioquímicos detetados no momento de apresentação hospitalar encontram-se sumarizados na Tabela 4.⁶³

Tabela 4 - Valores dos parâmetros bioquímicos de 4 pacientes com hepatite provocada por minociclina. Adaptado de Goldstein *et al.*, 2000.

Parâmetros Bioquímicos				
	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dl)
Paciente 1	1,018	700	138	6,5
Paciente 2	433	1,288	253	2,3
Paciente 3	78	137	83	0,4
Paciente 4	286	343	49	1,2

Nos quatro casos, o quadro clínico evoluiu favoravelmente após a descontinuação da minociclina. Os valores dos testes de função hepática atingiram os intervalos considerados normais entre 4 e 10 semanas após a suspensão do fármaco.⁶³

Num outro caso, foi reportada a situação de uma paciente que realizou um tratamento de 6 semanas com minociclina e desenvolveu FHA. Duas semanas após a descontinuação do

fármaco, a condição clínica da paciente deteriorou e os resultados dos testes bioquímicos realizados foram os seguintes: AST: 1055 U/L, ALT: 882 U/L, ALP: 191 U/L, bilirrubina total: 30,4 mg/dl. A função hepática ficou comprometida num nível considerável e a paciente demonstrou um certo grau de encefalopatia, pelo que o transplante hepático foi necessário. Uma biópsia realizada no fígado extraído revelou uma extensa área necrótica com escassa evidência de regeneração.⁶⁴

Nitrofurantoína

A nitrofurantoína é um antibiótico sintético usado, fundamentalmente, na profilaxia e tratamento de infeções do trato urinário. Desde o início da sua ampla utilização neste contexto, têm surgido, na literatura, relatos de efeitos adversos, nomeadamente, a nível hepático. Embora a estimativa da incidência de lesão hepática induzida pela nitrofurantoína seja baixa (aproximadamente 0,0003%), o espectro de reações adversas proporcionadas atribui significância à análise deste fármaco.⁶⁰

A hepatotoxicidade induzida pela nitrofurantoína tem sido associada, geralmente, a uma exposição de largos períodos de tempo, embora tratamentos superiores a 10 dias já venham a ser considerados com alguma cautela. O quadro de lesões hepáticas provocadas por este antibiótico é diverso, variando entre hepatite aguda e hepatite crónica com ou sem cirrose, com padrão sobretudo hepatocelular. À semelhança do caso da minociclina, a lesão hepática induzida pela nitrofurantoína tem sido associada à ocorrência de hígerngamaglobulinemia e à presença de diferentes anticorpos, o que sugere um mecanismo mediado pelo sistema imunitário. Clinicamente, os sintomas frequentes de hepatotoxicidade provocada por este fármaco são: febre, urticária e fadiga.^{60,65}

Geralmente, nos casos ligados à nitrofurantoína, o prognóstico é positivo, observando-se uma notável recuperação após a descontinuação desta. Tal facto é consistente com o relato de uma paciente, 62 anos, diagnosticado com hepatite após tratamento de 3 anos com nitrofurantoína. No momento de admissão hospitalar, os valores das enzimas hepáticas eram: AST: 1173 IU/L, ALT: 504 IU/L, ALP 245 IU/L, bilirrubina total: 6.5 mg/dL. Três semanas após a suspensão do antibiótico os valores de AST, ALT, ALP e bilirrubina total tinham baixado para 46 IU/L, 35 IU/L, 101 IU/L, e 1.6 mg/dL, respetivamente. Passados 2 meses a função hepática encontrava-se normal.⁶⁶

Antituberculosos – Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida

A isoniazida, a rifampicina e a pirazinamida são os fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose. Segundo as *guidelines* da Organização Mundial de Saúde (OMS), o tratamento padrão recomendado inclui um regime de isoniazida, rifampicina e pirazinamida nos dois meses iniciais, seguido por quatro meses com isoniazida e rifampicina. Na eventualidade de ocorrência de resistência a este tratamento inicial, ou em situações de existência de contraindicações específicas relativas aos fármacos mencionados, os regimes podem englobar outras moléculas. Todavia, os fármacos antituberculosos apresentados originam, frequentemente, um leque de reações adversas, sendo a hepatotoxicidade descrita como a mais grave. Além da morbidade e possível mortalidade associadas, principalmente devido a hepatite, a hepatotoxicidade é responsável por interrupção ou não-adesão aos tratamentos, contribuindo, conseqüentemente, para a ineficácia do mesmo.⁶⁷

O estabelecimento do risco de hepatotoxicidade individual de cada fármaco é limitado, visto os regimes de tratamento serem constituídos por combinação das várias moléculas. A isoniazida constitui a exceção, uma vez que tem sido amplamente utilizada em monoterapia na profilaxia de infecção latente. Contudo, segundo a literatura, o número de casos de hepatotoxicidade provocada por antituberculosos é superior nas situações de combinação dos fármacos. A elevação assintomática dos valores das transaminases nas primeiras semanas de tratamento ocorre em 20% dos pacientes, não sendo necessária a suspensão do mesmo para a resolução da situação. Está descrito que as reações hepáticas podem ocorrer em qualquer fase do tratamento, contudo é mais frequente o seu desenrolar nos dois primeiros meses. As lesões provocadas por este grupo de fármacos apresentam um padrão, predominantemente, hepatocelular. Embora o mecanismo conducente à hepatotoxicidade não seja devidamente conhecido, acredita-se que esteja relacionado com metabólitos reativos resultantes do metabolismo hepático, havendo influência genética relativamente às enzimas envolvidas no processo. O quadro clínico associado a hepatotoxicidade induzida por antituberculosos inclui os sintomas característicos de lesões provocadas por outros fármacos: icterícia, náuseas, vômitos, dor abdominal e astenia.^{60,68}

A isoniazida é metabolizada no fígado por duas vias – direta e indireta. Na via indireta, a isoniazida é transformada em acetilisoniazida por intermédio da NAT2. É depois hidrolisada em ácido isonicotínico e em monoacetilhidrazina, a qual é rapidamente acetilada formando diacetilhidrazina. Esta via é favorecida em acetiladores rápidos, ou seja, indivíduos que possuem elevada atividade da NAT. Na via direta ocorre hidrólise da isoniazida, mediada pela enzima isoniazida hidrolase, formando-se ácido isonicotínico e hidrazina. Esta via é quase insignificante em indivíduos acetiladores rápidos, mas em acetiladores lentos apresenta grande importância (Figura 10). Estudos recentes apontam a hidrazina como sendo o metabolito com maior implicação na hepatotoxicidade, evidenciando a predisposição dos acetiladores lentos para desenvolvimento da patologia.^{68,69}

A lesão hepática induzida pela isoniazida tem sido amplamente descrita. Na maioria dos casos em que a lesão hepática é clinicamente confirmada, esta apresenta um padrão hepatocelular agudo com presença de necrose. A manifestação clínica inclui: náuseas, vômitos, dor abdominal, icterícia, anorexia e fadiga. A incidência de hepatite induzida por isoniazida tem sido alvo de grande controvérsia dada a heterogeneidade dos estudos existentes. Variações na definição de hepatite, heterogeneidade das populações estudadas e diferenças ao nível da monitorização dos pacientes tornam difícil o estabelecimento de consenso. Foi realizado um estudo envolvendo 11141 pacientes tratados com isoniazida, os quais eram entrevistados mensalmente com o intuito de averiguar presença de sintomas ou sinais de hepatite. Apenas os pacientes sintomáticos foram submetidos a testes bioquímicos. Tendo em conta a ligeira elevação assintomática dos níveis das transaminases comum nos pacientes tratados com antituberculosos, a disfunção hepática foi definida como $AST > 5 \times ULN$. Somente 11 pacientes evidenciaram hepatotoxicidade, e todos recuperaram totalmente. A taxa de 1 caso de hepatite em 1000 pacientes tratados revelou-se muito inferior à citada em séries de estudos anteriores, propondo a possibilidade de estes terem incluído pacientes com hepatotoxicidade menos severa, que poderia ser considerada clinicamente insignificante.^{60,67}

Segundo a literatura, a mortalidade associada à hepatotoxicidade induzida pela isoniazida é baixa sendo que muito dos casos relatados ocorreram em situações de continuidade de administração do fármaco apesar do aparecimento de sintomas de hepatite.⁶⁷

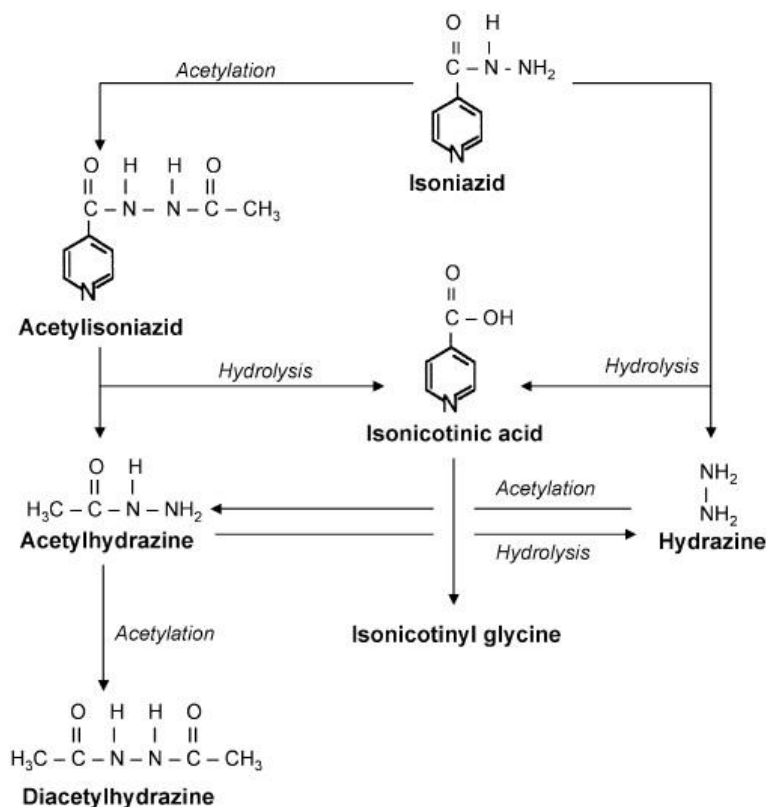


Figura 10 - Metabolismo da Isoniazida. Adaptado de Tostmann *et al.*, 2008.

A rifampicina constitui uma alternativa para monoterapia, na profilaxia de infecção latente, em casos de contra-indicação da isoniazida. Porém, este fármaco é maioritariamente utilizado nos regimes de tratamento em combinação com outros. A exposição à rifampicina está associada a elevação dos valores de bilirrubina total, os quais normalizam num curto período de tempo. Por sua vez, a alteração das transaminases é considerada menor. Em momentos precoces do tratamento pode ocorrer disfunção hepatocelular, a qual é resolvida sem necessidade de descontinuação do fármaco. Os indivíduos afetados são, geralmente, assintomáticos e raramente detetados clinicamente. Em monoterapia, a rifampicina não exerce fortes efeitos hepatotóxicos. No entanto, em combinação com isoniazida ou pirazinamida o potencial tóxico aumenta abruptamente.^{60,67}

A rifampicina é um potente indutor de várias estruturas enzimáticas contribuindo para o aumento do metabolismo de vários fármacos e outros compostos. Este ponto parece ser a justificação para o aumento do potencial de hepatotoxicidade de fármacos de outras classes terapêuticas, ou mesmo do próprio álcool, quando se verifica concomitância com a administração de rifampicina. A elevada toxicidade verificada na associação com isoniazida é

justificada pela indução da isoniazida hidrolase, promovendo a produção de hidrazina, o metabolito tóxico no metabolismo da isoniazida.^{65,68}

Entre os antituberculosos apresentados, a rifampicina é o que apresenta menor probabilidade de induzir hepatotoxicidade, sendo que a maioria dos casos atribuídos surgem em situações de associação com os outros fármacos.

A pirazinamida tem sido considerada o fármaco antituberculoso com maior potencial hepatotóxico. Desde cedo, foi observada a associação a elevada taxa de toxicidade hepática, pelo que o fármaco foi caindo em desuso. Uma vez considerado que este efeito era dependente da dose, o fármaco voltou a ter maior utilização em doses baixas. Contudo, até neste contexto, foram surgindo relatos de lesão hepática, falha hepática e morte. Admite-se que a incidência de hepatite induzida por pirazinamida conducente a suspensão do tratamento varia entre 1,3 - 2,5%.⁶⁷

O mecanismo indutor de toxicidade é desconhecido. Desconhece-se quais são as enzimas envolvidas no processo, assim como a existência de algum metabolito responsável. As lesões provocadas apresentam um padrão maioritariamente hepatocelular com presença de necrose. Em alguns casos foi reportada a ocorrência de hepatite associada a evidências de uma reação de hipersensibilidade, tais como: febre, rash cutâneo e eosinofilia.⁶⁸

O potencial hepatotóxico da pirazinamida aumenta em regimes de associação com a rifampicina. Um exemplo é o relato de um regime de tratamento profilático com pirazinamida e rifampicina durante 2 meses, em substituição do convencional tratamento de isoniazida em monoterapia durante 6 meses. Nos meses posteriores ao início do tratamento, foram detetados 23 casos de hepatotoxicidade significativa, ou seja, presença de lesão hepática com necessidade de hospitalização. Destes, 5 pacientes morreram devido a falha hepática.^{60,68}

Antiepiléticos

Os fármacos antiepiléticos são utilizados no controlo das crises epiléticas e, como tal, são tipicamente empregues em tratamentos prolongados. Quase todos os fármacos pertencentes a esta classe são metabolizados no fígado, pelo que LHIF associada a antiepiléticos é amplamente reconhecida na literatura. A frequência de incidentes hepáticos provocados por estes fármacos é baixa, contudo as consequências podem ser bastante sérias, conduzindo a FHA. Nos EUA, os fármacos antiepiléticos ocupam a terceira posição

relativamente às classes responsáveis por transplantes hepáticos devido a FHA induzida por fármacos.^{70,71}

Ácido Valpróico

O ácido valpróico é um fármaco antiepilético amplamente utilizado, com indicação para certas formas de epilepsia, como crises parciais complexas, ausências ou crises de tipo misto. O seu mecanismo de ação envolve o aumento do GABA (ácido gama-aminobutírico), potenciando a transmissão inibitória mediada por este. O ácido valpróico também tem sido usado no tratamento das psicoses maníaco-depressivas.

Apesar de o ácido valpróico *per se* poder desencadear toxicidade, o maior grau de toxicidade associado a este fármaco é devido ao seu metabolito 4-ene-ácido valpróico, originado pelo metabolismo mediado pelo CYP2E1. O mecanismo de toxicidade está associado a alterações estruturais da mitocôndria, devidas à inibição do processo de β -oxidação. Esta ação resulta no aparecimento de esteatose microvesicular, ou seja, acumulação de lípidos. Outra hipótese englobando a participação deste metabolito num mecanismo de stress oxidativo tem sido estudada. No entanto, ainda não existe consenso relativamente a esta questão. Patologias de origem genética que afetem a oxidação dos ácidos gordos ou a cadeia transportadora de eletrões na mitocôndria poderão contribuir para a toxicidade por ácido valpróico.^{57,58}

A ocorrência de reações clinicamente significativas é rara e observa-se, preferencialmente, nos primeiros 3 meses do tratamento, sendo a incidência estimada em 1/15000, aproximadamente. Porém, o potencial hepatotóxico em crianças com idade inferior a 2 anos é muito superior, razão pela qual o ácido valpróico está contraindicado nesta faixa etária. A característica histopatológica mais comum é a esteatose, acompanha por necrose nos casos mais severos. O aparecimento de sinais de hipersensibilidade é invulgar nos casos de hepatotoxicidade induzida pelo ácido valpróico. Clinicamente, os sintomas apresentados incluem: náuseas, vômitos, fadiga, icterícia e exacerbação das convulsões.⁷²

No tratamento com ácido valpróico ocorre uma elevação transitória das transaminases em 10-15% dos pacientes e da bilirrubina total em 44%. Esta elevação costuma ser assintomática e é entendida como valores inferiores a $3 \times \text{ULN}$. Esta elevação não implica a

descontinuação do fármaco, mas deve ser feito um acompanhamento para detetar elevações significativas e evitar o desenrolar de FHA.⁷⁰

Fenitoína

A fenitoína é amplamente utilizada nas crises parciais e nas crises tónico-clónicas e é quase exclusivamente metabolizada no fígado pelo complexo CYP450. Tal como o ácido valpróico, o risco de hepatotoxicidade associada à fenitoína tem sido descrito na literatura. A ocorrência de lesão hepática severa é rara, mas nos casos confirmados clinicamente 10-38% desenvolvem um resultado fatal.⁷³

Geralmente, a lesão hepática apresenta um padrão colestático ou misto e, em 70% dos casos, ocorre associada a indícios de hipersensibilidade, o que pronuncia origem num mecanismo idiossincrático, ao contrário do ácido valpróico. Além dos sintomas comuns – fadiga, náuseas, vômitos – a hepatotoxicidade induzida por fenitoína apresenta sintomas de hipersensibilidade tais como: febre, rash cutâneo e ocorrência de eosinofilia. Biópsias hepáticas a indivíduos diagnosticados clinicamente evidenciaram hepatomegalia e sinais de inflamação. A maioria dos indivíduos que desenvolve lesão hepática, apresenta sintomas nos primeiros 6 meses do tratamento.⁷⁰

Nos indivíduos expostos à fenitoína ocorre uma elevação assintomática dos valores de GGT em 50-90% dos casos. A elevação da ALP também é frequente, embora numa extensão menor do que a GGT. Em alguns destes casos acaba por haver um retrocesso para valores normais ao longo do tratamento.⁷²

A maioria dos relatos refere casos de hepatotoxicidade aguda que evoluem positivamente após a descontinuação do fármaco. Todavia, casos de lesão hepática crónica e fatalidade devido a FHA também estão descritos. A mortalidade devido a hepatotoxicidade induzida por fenitoína foi estimada em 13%, aproximadamente.^{70,72}

Carbamazepina

A carbamazepina é utilizada no tratamento das crises parciais e crises tônico-clônicas secundariamente generalizadas. Tem, ainda, utilização como estabilizador do humor nas psicoses maníaco-depressivas. É, primordialmente, metabolizada hepaticamente através do complexo CYP450. O produto metabólico mais importante é um epóxido (10,11-carbamazepina epóxido), o qual se tem mostrado farmacologicamente ativo e tem sido implicado no desenvolvimento de hepatotoxicidade.⁷³

A hepatotoxicidade induzida por carbamazepina pode manifestar-se de duas formas: reação de hipersensibilidade que apresenta um bom prognóstico, geralmente, e lesão hepática de origem metabólica que pode levar a dano irreversível e é associada a pior prognóstico. Aproximadamente 30% dos indivíduos diagnosticados com LHIF provocada por este fármaco apresentam indícios de hipersensibilidade, nomeadamente eosinofilia. No entanto, foi assinalado que, normalmente, nos casos mais severos os sinais de hipersensibilidade estão ausentes. A lesão hepática pode apresentar tanto padrão colestático como padrão hepatocelular, estando este último associado a pior prognóstico dada a sua recorrente associação com necrose hepática.⁷²

Aproximadamente 60% dos indivíduos expostos ao fármaco apresentam elevação dos valores de GGT e 10-15% elevação de ALP, as quais não implicam suspensão do mesmo. Contudo a observação de uma elevações anormais deve ser considerada suspeita de patologia. O aparecimento de anormalidades nos testes de função hepática, assim como de sintomas de hepatotoxicidade, ocorrem tipicamente nos dois primeiros meses de tratamento. Na maioria dos casos o prognóstico é favorável após descontinuação do fármaco. Atendendo aos casos reportados na literatura, a mortalidade global devido a lesão hepática induzida pela carbamazepina foi estimada em aproximadamente 17%.^{70,72}

Anti-inflamatórios não esteroides

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) constituem um dos grupos de fármacos mais prescritos e com maior consumo mundialmente. Mesmo sendo a ocorrência de hepatotoxicidade induzida por AINEs relativamente baixa, a sua ampla utilização coloca este grupo no lote dos mais frequentemente associados a eventos hepáticos. Apesar da evidente

importância destes fármacos como causa de hepatotoxicidade, representando cerca de 10% do total de casos de LHIF, é difícil estimar com precisão a verdadeira incidência de toxicidade induzida por AINEs. Contudo, a incidência de disfunção hepática reportada na maioria dos estudos é relativamente uniforme, variando entre 1-9 casos por 100000 indivíduos expostos.⁷⁴

Entre os AINEs atualmente aprovados, o diclofenac e a nimesulida apresentam maior implicação nos casos de LHIF reportados em vários sistemas de farmacovigilância, sendo que a nimesulida nunca teve aprovação em alguns países.⁷⁵

Diclofenac

O diclofenac é um AINE derivado do ácido acético amplamente utilizado, o qual pode provocar rara, mas potencialmente séria, hepatotoxicidade. Como resultado da vasta utilização, este fármaco tem sido um dos mais associados à ocorrência de reações adversas hepáticas. No entanto, os casos de toxicidade hepática clinicamente significativa são raros.⁷⁵

O diclofenac constitui mais um exemplo de hepatotoxicidade de origem idiossincrática, com aparente relacionamento com o metabolismo do fármaco. Os metabólitos reativos resultantes do metabolismo apresentam grande propensão para a formação de aductos, provocando lesão mitoncondrial e reação imunológica.⁷⁶

A lesão apresenta um padrão hepatocelular, preferencialmente, com ocorrência de necrose verificada em biópsias. Contudo, há relatos de casos de hipersensibilidade caracterizada por febre, rash cutâneo e eosinofilia, acompanhados por evidências clínicas semelhantes a hepatite autoimune.⁷⁶

Num estudo prospetivo com 17289 pacientes em tratamento não inferior a 18 meses com 150mg/dia de diclofenac, verificou-se uma elevação das transaminases (ALT ou AST) superior a $3 \times \text{ULN}$ em 3,1% e superior a $10 \times \text{ULN}$ em 0,5%. Esta variação de valores ocorreu, essencialmente, nos 6 meses iniciais do tratamento. Quatro pacientes necessitaram de hospitalização, contudo não houve qualquer caso de falha hepática ou morte.⁷⁷

Outros estudos, embora com características heterogéneas, apresentaram resultados relativamente concordantes. Atendendo aos resultados obtidos, à rara ocorrência de relatos de hepatotoxicidade severa e ao número de prescrições, o diclofenac é considerado como tendo um bom perfil de segurança hepática.

Nimesulida

A nimesulida é um AINE pertencente à classe dos sulfanilamídicos, que exerce efeitos inibitórios preferenciais sobre a ciclo-oxigenase-2. Encontra-se disponível em mais de 50 países, incluindo Portugal, embora em alguns países, como EUA, Canadá e Inglaterra, nunca tenha sido aprovada a sua utilização. Noutros países, tal como Finlândia e Espanha, a quantidade de notificações espontâneas de efeitos adversos, nomeadamente hepáticos, levou a que a nimesulida fosse retirada do mercado.⁷⁵

Uma estimativa do risco de hepatotoxicidade induzida pela nimesulida, baseada num sistema de notificação espontânea associado à OMS, determinou que este fármaco possui o risco mais elevado de provocar lesões hepáticas, comparativamente aos outros AINEs.⁷⁸

Um dos trabalhos mais completos até à data, envolveu a análise de 43 casos diagnosticados com lesão hepática induzida por nimesulida relatados na literatura. Verificou-se que a lesão hepatocelular com presença de necrose era o padrão predominante, presente em 64% dos casos, seguido por hepatite colestática em 27%. Quanto ao tempo necessário ao desenvolvimento de sintomas de toxicidade após o início de exposição ao fármaco, este foi de 15-90 dias em 66% dos pacientes. Na análise dos 43 casos observou-se a ocorrência de FHA em 6 relatos e morte prévia a transplante em 2. Relativamente às evidências laboratoriais, foi destacada a existência de grande variação nos valores de ALT.⁷⁴

Rodrigo et al., 2002 descreveram um caso de FHA com necessidade de transplante. Uma paciente com 63 anos, com historial de prurido, náuseas, vômitos e icterícia progressiva há 3 semanas, tinha iniciado tratamento com nimesulida (200 mg diários repartidos em duas administrações) 7 meses antes da apresentação hospitalar. Não foram verificados outros fatores de risco, nomeadamente administração de outros fármacos e consumo de álcool, pelo que a nimesulida foi considerada a causa do cenário de FHA. No momento de apresentação hospitalar, os resultados laboratoriais foram os seguintes: bilirrubina total: 33.9 mg/dl; AST: 240 IU/L; ALT: 143 IU/L; GGT: 565 IU/L; ALP: 1099 IU/L. Os testes imunológicos apresentaram resultado positivo para anticorpos anti-mitocondriais. Uma análise histológica revelou necrose extensa e colestase severa, principalmente ao nível dos hepatócitos. A função hepática reduziu progressivamente e, vinte e três dias após a hospitalização, foi submetida a transplante hepático.⁷⁹

O mecanismo da lesão hepática provocada pela nimesulida continua incerto. Todavia, tem sido sugerida a intervenção de metabólitos reativos, por um processo de toxicidade direta ou toxicidade indireta induzida por reação imunológica, favorecida por predisposição genética.

Apesar dos relatos de hepatotoxicidade severa induzida por nimesulida, a maioria dos estudos epidemiológicos concluiu que esta possui uma baixa incidência, revelando uma relação risco-benefício positiva.⁷⁴

5. Conclusões

A ocorrência de LHIF severa é relativamente rara, contudo o desenvolvimento de FH está associado a elevada necessidade de transplante hepático. A verdadeira incidência de LHIF tem sido difícil de determinar devido à heterogeneidade dos estudos existentes e à falta de consenso quanto aos critérios de definição da patologia. Uma combinação de fatores genéticos e ambientais contribuem para o aumento de suscetibilidade de desenvolvimento de hepatotoxicidade.

Na maioria dos casos, a descontinuação do fármaco desencadeante levou a recuperação total dos pacientes. Como tal, o diagnóstico precoce e o acompanhamento destes são essenciais para impedir a evolução para FH.

Os biomarcadores mais recentes, tais como o miRNA-122, o HMGB1, a K18 e a arginase I, demonstraram resultados promissores como indicadores de lesão hepática. Além de correlação significativa com a atividade da ALT, todos demonstraram sensibilidade e especificidade superiores a esta. O HMGB1 e a K18 mostraram ser bons indicadores de lesão severa dos hepatócitos, enquanto o miRNA se assumiu como potencial marcador de lesão aguda, verificando-se elevação desta molécula 1 hora após a administração de paracetamol em ratos.

Em diversos artigos, é defendida a possível utilização destes novos biomarcadores, num momento inicial, como complemento aos tradicionalmente utilizados. Porém, em diversos casos, foi defendida a necessidade de existência de mais estudos de avaliação crítica previamente à aplicabilidade clínica.

De igual modo, o valor económico dos ensaios e a acessibilidade aos reagentes foi descrito como um fator limitante para o desenvolvimento de mais estudos e para a afirmação das novas moléculas.

6. Bibliografia

1. Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Davern T, Serrano J, et al. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology*. 2008;135(6):1924–34.
2. Verma S, Kaplowitz N. Diagnosis, management and prevention of drug-induced liver injury. *Gut*. 2009;58(11):1555–64.
3. Aithal GP, Guha N, Fallowfield J, Castera L, Jackson AP. Biomarkers in liver disease: emerging methods and potential applications [editorial]. *International Journal of Hepatology*. 2012.
4. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008;245(3):194–205.
5. Antoine DJ, Mercer AE, Williams DP, Park BK. Mechanism-based bioanalysis and biomarkers for hepatic chemical stress. *Xenobiotica*. 2009;39(8):565–77.
6. Björnsson E. Review article: drug-induced liver injury in clinical practice. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2010;32(1):3–13.
7. Abboud G, Kaplowitz N. Drug-induced liver injury. *Drug Safety*. 2007;30(4):277–94.
8. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. *Anatomia e Fisiologia Tradução*. 6ª ed. (Leal M, Durão MAL, ed). Loures: Lusociência; 2003.
9. Van der Plaats A. *The Groningen Hypothermic Liver Perfusion System for Improved Preservation in Organ Transplantation [PhD Thesis]*. Groningen: University of Groningen; 2005.
10. Atkinson JÁ, Abernethy DR, Daniels CE, Dedrick RL, Markey SP. *Principles of Clinical Pharmacology*. 2nd ed. Londres: Elsevier; 2007.
11. Schonborn JL, Gwinnutt C. The role of the liver in drug metabolism [tutorial]. *Anaesthesia* 2010.
12. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clinical Chemistry*. 2000;46(12):2027–49.
13. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. *Laboratory Guidelines for Screening, Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury*. Washington: National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice; 2001.
14. Lee WM, Stravitz RT, Larson AM. Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Position Paper on acute liver failure 2011. *Hepatology*. 2012;55(3):965–67.

15. Suk KT, Kim DJ. Drug-induced liver injury: present and future. *Clinical and Molecular Hepatology*. 2012;18(3):249–57.
16. Fontana RJ, Seeff LB, Andrade RJ, Björnsson E, Day CP, Serrano J, et al. Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: summary of a clinical research workshop. *Hepatology*. 2010;52(2):730–42.
17. Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ, Larrey D, Molokhia M, Takikawa H, et al. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2011;89(6):806–15.
18. Al-Busafi SA, Hilzenrat N. Mild Hypertransaminasemia in Primary Care. *ISRN Hepatology*. 2013.
19. Whitehead MW, Hawkes ND, Hainsworth I, Kingham JG. A prospective study of the causes of notably raised aspartate aminotransferase of liver origin. *Gut*. 1999;45(1):129–33.
20. Minuk GY. Canadian Association of Gastroenterology Practice Guidelines: evaluation of abnormal liver enzyme tests. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 1998;12(6):417–21.
21. Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM, Bodenheimer HC. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*. 2008;47(4):1363–70.
22. Pacifico L, Ferraro F, Bonci E, Anania C, Romaggioli S, Chiesa C. Upper limit of normal for alanine aminotransferase: quo vadis? *Clinica Chimica Acta*. 2013;422:29–39.
23. Xu H-M, Chen Y, Xu J, Zhou Q. Drug-induced liver injury in hospitalized patients with notably elevated alanine aminotransferase. *World Journal of Gastroenterology*. 2012;18(41):5972–78.
24. Loomba R. Serum γ -glutamyltranspeptidase predicts all-cause, cardiovascular and liver mortality in older adults. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2013;3(1):4–11.
25. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clinical Chemistry*. 2000;46(12):2027–49.
26. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal*. 2005;172(3):367–79.
27. Danielsson J, Kangastupa P, Laatikainen T, Aalto M, Niemelä O. Individual and Joint Impacts of Ethanol Use, BMI, Age and Gender on Serum Gamma-Glutamyltransferase Levels in Healthy Volunteers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(6):11929–41.
28. Limdi JK, Hyde GM. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgraduate Medical Journal*. 2003;79(932):307–12.

29. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5th ed. Missouri: Elsevier Saunders; 2012.
30. Houlihan DD, Armstrong MJ, Newsome PN. Investigation of jaundice. *Medicine*. 2011;39(9):518–22.
31. Gilmore I, Garvey CJ. Jaundice. *Medicine*. 2013;41(2):99–103.
32. Elfimova N, Schlattjan M, Sowa JP, Dienes HP, Canbay A, Odenthal M. Circulating microRNAs: promising candidates serving as novel biomarkers of acute hepatitis. *Frontiers in Physiology*. 2012;3(12):476–79.
33. Lewis PJS, Dear J, Platt V, Simpson KJ, Craig DGN, Antoine DJ, et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2011;54(5):1767–76.
34. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4402–7.
35. Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clinical Chemistry*. 2010;56(12):1830–38.
36. Hayes PC, Bouchier IA, Beckett GJ. Glutathione S-transferase in humans in health and disease. *Gut*. 1991;32(7):813–18.
37. Giffen PS, Pick CR, Price MA, York MJ, Williams A. Alpha-Glutathione S -Transferase in the Assessment of Hepatotoxicity - Its Diagnostic Utility in Comparison with Other Recognized Markers in the Wistar Han Rat. *Toxicologic Pathology*. 2002;30(3):365–72.
38. Tong V, Teng XW, Chang TKH, Abbott FS. Valproic acid I: time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicological Sciences*. 2005;86(2):427–35.
39. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418(6894):191–95.
40. Schutte B, Henfling M, Kölgen W, Bouman N, Meex S, Leers MPG, et al. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Experimental Cell Research*. 2004;297(1):11–26.
41. Antoine DJ, Jenkins RE, Dear JW, Williams DP, McGill MR, Sharpe MR, et al. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of Hepatology*. 2012;56(5):1070–79.

42. Singhal R, Harrill AH, Menguy-Vacheron F, Jayyosi Z, Benzerdjeb H, Watkins PB. Benign elevations in serum aminotransferases and biomarkers of hepatotoxicity in healthy volunteers treated with cholestyramine. *BMC Pharmacology & Toxicology*. 2014;15(1):42.
43. Schmidt ES, Schmidt FW. Glutamate dehydrogenase: biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme. *Clinica Chimica Acta*. 1988;173(1):43–55.
44. O'Brien PJ, Slaughter MR, Polley SR, Kramer K. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Laboratory Animals*. 2002;36(3):313–21.
45. O'Brien PJ, Slaughter MR, Swain A, Birmingham JM, Greenhill RW, Elcock F, et al. Repeated acetaminophen dosing in rats: adaptation of hepatic antioxidant system. *Human & Experimental Toxicology*. 2000;19(5):277–83.
46. Neve S. Tissue distribution, intracellular localization and proteolytic processing of rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Cell Biology International*. 2003;27(8):611–24.
47. Foster GR, Goldin RD, Oliveira DB. Serum F protein: a new sensitive and specific test of hepatocellular damage. *Clinica Chimica Acta*. 1989;184(1):85–92.
48. Callaghan N, Majeed T, O'Connell A, Oliveira DB. A comparative study of serum F protein and other liver function tests as an index of hepatocellular damage in epileptic patients. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1994;89(4):237–41.
49. Ashamiss F, Wierzbicki Z, Chrzanowska A, Scibior D, Pacholczyk M, Kosieradzki M, et al. Clinical significance of arginase after liver transplantation. *Annals of Transplantation*. 2004;9(3):58–60.
50. Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, Tsunekawa S, Nagata A. Advantage of serum type-I arginase and ornithine carbamoyltransferase in the evaluation of acute and chronic liver damage induced by thioacetamide in rats. *Clinica Chimica Acta*. 2007;375(1-2):63–8.
51. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*. 2013;21(3):201–32.
52. McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, Taha M, Curry SC, Jaeschke H. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(4):1574–83.
53. Stirnimann G, Kessebohm K, Lauterburg B. Liver injury caused by drugs: an update. *The European Journal of Medical Sciences*. 2010;140.
54. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*. 2005;42(6):1364–72.

55. Antoine DJ, Dear JW, Lewis PS, Plaat V, Coyle J, Masson M, et al. Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology*. 2013;58(2):777–87.
56. Khandelwal N. Unrecognized Acetaminophen Toxicity as a Cause of “Indeterminate” Acute Liver Failure. *Hepatology*. 2012;53(2):567–76.
57. Suzuki A, Andrade RJ, Bjornsson E, Lucena MI, Lee WM, Yuen NA, et al. Drugs associated with hepatotoxicity and their reporting frequency of liver adverse events in VigiBase. *Drug Safety*. 2010;33(6):503–22.
58. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet*. 2010;376(9736):190–201.
59. Robles M, Andrade RJ. Hepatotoxicidad por antibióticos : actualización en 2008. *Revista Espanola de Quimioterapia*. 2008;21(4):224–33.
60. Thiim M, Friedman LS. Hepatotoxicity of antibiotics and antifungals. *Clinics in Liver Disease*. 2003;7(2):381–99.
61. Beraldo DO, Melo JF, Bonfim AV, Teixeira AA, Teixeira RA, Duarte AL. Acute cholestatic hepatitis caused by amoxicillin/clavulanate. *World Journal of Gastroenterology*. 2013;19(46):8789–92.
62. Nathani MG, Mutchnick MG, Tynes DJ, Ehrinpreis MN. An unusual case of amoxicillin/clavulanic acid-related hepatotoxicity. *The American Journal of Gastroenterology*. 1998;93(8):1363–65.
63. Goldstein NS, Bayati N, Silverman AL, Gordon SC. Minocycline as a cause of drug-induced autoimmune hepatitis. Report of four cases and comparison with autoimmune hepatitis. *American Journal of Clinical Pathology*. 2000;114(4):591–98.
64. Losanoff JE, Holder-Murray JM, Ahmed EB, Cochrane AB, Testa G, Millis JM. Minocycline toxicity requiring liver transplant. *Digestive Diseases and Sciences*. 2007;52(11):3242–44.
65. Leitner JM, Graninger W, Thalhammer F. Hepatotoxicity of antibacterials: Pathomechanisms and clinical. *Infection*. 2010;38(1):3–11.
66. Sherigar JM, Fazio R, Zuang M, Arsura E. Autoimmune hepatitis induced by nitrofurantoin. The importance of the autoantibodies for an early diagnosis of immune disease. *Clinics and Practice*. 2012;2(4):206-11.
67. Forget EJ, Menzies D. Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs. *Drug Safety*. 2006;5(2):231–49.
68. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, de Lange WCM, van der Ven AJAM, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2008;23(2):192–202.

69. Yew WW, Leung CC. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology*. 2006;11:699–707.
70. Au JS, Pockros PJ. Drug-induced liver injury from antiepileptic drugs. *Clinics in Liver Disease*. 2013;17(4):687–97.
71. Mindikoglu AL, Magder LS, Regev A. Outcome of Liver Transplantation for Drug-Induced Acute Liver Failure in the United States : Analysis of the United Network for Organ Sharing Database. *Liver Transplantation*. 2009;15:719–29.
72. Björnsson E. Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2008;118(5):281–90.
73. Ahmed SN, Siddiqi ZA. Antiepileptic drugs and liver disease. *Seizure*. 2006;15(3):156–64.
74. Bessone F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(45):5651.
75. Unzueta A, Vargas HE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease*. 2013;17(4):643–56.
76. Aithal GP, Day CP. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease*. 2007;11(3):563–75.
77. Laine L, Goldkind L, Curtis SP, Connors LG, Yanqiong Z, Cannon CP. How common is diclofenac-associated liver injury? Analysis of 17,289 arthritis patients in a long-term prospective clinical trial. *The American Journal of Gastroenterology*. 2009;104(2):356–62.
78. Merlani G, Fox M, Oehen HP, Cathomas G, Renner EL, Fattinger K, et al. Fatal hepatotoxicity secondary to nimesulide. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2001;57(4):321–26.
79. Rodrigo L, de Francisco R, Pérez-Pariente JM, Cadahia V, Tojo R, Rodriguez M, et al. Nimesulide-induced severe hemolytic anemia and acute liver failure leading to liver transplantation. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2002;37(11):1341–43.