



universidad  
de león



**Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Papel de la microbiota intestinal en el  
desarrollo de daño hepático asociado a  
fármacos (DILI)**

**Role of gut microbiota in drug-induced liver  
injury (DILI)**

**Inés Bonis Calvo**

**Tutores: M<sup>a</sup> Victoria García Mediavilla y Sonia**

**Sánchez Campos**

**Grado en biotecnología**

**Julio, 2022**

## ÍNDICE

### RESUMEN

### ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Daño hepático inducido por fármacos (DILI).....	1
1.1.1 Definición de DILI.....	1
1.1.2 Tipos de DILI.....	1
1.1.2.1 Patrones bioquímicos y hallazgos histológicos.....	2
1.1.2.2 Tipos de respuesta al fármaco.....	2
1.1.3 Patogénesis de DILI.....	2
1.2 MICROBIOTA INTESTINAL.....	4
1.2.1 Definición y origen de la microbiota intestinal. Disbiosis.....	4
1.2.2 Modulación de la microbiota intestinal.....	5
1.2.3 Papel que desempeña su alteración en enfermedades hepáticas.....	8
1.3 MODELO ANIMAL.....	9
1.3.1 Descripción de modelo animal y principales características.....	9
1.3.2 Modelos animales utilizados en DILI en estudios preclínicos.....	10
1.3.2.1 Requisitos para ser un modelo animal ideal de DILI.....	10
1.3.2.2 Rata.....	11
1.3.2.3 Ratón.....	11
1.3.2.4 Otros modelos animales de DILI.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
3. MÉTODO.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1 DILI producido por antibióticos y su relación con la alteración de la microbiota intestinal.....	13
4.2 DILI producido por compuestos derivados de plantas y su relación con la alteración de la microbiota intestinal.....	14
4.2.1 Triptolide.....	14
4.2.2 Genipósido.....	16
4.3 DILI producido por fármacos no antibióticos y su relación con la alteración de la microbiota intestinal.....	19
4.3.1 Tacrina.....	19
4.3.2 Paracetamol.....	20
4.3.3 Metamizol y propiltiouracilo.....	22
5. CONCLUSIONES.....	24
6. REFERENCIAS.....	25

## RESUMEN

El daño hepático inducido por fármacos (DILI) es una reacción adversa producida por plantas medicinales, xenobióticos y medicamentos que conlleva una alteración hepática con alteración de marcadores serológicos específicos. Actualmente, a causa del envejecimiento de la población, el consumo de suplementos herbales y la polimedición existe una creciente incidencia de DILI. El limitado conocimiento sobre los mecanismos implicados en el desarrollo de DILI ha llevado a plantear nuevas investigaciones acerca de los procesos fisiopatogénicos involucrados. A este respecto, se está estudiando el papel que desempeña la microbiota intestinal en el desarrollo de DILI, ya que es fundamental en la metabolización de fármacos y en la homeostasis del hígado a través del eje intestino-hígado. Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se centra en realizar una revisión bibliográfica exhaustiva sobre el papel que presenta la microbiota intestinal en el desarrollo de los distintos tipos de DILI. Se ha encontrado que la alteración de la microbiota intestinal está implicada en el daño hepático inducido por fármacos antibióticos, no antibióticos y por compuestos derivados de plantas.

**Palabras clave:** antibióticos, compuestos derivados de plantas, DILI, fármacos antitiroideos, microbiota intestinal, paracetamol, tacrina.

## ABSTRACT

Drug-induced liver injury (DILI) is an adverse reaction produced by medicinal plants, xenobiotics and medications that leads to liver disease and abnormal liver serology. Currently, due to aging of the population, the consumption of herbal supplements and polypharmacy, there is a growing incidence of DILI. However, the limited knowledge about the mechanisms involved in the development of DILI leads to new research on the pathophysiogenic processes. The role of the gut microbiota is being studied, since it is fundamental in the metabolism of drugs and in liver homeostasis through the intestine-liver axis. This Final Degree Project (TFG) is focused on carrying out an exhaustive bibliographic review on the role of the gut microbiota in the development of the different types of DILI. Alteration of gut microbiota has been found to be implicated in liver damage induced by antibiotics, non-antibiotic drugs and by plant-derived compounds.

**Keywords:** acetaminophen, antibiotics, antithyroid drugs, DILI, gut microbiota, plant-derived compounds, tacrine.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ALP: Fosfatasa alcalina

ALT: Alanina aminotransferasa

APAP: paracetamol

APAP-ADs: paracetamol nocivo

AST: Aspartato aminotransferasa

BSEP: Bomba de exportación de sales biliares

COX2: Ciclooxygenasa-2

CYP: Citocromo P450

CYP1A2: Citocromo P450 1A2

CYP3A4: Citocromo P450 3A4

DILI: Daño hepático inducido por fármacos

DISC: Complejo de señalización que induce la muerte

EASL: Asociación Europea para el Estudio del Hígado

FasL: FASligando

FMO: Flavoproteína oxidasa de función mixta

FMO3: Monooxygenasa dependiente de flavina

FXR: Receptor X farnesoide

GF: Libres de gérmenes

GSH: Glutación

G6PC: Glucosa-6-fosfato

HFD: Dieta alta en grasas

HLA: Antígeno leucocitario humano

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

LDH: Lactato deshidrogenasa

LPS: Lipopolisacárido

LSN: Límite superior normal

MAMP: Patrones moleculares asociados a microbios

MMI: Metamizol

MPT: Transición de permeabilidad mitocondrial

NAPQI: N-acetil-p-benzoquinoneimina

NK: *Natural killer*

OCA: Ácido obeticólico

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

SPF: Sin patógenos específicos

SREBP1c: Factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides 1

PTU: Propiltiouracilo

TBL: bilirrubina total

TLR: Receptor tipo *Toll*

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

ULN: Límite superior de la normalidad

$\gamma$ -GT:  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Daño hepático inducido por fármacos (DILI)

#### 1.1.1 Definición de DILI

El daño hepático inducido por fármacos (DILI) es una lesión producida por medicamentos, plantas medicinales y xenobióticos que conduce a una disfunción hepática o una serología hepática anormal (Huang *et al.*, 2020). El daño en los hepatocitos puede estar causado por la activación de metabolitos intermedios químicamente activos que generan estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplásmico, los cuales pueden conducir a la muerte celular. Los mecanismos antioxidantes como el glutatión y las actividades superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa se ven comprometidos durante DILI, generando un desequilibrio entre sistemas oxidantes y antioxidantes (Villanueva-Paz *et al.*, 2021).

Los síntomas de DILI son bastante inespecíficos. Incluyen fatiga, náuseas, dolor abdominal e ictericia, signos que son frecuentes en afecciones hepáticas de distintas etiologías. Un grupo consenso internacional y la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL, de sus siglas en inglés) han propuesto algunos criterios umbral para la definición de un caso de DILI. Entre ellos, se encuentran la elevación de la actividad alanina aminotransferasa sérica (ALT)  $\geq 5$  veces el límite superior normal (LSN), la actividad fosfatasa alcalina sérica (ALP)  $\geq 2 \times$  LSN o la combinación de ALT  $\geq 3 \times$  LSN con elevación simultánea de la bilirrubina total (TBL, de sus siglas en inglés) superior a  $2 \times$  LSN (Villanueva-Paz *et al.*, 2021). La relación R es una expresión cuantitativa del patrón de la lesión y se define como la relación existente entre los valores séricos de ALT y ALP, expresados como múltiplos de ULN (límite superior de la normalidad) al inicio de la lesión (Teschke y Uetrecht, 2021).

Estudios retrospectivos realizados en pacientes del Hospital Universitario de Sahlgrenska (Suecia) y la base de datos de investigación de práctica general con sede en el Reino Unido, señalan que la incidencia anual de DILI se estableció en 2,3 y 2,4 casos por 100.000 habitantes. Sin embargo, estudios prospectivos realizados en Francia e Islandia, determinaron que la incidencia fue de 13,9 y 19,1 casos por 100.000 habitantes. Debido al envejecimiento de la población, el consumo de suplementos herbales y dietéticos y la polimedicación se espera que aumenten los casos de DILI en un futuro (Villanueva-Paz *et al.*, 2021).

#### 1.1.2 Tipos de DILI

Distintos factores pueden producir daño hepático por lo que la patología y los síntomas varían entre individuos. DILI se puede clasificar atendiendo a distintos criterios: en función de sus patrones bioquímicos y sus hallazgos histológicos y en función de la respuesta que se produce al fármaco.

#### 1.1.2.1 Patrones bioquímicos y hallazgos histológicos

- Hepatocelular: La lesión hepatocelular se caracteriza por necrosis de las células hepáticas, una inflamación concomitante y una elevación de las transaminasas séricas relacionada con el daño de los hepatocitos provocado por la toxina (Villanueva-Paz *et al.*, 2021).

- Colestásico: El daño colestásico se manifiesta por el incremento de las actividades de ALP y  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa ( $\gamma$ -GT) y la concentración de bilirrubina conjugada en suero, lo que se relaciona con una alteración del flujo de bilis y su depósito en el hígado (Villanueva-Paz *et al.*, 2021). Además, se puede producir lesión o proliferación de los conductos biliares, manteniéndose las actividades ALT y AST (aspartato aminotransferasa) mínimamente elevadas (Quintás *et al.*, 2021). La combinación de la actividad antibiótica amoxicilina/clavulánico es el principal causante del DILI colestásico (Huang *et al.*, 2020).

- Hepatocelular y colestásico (mixto): Se caracteriza por tener una relación R de 2,5. Generalmente predomina la lesión mixta sobre las dos anteriores (Teschke y Uetrecht, 2021).

#### 1.1.2.2 Tipos de respuesta al fármaco

- Dependiente de la dosis o intrínseco: El DILI intrínseco se desarrolla de forma dosis dependiente del fármaco, no presenta predisposición genética y predecir su aparición es relativamente sencillo. Está producido por la acción citotóxica del fármaco o su metabolito. Normalmente, aparece en un periodo corto de tiempo (Teschke y Uetrecht, 2021).

- Idiosincrásico: El DILI idiosincrásico está causado por la constitución del individuo, es independiente de la dosis y no se puede predecir (Yokoi y Oda, 2021). Tiene un periodo de latencia variable (Teschke y Uetrecht, 2021). Está relacionado con reacciones coordinadas con la inmunidad y la inflamación durante la exacerbación del daño hepático. Asimismo, se ha sugerido que los metabolitos reactivos están involucrados en la aparición de DILI idiosincrático (Yokoi y Oda, 2021).

#### 1.1.3 Patogénesis de DILI

DILI implica la lesión directa por fármacos y la activación posterior de vías inflamatorias. Depende de un entorno ambiental específico y de la genética del individuo. Generalmente son el resultado del metabolito del fármaco de fase I y la familia de proteínas

del citocromo polimórfico P450 (CYP). Aunque, también pueden surgir del metabolismo de fase II (Boelsterli, 2002). El daño producido por el fármaco se propaga a través de fenómenos de estrés celular, inhibición mitocondrial o reacciones inmunes concretas (Russmann *et al.*, 2009).

Las respuestas inmunes específicas se desencadenan con la unión del fármaco al antígeno leucocitario humano (HLA), que se presentan a las células T y se reconocen como antígenos. Los neoantígenos se disponen posteriormente en las células presentadoras de antígenos para activar la formación de anticuerpos (Robin *et al.*, 1997). Se cree que la producción de metabolitos reactivos y auto-anticuerpos no es suficiente para desencadenar la respuesta inmune y se requiere de una segunda señal conocida como “señal de peligro” (Utrecht, 1999). Esta señal activa vías de señalización para el estrés oxidativo o el daño celular resultando en daño hepático inmunomediado. La señal puede ser de distintos tipos como un fármaco separado, un virus, una infección bacteriana o la liberación de citoquinas en una reacción inflamatoria (Matzinger, 1998; Park *et al.*, 2000).

Los tres fenómenos anteriores conducen a la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), provocando un aumento de la permeabilidad y la entrada de protones a través de la membrana interna, alterando, de este modo, la síntesis de ATP. Esto produce, la expansión de la membrana mitocondrial externa liberando citocromo C y otras proteínas pro-apoptóticas al citoplasma (Malhi y Gores, 2008). El estrés celular inicia la vía directa en la que se activan las proteínas proapoptóticas y se inhiben las proteínas antiapoptóticas para luego activar la MPT. Por otra parte, las reacciones inmunitarias activan la vía extrínseca, donde la presentación del antígeno hace que las células de Kupffer liberen el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) y ligando FAS (FasL).  $TNF\alpha$  y FasL se unen posteriormente a receptores intracelulares de muerte y proteínas de dominio de muerte para activar la caspasa 8 conllevando a la formación del complejo de señalización que induce la muerte (DISC). A su vez, la caspasa 8 activa bcl-2, que junto con DISC conducen a MPT (Kaplowitz, 2002). Finalmente, el último paso implica apoptosis o necrosis. La apoptosis es dependiente de ATP, de modo que solo se puede llevar a cabo si el MPT no ocurre rápidamente. En presencia de ATP, el citocromo C se une a una proteína de andamiaje citoplasmática y a la pro-caspasa 9, formando un apoptosoma. Este activa las caspasas produciendo la condensación y fragmentación citoplasmática y nuclear. Por último, los residuos producidos se eliminan por fagocitosis (Malhi y Gores, 2008). De otra manera, la necrosis surge porque la función mitocondrial se ve fuertemente comprometida por MPT y el agotamiento del ATP. El resultado es una interrupción de los

procesos celulares que implica la formación de vesículas, oxidación de actina, hinchazón celular y la ruptura de la membrana celular (Figura 1) (Kaplowitz, 2002). Histológicamente, la lesión hepática inducida por fármacos se observa como una combinación de daño apoptótico y necrótico que conduce a la idea de que ambos procesos se producen en conjunto.

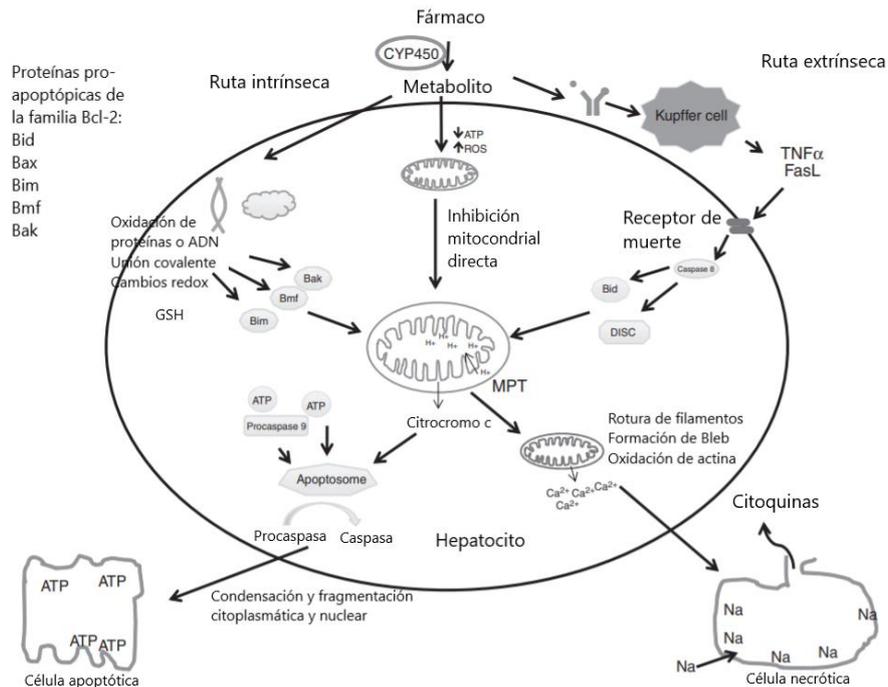


Figura 1. Mecanismos bioquímicos de DILI. Los metabolitos tóxicos se generan a través del CYP450 y provocan daño mitocondrial a través de la vía intrínseca, extrínseca o de la inhibición mitocondrial directa. MPT produce la interrupción de la membrana mitocondrial. En presencia de ATP, se genera un apoptosoma y las células se degradan por fragmentación y apoptosis. En ausencia de ATP, se incrementa la permeabilidad de la membrana mitocondrial, aumentando el calcio y el sodio citoplasmático, produciendo la lisis celular, la necrosis y la liberación de citoquinas (Modificada de Au *et al.*, 2011).

## 1.2 Microbiota intestinal

### 1.2.1 Definición y origen de microbiota intestinal. Disbiosis

La microbiota intestinal está formada por un número de 10 a 100 billones de microorganismos que residen en el intestino. La microbiota, junto con su genoma, el microbioma, proporciona a los humanos las características genéticas y de desarrollo que no poseen por sí mismos. La microbiota humana está compuesta por arqueas, virus (bacteriófagos), hongos y otros organismos eucariotas (Cammarota *et al.*, 2014). A su vez, se diferencian los microorganismos autóctonos o indígenas y los alóctonos o transitorios (Milani *et al.*, 2017). Su composición puede verse afectada por diversos factores ambientales como el pH, los niveles de oxígeno, el estado redox, la disponibilidad de agua y de nutrientes y la temperatura (Ursell *et al.*, 2012).

Tras el nacimiento, el intestino es estéril, pero se coloniza rápidamente y su composición depende de la microbiota materna y del tipo de alimentación (Cammarota *et al.*, 2014). La microbiota tiene un papel muy importante en la salud humana, regulando procesos homeostáticos, controlando vías metabólicas, metabolizando nutrientes, produciendo vitaminas, en el desarrollo y maduración de las mucosas, regulando la motilidad gastrointestinal y en el mantenimiento de la integridad de la barrera del epitelio intestinal (Spor *et al.*, 2011). Estudios metagenómicos han puesto de manifiesto que las características de la microbiota está relacionada con la aparición de enfermedades intestinales en bebés o en edades posteriores, además de otro tipo de patologías como asma o trastornos metabólicos (Milani *et al.*, 2017).

Se distinguen tres enterotipos: el enterotipo 1 formado principalmente por *Bacteroides*; el enterotipo 2 por *Prevotella*; y el enterotipo 3 por *Ruminococcus*. La presencia de un enterotipo u otro va a depender del tipo de dieta a largo plazo. Dietas ricas en grasas y proteínas potencian el desarrollo de los enterotipos 1 y 3, mientras que dietas ricas en carbohidratos favorecen el crecimiento del enterotipo 2 (Arumugam *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Modulación de la microbiota intestinal

La modulación de la microbiota es un concepto ancestral e innato para los humanos (Leach, 2013). Actualmente, se conoce que los antibióticos actúan sobre los microorganismos intestinales destruyendo tanto las bacterias patógenas como las protectoras (Jernberg *et al.*, 2010). A su vez, los antibióticos absorbibles atacan a la microbiota gracias a su amplia difusión sistémica. La alteración de la microbiota por el uso de antibióticos puede desencadenar resistencias a los mismos (Cammarota *et al.*, 2014).

Por otra parte, los probióticos son microorganismos vivos que en cantidades adecuadas producen efectos beneficiosos para la salud del huésped (Hotel y Cordoba, 2001). Los probióticos se utilizan en enfermedades relacionadas con la microbiota intestinal para restablecer la homeostasis. Entre los probióticos destacan bacterias como *Lactobacillus* y Bifidobacterias (Dinleyici *et al.*, 2012). Sus mecanismos de acción son muy variados, destacando la inhibición de la adhesión microbiana, el establecimiento del entorno lumínico restrictivo, la producción de péptidos con propiedades antibacterianas y la inducción de la respuesta del sistema inmune (Ng *et al.*, 2009). El empleo de probióticos enfocado al tratamiento de una enfermedad concreta es complejo debido a la gran heterogeneidad en términos de administración, cepa, dosis y duración del tratamiento (Bron *et al.*, 2011). No obstante, se ha probado el potencial terapéutico de los probióticos sobre sus efectos

metabólicos. Los probióticos a nivel del microbioma producen cambios en la composición microbiana dirigidos hacia un perfil beneficioso basado en una reducción en la proporción de *Firmicutes* y *Bacteroides* e incrementando la proporción del género *Bifidobacterium* (Porrás *et al.*, 2018). A su vez, los tratamientos que implican probióticos reducen los niveles de las aminotransferasas séricas y los efectos de la reducción del contenido lipídico sérico o hepático (Aller *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2013; Nabavi *et al.*, 2014; Famouri *et al.*, 2017).

Los prebióticos fueron definidos por primera vez en 1995 por Gibson y Roberfroid como "alimento no digerible que afecta beneficiosamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento o la actividad de un número limitado de especies bacterianas ya presentes en el colon, mejorando así la salud del huésped" (Gibson y Roberfroid, 1995). Aunque esta acepción ha sido modificada por Roberfroid en 2007: "Un prebiótico es un ingrediente fermentado que permite cambios específicos, tanto en la composición o actividad en el tracto gastrointestinal que confieren beneficios sobre el bienestar del huésped y salud" (Langlands, 2004; Roberfroid, 2007). Para que un alimento pueda ser considerado como prebiótico debe cumplir con varios criterios: ser resistente a hidrólisis por vía digestiva y a la secreción del ácido gástrico, absorción en el tracto gastrointestinal superior y fermentación por la microbiota intestinal (Slavin, 2013). Los prebióticos pueden emplearse para estimular el crecimiento de diferentes grupos bacterianos a través de interacciones cruzadas. Una de las claves principales para promover los beneficios en la salud es su capacidad para producir ácidos grasos de cadena corta que regulan funciones dentro y fuera del intestino (Blaak *et al.*, 2020). De las sustancias que presentan potencial como prebióticos, los más reconocidos son los fructanos de tipo inulina (inulina, oligofructosa y fructooligosacáridos) y los galactanos (galactooligosacáridos) (Wilson y Whelan, 2017). Si bien, se están investigando otros compuestos potenciales como la lactulosa, la celulosa, los almidones resistentes, las hemicelulosas, las gomas y las pectinas (Porrás *et al.*, 2018).

Los polifenoles son compuestos vegetales caracterizados por poseer en su estructura química, al menos, dos anillos de fenilo y uno o más sustituyentes hidroxilo (Han *et al.*, 2007). Componen un grupo formado por compuestos muy heterogéneos que se pueden dividir en flavonoides o no-flavonoides en función de su complejidad (Singla *et al.*, 2019). Se investigan por su papel frente a distintas patologías, ya que son capaces de contrarrestar los efectos de las enfermedades metabólicas. A su vez, no se digieren totalmente en el tracto gastrointestinal, sufriendo transformaciones cuando llegan al intestino grueso. Esto hace que se consideren sustancias prebióticas. La presencia del grupo fenol en su estructura les confiere

actividad antimicrobiana y son capaces de impedir la formación de biopelículas, lo cual puede influir en la composición de la microbiota intestinal (Porrás *et al.*, 2018). Se han probado diversos polifenoles, entre los que se encuentran la quercetina o los flavonoides del té verde, entre otros (Pisonero-Vaquero *et al.*, 2015). Destaca la relación existente entre los polifenoles y *Akkermansia*. *Akkermansia* es capaz de mantener la integridad de la barrera intestinal y de preservar la capa de moco evitando la alteración del eje intestino-hígado (Gil-Cardoso *et al.*, 2016). En un estudio reciente llevado a cabo en ratas a las que se les administró quercetina y *A. muciniphila* se demostró dicha relación, ya que se observó una disminución significativa de la esteatosis hepática. Además, redujo los niveles de triglicéridos hepáticos y el número y tamaño de las gotas lipídicas en el hígado. En cuanto a la población microbiana, la acción simbiótica condujo a un número bacteriano mayor y una disminución del índice de Shannon. Entre las poblaciones bacterianas aumentó el filo *Cyanobacteria*, y los géneros *Blautia* y *Coprobacillus* y se redujo la población de *Actinobacteria* y la clase *Bacilli* entre otros (Juárez-Fernández *et al.*, 2021).

La infusión fecal o bacterioterapia fecal hace referencia a la introducción de un filtrado líquido de heces de un donante sano en el tracto gastrointestinal de un paciente para el tratamiento de enfermedades específicas (Zhang *et al.*, 2012). Se llevó a cabo por primera vez como terapia en 1958 para tratar la colitis pseudomembranosa producida por *Clostridium difficile* (Eiseman *et al.*, 1958). Al considerar la microbiota intestinal como un órgano, esta práctica se entiende como un trasplante de órganos, que se ha realizado en diversas enfermedades intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal y el síndrome metabólico (O'Hara y Shanahan, 2006). Generalmente, el trasplante de la microbiota fecal se ha llevado a cabo a partir de un donante sano. Sin embargo, existen ventajas a la hora de utilizar las heces propias entre las que se encuentran el menor riesgo de infecciones y mayor efectividad porque el injerto es óptimo (Hanssen *et al.*, 2021). Además, se ha valorado la posibilidad de realizar el trasplante de la microbiota fecal después de las mejoras obtenidas en dicha microbiota con el tratamiento con prebióticos (Porrás *et al.*, 2018). No obstante, existen varios desafíos a la hora de aplicar esta técnica como la selección de donantes, el procesamiento de las muestras de heces, la realización de una única infusión o varias infusiones o el empleo de antibióticos (Delaune *et al.*, 2018).

Por último, el ejercicio físico es fundamental en la reducción de los síntomas cardiovasculares, mejorar el estado metabólico y contrarrestar los efectos producidos por la obesidad (Porrás *et al.*, 2018). La actividad física mejora el estado metabólico porque

contribuye a reducir la expresión de enzimas lipogénicas, mejorar la absorción de ácidos grasos por parte del músculo, modular las adipoquinas o atenuar el estrés oxidativo en el hígado (Ordóñez *et al.*, 2015). Un estudio reciente ha identificado los géneros bacterianos que responden fundamentalmente a la actividad física los cuales son *Firmicutes* y *Actinobacteria* (Dalton *et al.*, 2019). Los estudios que establecen la relación entre el ejercicio físico y la microbiota están relegados prácticamente a los modelos animales, pero en 2018 se llevó a cabo un ensayo clínico examinando los efectos del ejercicio físico en el intestino humano. Este estudio demostró que la modulación en la composición y función de la microbiota basada en el entrenamiento produjo una disminución de *Bacteroides* y un incremento de *Faecalibacterium* y *Lachnospira* seguido de un aumento de los ácidos grasos de cadena corta fecales (Allen *et al.*, 2018). De modo que el ejercicio afecta a la funcionalidad de la microbiota intestinal alterando la concentración de ácidos grasos de cadena corta y de aminoácidos ramificados (Quiroga *et al.*, 2020). En 2019 se realizó un ensayo preclínico en ratas en el que se mostró que las ratas sometidas a ejercicio físico tras la alimentación con una dieta alta en grasas (HFD, por sus siglas en inglés) presentaban una reducción en el número de gotas lipídicas hepáticas, una mejora del daño hepático determinado por los niveles de ALT, AST y lactato deshidrogenasa (LDH) y un aumento del nivel de albúmina plasmática. Estos resultados demuestran el efecto protector que posee el ejercicio físico sobre el estado metabólico (Carbajo-Pescador *et al.*, 2019).

### 1.2.3 Papel que desempeña su alteración en enfermedades hepáticas

La microbiota intestinal mantiene la homeostasis inmunitaria del hígado a través del eje intestino-hígado como se muestra en la Figura 2. El hígado contiene gran cantidad de células inmunitarias entre las que se encuentran los linfocitos *natural killer* (NK), las células de Kupffer y las células T. La microbiota intestinal es capaz de producir antígenos, patógenos y endotoxinas que activan las células T y las células de Kupffer presentes en el hígado desencadenando la respuesta inmune innata y adaptativa. A su vez, los productos derivados de las bacterias y las toxinas pueden acceder al hígado y alterar la homeostasis en caso de que el sistema inmune esté previamente desestabilizado o si la barrera natural del intestino está alterada. Gran cantidad de productos tóxicos derivados del intestino ingresan en el hígado, son reconocidos por los TLR (receptor tipo *Toll*) y provocan una respuesta inflamatoria, la muerte directa de las células hepáticas o daño hepático crónico. La interacción entre la microbiota intestinal y el hígado involucra múltiples procesos celulares, incluyendo el metabolismo, la inmunidad y las señales neuroendocrinas. En consecuencia, el eje intestino-hígado tiene un

papel muy importante en distintas enfermedades hepáticas como la enfermedad hepática alcohólica, la hepatitis crónica, el cáncer de hígado y el daño hepático producido por fármacos (Chen y Chen, 2021).

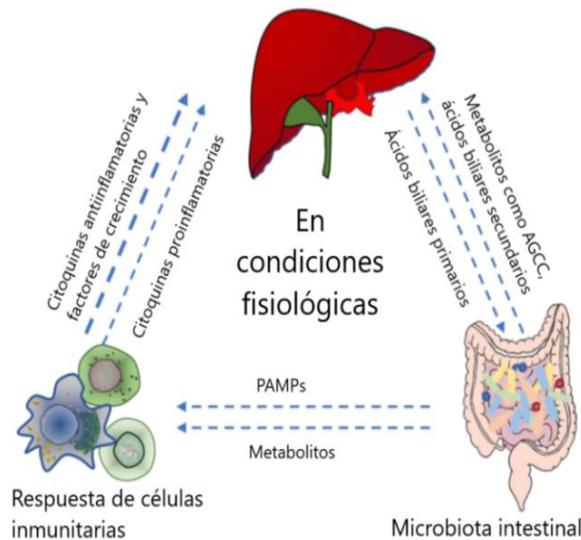


Figura 2. Papel de la microbiota en el eje inmunitario intestino-hígado. Al utilizar los sustratos metabólicos, la microbiota origina varios metabolitos activos que alcanzan la vena porta hasta llegar al hígado. En segundo lugar, la microbiota puede regular la respuesta inmune hepática a través de metabolitos y PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) (Modificada de Chen y Chen, 2021).

### 1.3 Modelo animal

#### 1.3.1 Descripción de modelo animal y principales características

Un modelo animal es una especie no humana que se usa en el ámbito científico de la investigación porque puede manifestar aspectos de una enfermedad humana. Los modelos animales posibilitan el estudio y la obtención de información de una enfermedad y de su diagnóstico, su prevención o posibles tratamientos. Además, permiten la realización de experimentos que éticamente no se pueden realizar en los seres humanos (*National Institutes of Health, 2022*).

Russel y Burch introdujeron por primera vez los aspectos éticos en las técnicas de laboratorio incluyendo el Principio de las 3R. Cada R representa un principio para el uso ético de los animales de experimentación. Estos principios son Reducción, Reemplazo y Refinamiento. La Reducción hace referencia a la aplicación de métodos que permitan utilizar el menor número de animales en un protocolo. El Reemplazo busca alternativas al uso de animales. Y el Refinamiento tiene como objeto la aplicación de métodos que eviten o reduzcan el sufrimiento animal (Andersen y Winter, 2019).

Los modelos animales se pueden dividir en dos grandes clases: los basados en analogía y los basados en la homología. Los basados en la analogía se asientan sobre estructuras

similares con funciones similares, mientras que los basados en la homología lo hacen sobre estructuras que derivan del mismo precursor evolutivo y, en consecuencia, poseen funciones iguales o similares (Davidson *et al.*, 1987).

A su vez, se diferencian tres categorías de modelos animales (Davidson *et al.*, 1987; Zwierzyna y Overington, 2017):

1. Modelos inducidos o experimentales: Reproducen las condiciones que se observan en la especie original a través de una inducción artificial.

2. Modelos naturales o espontáneos: Se asemejan a alguna condición de la especie original por una variación genética natural.

3. Modelos animales transgénicos: Se introduce la mutación del gen relacionada con la enfermedad mediante técnicas de ingeniería genética.

La selección del modelo animal para la investigación se basa en los siguientes criterios:

- Idoneidad como análogo.
- Transferibilidad de la información.
- Uniformidad genética de los organismos.
- Conocimiento previo de sus propiedades biológicas.
- Coste y disponibilidad.
- Generalización de los resultados.
- Facilidad y adaptabilidad de la manipulación genética.
- Consecuencias ecológicas e implicaciones éticas.

La elección de un animal como modelo no solo depende de estos aspectos, también influye la práctica habitual dentro de una disciplina, la existencia de eventos que puedan complicar el procedimiento o el conocimiento de la patología que se quiere estudiar y de las características especiales del animal, que pueden hacer que una especie sea singularmente útil (Davidson *et al.*, 1987; Hernández, 2006).

### 1.3.2 Modelos animales utilizados en DILI en estudios preclínicos

#### 1.3.2.1 Requisitos para ser un modelo animal ideal de DILI

La obtención de un modelo animal de DILI es un factor crítico en los estudios preclínicos de esta enfermedad, ya que la modulación del sistema inmunitario en el desarrollo de DILI no se puede llevar a cabo sobre el cultivo de células y tejidos *in vitro* (Pan *et al.*, 2019).

Se puede inducir DILI en modelos animales mediante el empleo de diversos medicamentos administrados a través de distintas vías obteniendo resultados variables en los

animales. A día de hoy, existen modelos animales basados en roedores y no roedores. No existe ninguna indicación de que los modelos de no roedores sean superiores debido a la similitud fisiológica entre su cuerpo y el cuerpo humano (Pan *et al.*, 2019).

Los principales requisitos para ser un modelo animal ideal de DILI son (Jaeschke *et al.*, 2013):

- Semejanza clínica con DILI humano: Dosis, curso temporal y patología similares.
- Mecanismo similar con DILI humano: Similitud en el desarrollo fisiopatológico.
- Conveniencia experimental: Los animales desarrollan el daño en días o semanas.

A pesar de que los modelos animales pueden reproducir la patología hepática humana en, al menos, un 70%, la investigación basada en animales no permite obtener una predicción completa de los resultados en los humanos (Pan *et al.*, 2019).

#### 1.3.2.2 Rata

La rata es el animal modelo más empleado en los estudios preclínicos de DILI debido a su facilidad de uso (Jaeschke *et al.*, 2013). Se han empleado distintas cepas de ratas en los estudios preclínicos entre las que destacan las ratas Wistar, Sprague-Dawley y Listerhooded (Yip *et al.*, 2018; Behr *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2021). Además, se han empleado como modelo animal de DILI inducido por antibióticos, por CCl<sub>4</sub>, por tacrina o por tetraciclina (Jaeschke *et al.*, 2013; Yip *et al.*, 2018; Behr *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2019).

#### 1.3.2.3 Ratón

Los ratones son la segunda especie más utilizada en el estudio preclínico de DILI gracias a su facilidad de uso y a su relevancia clínica. Además, a veces se prefiere el uso del ratón al de la rata debido a la disponibilidad de genes *knock-out* en ratones y de subcepas transgénicas (Jaeschke *et al.*, 2013). Por ejemplo, los ratones son el animal de elección a la hora de estudiar el DILI inducido por paracetamol debido a la similitud que presenta con los seres humanos el desarrollo de esta patología. El principal inconveniente es la diferencia del curso temporal de la lesión hepática entre ratones y humanos, la cual se desarrolla un poco más rápido en ratones (McGill *et al.*, 2012). Los ratones se han empleado en el estudio de DILI inducido por paracetamol, tioacetamida o antiinflamatorios no esteroideos (Jaeschke *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2019).

#### 1.3.2.4 Otros modelos animales de DILI

Además de ratas y ratones se han utilizado otros roedores y mamíferos como modelo de DILI como cobayas, gatos y hámsteres. A pesar de haber obtenido resultados óptimos en estos

estudios, las limitaciones en el pequeño número de muestras y la falta de similitud en ciertos aspectos fisiológicos con los seres humanos ha hecho que queden desplazados por el empleo de ratas y ratones fundamentalmente (Eder, 1964; Boxill *et al.*, 1958; Potter *et al.*, 1974).

## 2. OBJETIVOS

La alta incidencia de DILI en la población, el incremento esperable en los próximos años y el escaso conocimiento sobre los mecanismos implicados en la aparición de DILI ha llevado a que las investigaciones se centren en tratar de averiguar los procesos fisiopatogénicos involucrados en el desarrollo de toxicidad hepática frente a fármacos. Actualmente, se está explorando el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de DILI, debido a que desempeña un papel muy importante en la metabolización de los fármacos y en la homeostasis del hígado a través del eje intestino-hígado, por lo que se propone la implicación de la microbiota intestinal directa o indirectamente en el desarrollo de DILI. Además, es sabido que el eje intestino-hígado tiene una labor fundamental en la aparición de enfermedades a nivel hepático, lo que ha llevado a que en los últimos años se hayan probado estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la microbiota intestinal enfocadas a la mejora del daño hepático.

Por todo ello, el objetivo principal de esta revisión bibliográfica consiste en recopilar y analizar los resultados existentes acerca del papel que tiene la microbiota intestinal en el desarrollo de los distintos tipos de DILI.

Con el fin de profundizar en el tema y lograr un buen desarrollo del objetivo general se pretenden alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- Analizar y describir el efecto hepatotóxico que ejercen los antibióticos y su relación con la alteración de la microbiota intestinal.
- Establecer el papel de los compuestos derivados de plantas en el desarrollo de DILI y la implicación de la microbiota intestinal en dicho desarrollo.
- Analizar y describir la relación existente entre la microbiota intestinal y los fármacos no antibióticos en la producción de DILI.

## 3. MÉTODO

Para la redacción de este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica sobre el papel que desempeña la microbiota en el desarrollo de DILI inducido por fármacos antibióticos, no antibióticos y compuestos derivados de plantas con utilidad terapéutica.

Las fuentes de información utilizadas se han obtenido de la búsqueda de artículos científicos a través de las siguientes páginas web: *Pubmed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), *Google académico* (<https://scholar.google.es>), *ScienceDirect* (<https://www.sciencedirect.com>) y *ResearchGate* (<https://www.researchgate.net>).

Los artículos utilizados han sido revisiones bibliográficas, ensayos clínicos y ensayos pre-clínicos. En algunas ocasiones se han filtrado los artículos por antigüedad no superior a 5 años y la disponibilidad del texto en inglés. De esta forma se ha intentado que la información compilada sea lo más reciente posible.

Las palabras clave empleadas en la búsqueda de artículos científicos fueron las siguientes: “modulation of gut microbiota”, “drug-induced liver injury”, “hepatotoxicity”, “DILI pathogenesis”, “animal model”, “animal models in DILI”, “antibiotic-induced DILI”, “gut microbiota and DILI”.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DILI producido por antibióticos y su relación con la alteración de la microbiota intestinal

Para comprobar el efecto de distintos antibióticos sobre el daño hepático y la microbiota intestinal, se realizó un ensayo preclínico en ratas tratándolas con una combinación de antibióticos formada por ampicilina, neomicina y metronidazol con una concentración de 1 g/L en agua potable durante el período experimental. Tras su administración, se redujo la proporción de *Bacteroides* y *Firmicutes*, y se incrementó la concentración de *Proteobacteria* (Hu *et al.*, 2015). En un estudio similar realizado en 2019, el tratamiento con 1 g/L en agua de bebida durante dos semanas con dichos antibióticos alteró el número de bacterias Gram-, como *Enterobacterias*, *Bacteroides* y *Firmicutes*, lo que es consistente con los resultados obtenidos en el ensayo anterior (Yildirim *et al.*, 2019). En cuanto a las actividades séricas de ALT y AST, en el primer estudio aumentó el marcador ALT, lo cual es un indicativo de que los antibióticos indujeron hepatotoxicidad. Sin embargo, el valor de AST no sufrió grandes alteraciones tras la administración (Hu *et al.*, 2015).

Respecto a las alteraciones histológicas observadas en ambos estudios, el tratamiento con antibióticos produjo esteatosis hepática, necrosis celular, vacuolización y aumento de depósito de lípidos en el citoplasma de las células hepáticas (Huet *et al.*, 2015; Yildirim *et al.*, 2019). A

su vez, los antibióticos produjeron un incremento de los marcadores de inflamación como TNF- $\alpha$ , óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX2) (Hu *et al.*, 2015).

Por otra parte, el grupo de Zhang *et al.* llevó a cabo un ensayo preclínico en ratones tratados con penicilina. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con la combinación de antibióticos descrita previamente. Se produjo una alteración de las comunidades microbianas que alberga la microbiota intestinal, predominando los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, entre otros. En cuanto a la histología del tejido hepático, los cordones hepáticos se encontraban desordenados, se produjo infiltración de granulocitos neutrófilos en los hepatocitos, aumento de la acumulación lipídica y pérdida de los límites celulares, lo que indicó la existencia de daño hepático (Zhang *et al.*, 2022).

Estos resultados (Tabla 1) indican la coexistencia de lesión hepática acompañada de alteraciones significativas de la composición de la microbiota intestinal como consecuencia del tratamiento con antibióticos.

Tabla 1. Principales efectos hepatotóxicos producidos por los antibióticos y su relación con la alteración de la microbiota intestinal. Fuente propia.

FÁRMACO	TIPO DE ENSAYO	RESULTADOS	FUENTE
<b>Combinación de antibióticos (ampicilina, neomicina y metronidazol)</b>	Ensayos preclínicos en ratas Sprague-Dawley administradas con 1g/L en el agua de bebida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción: <i>Bacteroides</i>, <i>Firmicutes</i> y <i>Proteobacterias</i></li> <li>• Incremento: <i>Proteobacterias</i> y ALT</li> <li>• Alteraciones histológicas</li> </ul>	(Hu <i>et al.</i> , 2015; Yildirim <i>et al.</i> , 2019)
<b>Penicilina</b>	Ensayo preclínico en ratones inoculados con penicilina en el agua de bebida durante 8 semanas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteración de <i>Bacteroides</i>, <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i></li> <li>• Alteraciones histológicas</li> </ul>	(Zhang <i>et al.</i> , 2022)

ALT: Alanina aminotransferasa

Estos estudios demuestran que la alteración de la microbiota intestinal está implicada en el desarrollo de DILI debido a que participa en la metabolización de los antibióticos. Principalmente, se han observado cambios en las poblaciones bacterianas y alteraciones en el tejido hepático responsables del deterioro del mismo.

## 4.2 DILI producido por compuestos derivados de plantas y su relación con la alteración de la microbiota intestinal

### 4.2.1 Triptolide

El triptolide es el principal componente bioactivo de *Tripterygium wilfordii* Hook F que posee propiedades antiinflamatorias y autoinmunes, pero, a su vez, puede generar hepatotoxicidad. Se ha demostrado en un ensayo preclínico la relación entre la administración del triptolide y la modificación de la microbiota intestinal (Wu *et al.*, 2020). Los mecanismos

hepatotóxicos del triptolide, provocando daño en la membrana celular, disrupción mitocondrial, disfunción del metabolismo, estrés del retículo endoplásmico y oxidativo, autofagia y apoptosis han sido descritos previamente (Xi *et al.*, 2017). Un estudio preclínico (Tabla 2) llevado a cabo en ratones demostró que la microbiota intestinal protege el hígado del triptolide, ya que es fundamental en el metabolismo del fármaco. Para ello, los ratones se trataron con antibióticos (ampicilina, neomicina, metronidazol y vancomicina) disueltos en agua durante 7 días y triptolide, y tras el tratamiento se trasplantaron con microbiota intestinal. El triptolide se administró vía intraperitoneal durante 14 días y el trasplante microbiano intestinal se realizó de manera diaria a lo largo de 3 días y empezó un día después del tratamiento con antibióticos. La mortalidad de los animales tratados con triptolide tras la administración de antibióticos fue de un 25% de los casos, a diferencia de los que solamente se trataron con triptolide que sobrevivieron en su totalidad. No obstante, la recuperación de la microbiota intestinal revirtió este efecto (Huang *et al.*, 2020). El efecto hepatotóxico del triptolide junto antibióticos se ha corroborado en estudios posteriores (Tabla 2), en los que se observó un aumento de las actividades séricas de ALT y AST (Liu *et al.*, 2022). Además de llevar asociado disbiosis intestinal, al analizar la microbiota intestinal de los animales se observó que el triptolide redujo la presencia de *Firmicutes* de manera significativa (Huang *et al.*, 2020).

Se observó que la alteración de la microbiota intestinal fue capaz de incrementar la circulación de los ácidos biliares y de los metabolitos relacionados con la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en ratones tratados. En el hígado, los metabolitos se encontraron incrementados, salvo por la disminución de carnitinas, ácidos grasos de cadena larga y ácidos biliares. La alteración de ácidos grasos y carnitina pudo estar producida por la disfunción en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Huang *et al.*, 2020).

Un ensayo clínico realizado en pacientes con daño hepático inducido por triptolide y trasplantados con bacterias fecales advirtió las mismas alteraciones en la microbiota intestinal que había observado el grupo de Huang *et al.*, en ratas y, a su vez, determinó que el triptolide era capaz de reducir la diversidad microbiana del intestino y la abundancia relativa de *Lactobacillus rhamnosus*, lo cual se indica en la Tabla 2 (Hu *et al.*, 2021).

En el ensayo de Huang *et al.*, se probó el efecto del propionato sobre las características metabólicas del huésped. Se describió que los ácidos grasos de cadena corta, como el propionato, mitigaron la hepatopatía congestiva. Sin embargo, el triptolide redujo la concentración de ácidos grasos de cadena corta, produciendo una deficiencia de estos en el

intestino. A su vez, se ha encontrado que el propionato es capaz de reducir la hepatotoxicidad, ya que reduce la concentración de ácidos grasos de cadena larga a través del bloqueo del factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides 1 (SREBP1c), lo cual restringe la síntesis de ácidos grasos. El propionato parece actuar mediante la modulación del sistema inmune y del metabolismo como mecanismo protector hepático frente al triptolide (Huang *et al.*, 2020).

En otro estudio realizado en ratas se analizó el efecto que tiene el triptolide sobre la ruta del receptor X farnesoide (de sus siglas en inglés, FXR) al reducir la actividad de Sirt1, lo cual desregula genes involucrados en el metabolismo del hígado produciendo daño hepático (Tabla 2). Se emplearon ratas Wistar que se dividieron en dos grupos, ratas tratadas con triptolide (400 µg/kg/día) y tratadas con triptolide (400 µg/kg/día) junto con el ácido obeticolónico agonista de FXR (OCA) (15 mg/kg/día). Ambos tratamientos tuvieron una duración de 4 semanas. En el grupo de ratas tratadas con triptolide se observó una disminución de la concentración de NR0B2 y FXR en hepatocitos de rata. Además, se suprimió la expresión de glucosa-6-fosfato (G6PC), la bomba de exportación de sales biliares (BSEP) y la PEP carboxiquinasa (PEPCK). Los investigadores demostraron que Sirt1 está implicado en la reducción de FXR y, en consecuencia, en la interrupción del metabolismo hepático. Asimismo, mostraron que OCA tenía la capacidad de prevenir la regulación negativa de FXR inducida por triptolide (Yang *et al.*, 2017). En los animales tratados exclusivamente con triptolide se observó un aumento de ácidos biliares totales y ALP y una disminución de las proteínas y glucosa, indicando daño hepático colestásico. Además, los estudios histológicos del hígado mostraron que los animales presentaron una extensa necrosis del parénquima hepático, congestión de las vacuolas y proliferación de las vías biliares (Yang *et al.*, 2017). Estas mismas alteraciones histológicas se observaron en otro estudio realizado en ratones tratados con triptolide (Liu *et al.*, 2022).

La inactivación hepática de Sirt1 produce disfunción del metabolismo de los ácidos biliares por medio de la regulación negativa de la señalización de FXR (Purushotham *et al.*, 2012). Por lo tanto, Sirt1 y la vía de señalización de FXR interactúan mutuamente en respuesta a distintos estímulos en la regulación de la homeostasis hepática de ácidos biliares, colesterol y glucosa (Yang *et al.*, 2017).

#### 4.2.2 Genipósido

El genipósido es el principal componente bioactivo de *Gardeniae fructus* y posee multitud de funciones farmacológicas, entre las que se incluyen efectos beneficiosos como

neuroprotector, antiinflamatorio y antioxidante, entre otros (Zhou *et al.*, 2019). No obstante, se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de determinar el posible efecto hepatotóxico del genipósido. A este respecto, en un estudio llevado a cabo en 1990, se describió la capacidad del genipósido de incrementar las enzimas hepáticas ALT y AST en ratas, y su conversión a genipina marcó una gran diferencia en su toxicidad (Tabla 2) (Yamano *et al.*, 1990). Para determinar el potencial tóxico del genipósido y de la genipina se llevó a cabo un ensayo *in vitro* en células HepG2 en el que se observó que el genipósido necesitaba convertirse en genipina para ejercer su efecto hepatotóxico. Esto se demostró mediante el cultivo de las células HepG2 en un medio con genipósido en presencia o no de bacterias intestinales, concretamente, *Bifidobacterium longum* HY8001 y *Bacteroides fragilis*. En el primer caso se produjo mayor citotoxicidad, lo que pudo indicar que las bacterias empleadas podrían estar implicadas en el metabolismo del genipósido para convertirlo en genipina. Estos investigadores también probaron el efecto de la combinación del genipósido con una muestra fecal humana como se indica en la Tabla 2, lo cual produjo citotoxicidad inducida por genipina en las células, indicando que la actividad de la suspensión fecal de microbiota intestinal también podría estar implicada en el metabolismo del genipósido (Kang *et al.*, 2012).

Estudios más recientes trataron de dilucidar el papel de la genipina en la hepatotoxicidad del genipósido. Para ello, se llevaron a cabo dos ensayos preclínicos en ratas tratadas oralmente con genipósido, antibióticos y  $\beta$ -glucosidasa. Tras el tratamiento con genipósido se observó un aumento de las concentraciones séricas de ALT y AST. El empleo de antibióticos redujo las actividades de ALT y AST, mientras que el tratamiento con  $\beta$ -glucosidasa (enzima implicada en la hidrólisis de genipósido a genipina) y genipósido aumentó ALT y AST en el suero. En cuanto a las alteraciones histológicas, la genipina indujo infiltración de células inflamatorias y necrosis hepatocelular (Li *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2021).

En el estudio realizado por Luo y colaboradores observaron que el tratamiento con genipósido producía disbiosis intestinal regulando a la baja la abundancia relativa de los géneros *Lactobacillus* y *Romboutsia* y al alza la de *Enterococcus* y *Parasutterella*. Además, determinaron el efecto protector del butirato frente a DILI al favorecer la expresión y la vida media de Nrf2 (Luo *et al.*, 2021). Por otra parte, el de Li *et al.* determinó el papel clave de la actividad glucosidasa microbiana intestinal en la formación de dialdehído de genipina en ratas, y que la unión del dialdehído de genipina al grupo amino primario de los aminoácidos

libres y a los residuos de lisina podría ser crucial en la hepatotoxicidad del genipósido (Li *et al.*, 2019) Ambos estudios se muestran en la Tabla 2.

Otro estudio mostró que el tratamiento con antibióticos (cefadroxilo, oxitetraciclina y eritromicina) atenuó la conversión del genipósido a genipina, aumentando el nivel de genipósido fecal (Jin *et al.*, 2014). A su vez, en el estudio llevado a cabo por Li *et al.* se describió que los antibióticos eran capaces de inducir la activación de la  $\beta$ -glucosidasa intestinal (Li *et al.*, 2019). En consecuencia, el tratamiento con antibióticos atenuó la exposición al genipósido debido a la supresión de las actividades metabólicas de la microbiota intestinal (Tabla 2) (Jin *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019).

Tabla 2. Principales efectos hepatotóxicos producidos por compuestos derivados de plantas y su relación con la alteración de la microbiota intestinal. Fuente propia.

FÁRMACO	TIPO DE ENSAYO	RESULTADOS	FUENTE
<b>Triptolide</b>	Ensayo preclínico en ratones	<ul style="list-style-type: none"> <li>Efecto antiinflamatorio</li> </ul>	(Wu <i>et al.</i> , 2020)
	Ensayo preclínico en ratones tratados con antibióticos (7 días), triptolide (14 días) y transplantados con microbiota intestinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminuyen: <i>Firmicutes</i> y ácidos grasos de cadena corta</li> <li>Elevan: ácidos biliares y <math>\beta</math>-oxidación de ácidos</li> <li>Propionato: desintoxicación</li> </ul>	(Huang <i>et al.</i> , 2020)
	Ensayo clínico en pacientes con daño hepático trasplantados con bacterias fecales	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminuyen: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y ácidos grasos de cadena corta</li> <li>Aumentan: ácidos biliares y <math>\beta</math>-oxidación de ácidos</li> </ul>	(Hu <i>et al.</i> , 2021)
	Ensayo preclínico en ratones pretratados con antibióticos y administrados con triptolide por sonda	<ul style="list-style-type: none"> <li>Triptolide + antibióticos mayor toxicidad</li> <li>Necrosis del parénquima hepático, vacuolización y proliferación de vías biliares.</li> </ul>	(Liu <i>et al.</i> , 2022)
	Ensayo preclínico en ratas tratadas con triptolide y triptolide + OCA	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inactivación de la ruta Sirt1/FXR: hepatotoxicidad</li> <li>Necrosis del parénquima hepático, vacuolización y proliferación de vías biliares.</li> </ul>	(Yang <i>et al.</i> , 2017)
<b>Genipósido</b>	Ensayo preclínico en ratas administradas oralmente con genipósido y genipina	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aumentan: ALT y AST</li> </ul>	(Yamano <i>et al.</i> , 1990)
	Ensayo preclínico en células HepG2 cultivadas en presencia de <i>B. longum</i> HY8001 y <i>B. fragilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microbiota intestinal metabolización genipósido</li> </ul>	(Kang <i>et al.</i> , 2012)
	Ensayo preclínico en ratas tratadas oralmente con genipósido, antibióticos y $\beta$ -glucosidasa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dialdehído de genipina: hepatotoxicidad</li> <li>Alteraciones histológicas</li> </ul>	(Li <i>et al.</i> , 2019; Luo <i>et al.</i> , 2021)

Ensayo preclínico en ratas tratadas oralmente con genipósido	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteración de <i>Lactobacillus</i>, <i>Romboutsia</i>, <i>Enterococcus</i> y <i>Parasutterella</i>.</li> <li>• Butirato: protector</li> </ul>	(Luo <i>et al.</i> , 2021)
Ensayo preclínico en ratas tratadas con antibióticos y genipósido oralmente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibióticos: supresión metabolismo intestinal</li> </ul>	(Jin <i>et al.</i> , 2014; Li <i>et al.</i> , 2019)

ALT: Alanina aminotransferasa; AST aspartato aminotransferasa; FXR: Receptor X farnesoide; OCA: ácido obeticólico agonista de FXR

A modo de resumen, indicar que el triptolide y el genipósido son dos compuestos derivados de plantas implicados en el desarrollo de DILI. Varios estudios han demostrado la implicación de la microbiota intestinal en la metabolización de ambos compuestos. Además, el tratamiento con antibióticos ejerce efectos opuestos en el triptolide y el genipósido, favoreciendo el desarrollo de DILI en el caso del triptolide y oponiéndose en el del genipósido.

### **4.3 DILI producido por fármacos no antibióticos y su relación con la alteración de la microbiota intestinal**

#### **4.3.1 Tacrina**

Un estudio llevado a cabo en ratas administradas con tacrina por medio de una sonda oral en una única dosis sugirió que la tacrina es un hepatotóxico directo. Los investigadores sugirieron que los metabolitos glucuronizados de la tacrina se excretan en el intestino a través de la secreción biliar activa, donde se desconjugan por bacterias intestinales y se reabsorben en el intestino en la forma del fármaco original (Yip *et al.*, 2018).

Mediante estudios metabolómicos se puede obtener información sobre la interferencia entre el huésped y su microbiota intestinal. A este respecto, la administración de tacrina se acompañó de perfiles metabolómicos modificados. Se detectaron 43 marcadores urinarios únicos y 62 fecales asociados con la elevación de ALT y AST inducida por tacrina. Además, la tacrina también produce disfunción mitocondrial (Berson *et al.*, 1996; Mansouri *et al.*, 2003), lo cual se observó por un agotamiento del ciclo del ácido cítrico y de los intermediarios de la fosforilación oxidativa. En particular, el 56% y el 45% de los marcadores urinarios y fecales, respectivamente, son de origen metabólico (Wikoff *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011; Nicholson *et al.*, 2012; Yip *et al.*, 2015), lo que sugiere la implicación de la microbiota intestinal en la elevación de ALT y AST inducida por tacrina. Se observaron metabolitos como el ácido litocólico, que se produce por géneros bacterianos como *Bacteroides*, *Clostridium* y *Eubacterium*; el ácido indolacético o el ácido p-hidroxifenilacético que se producen por la fermentación colónica de los aminoácidos aromáticos por medio de *Clostridium* y *Bacteroides*

y ácidos grasos de cadena larga, lo que suscita a que se debe a cambios en la composición microbiana del intestino de estas ratas (Russell *et al.*, 2013).

El análisis del ARNr 16s de la microbiota intestinal mostró un incremento en la concentración de *Enterobacterias* y *Bacteroides* en las ratas después del tratamiento. Estas bacterias se caracterizan por ser productoras de  $\beta$ -glucuronidasa, favoreciendo la desglucoronización. En el caso del género *Lactobacillus*, que está relacionado con la protección hepática, se encontró menos representado en la microbiota intestinal de los animales tratados (Yip *et al.*, 2018).

En conclusión, este estudio resumido en la Tabla 3 confirma que el eje intestino-hígado modula la hepatotoxicidad de la tacrina en un modelo experimental en rata (Yip *et al.*, 2018).

#### 4.3.2 Paracetamol (APAP)

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la insuficiencia hepática inducida por APAP. Concentraciones elevadas de APAP en un adulto sano durante 5 días aumentaron las actividades de transaminasas (Tabla 3) (Watkins *et al.*, 2006), aunque la lesión hepática inducida por APAP puede estar influenciada por otros factores como el consumo de alcohol, la obesidad, el agotamiento nutricional o el uso de medicamentos que estimulan el sistema del CYP450 (Bunchorntavakul y Reddy, 2013). APAP se excreta en la bilis o la orina. Cuando la dosis es alta o la capacidad de esterificación de glucurónido o sulfato está saturada se produce de forma masiva NAPQI (N-acetil-p-benzoquinoneimina), un intermediario activo que produce toxicidad. Inicialmente, el NAPQI producido se esterifica uniéndose al glutatión (GSH) y se elimina por la orina. Sin embargo, cuando el GSH se agota, el NAPQI restante se acumula en los hepatocitos uniéndose a grupos sulfhidrilo presentes en las proteínas, produciendo APAP nocivo (APAP-ADs). La acumulación de NAPQIs puede destruir membranas plasmáticas, inducir disfunción mitocondrial severa, generar radicales libres del oxígeno, fragmentar el ADN nuclear y peroxidar los lípidos, conduciendo así a necrosis hepática (Jaeschke *et al.*, 2012; Ramachandran y Jaeschke, 2020).

Se ha descrito a la N-acetil cisteína como agente terapéutico frente a APAP, ya que restablece la concentración de glutatión y proporciona precursores de cisteína (Ferner *et al.*, 2011).

Se ha descrito que el grado de daño hepático de APAP en ratones libres de gérmenes (GF), o ratones libres de microbiota intestinal, fue menor que en ratones sin patógenos específicos (SPF). La expresión de la enzima CYP450, que está implicada en el metabolismo

de APAP en el hígado, está estrechamente relacionada con la microbiota intestinal. Las concentraciones hepáticas de citocromo P450 1A2 (CYP1A2) y citocromo P450 3A4 (CYP3A4) en los ratones GF fueron significativamente más bajas que en ratones SPF, lo que puede explicar la baja hepatotoxicidad inducida por APAP en ratones GF (Jourova *et al.*, 2020). En ratones se probó también que el bloqueo de la señalización TLRs-MYC de los patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMPs) puede regular a la baja la activación de células estrelladas, endoteliales y de Kupffer, y disminuir significativamente la expresión de quimioquinas y mediadores proinflamatorios, reduciendo así la respuesta intrahepática inflamatoria en el modelo inducido por APAP (Kolodziejczyk *et al.*, 2020). Ambos estudios se muestran en la Tabla 3.

Por otra parte, los cambios en la diversidad y la abundancia de la microbiota pueden participar en la detoxificación y transformación de APAP. En un experimento (Tabla 3) se modificó la composición de la microbiota en ratones con vancomicina, produciendo un incremento de las concentraciones de glutatión y de ácido 2-hidroxi-butírico y una reducción en el número de bacterias gram positivas (Zheng *et al.*, 2020). Del mismo modo, varios investigadores demostraron que se incrementó la degradación de APAP en un 68% en ratones tratados con *Lactobacillus reuteri* (Tabla 3) (Kim *et al.*, 2018). P-cresol es una proteína endógena localizada en el intestino y que en el hígado se transforma a sulfato de p-cresol por acción de las sulfotransferasas. El APAP es sustrato de las sulfotransferasas y el p-cresol puede reducir la capacidad de las sulfotransferasas para sulfurar el APAP (Clayton *et al.*, 2009).

A su vez, una mayor permeabilidad en el intestino permite que abundantes sustancias nocivas puedan alcanzar el hígado, agravando la reacción inflamatoria y la hepatotoxicidad de APAP (Tabla 3) (Elinav *et al.*, 2018; Schneider *et al.*, 2020).

Tanto la microbiota intestinal como sus metabolitos están implicados en la regulación del estrés oxidativo y la inflamación, los cuales desempeñan un papel muy importante en la hepatotoxicidad inducida por fármacos. El grupo de Saeedi *et al.* llevó a cabo un ensayo preclínico en ratones. Los ratones se trataron con APAP disuelto con polietilenglicol al 50% y se sacrificaron 24 horas después del tratamiento. Los ratones no tratados mostraron una regulación positiva de la transcripción del factor Nrf2 en el hígado, mejorando la actividad antioxidante y la respuesta xenobiótica para proteger al hígado de la toxicidad aguda por APAP. Además, esta regulación positiva se incrementó mediante la suplementación con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (Saeedi *et al.*, 2020). Por otro lado, se describió que los

probióticos *Enterococcus lactis* IITRHR1 y *Lactobacillus acidophilus* MTCC447 protegen contra la lesión hepática inducida por APAP mediante la modulación de la capacidad antioxidante del hígado y la expresión de apoptóticos/anti-proteínas apoptóticas (Sharma *et al.*, 2011). Los dos ensayos se han resumido en la Tabla 3.

#### 4.3.3 Fármacos antitiroideos: Metamizol (MMI) y propiltiouracilo (PTU)

El MMI se metaboliza mediante enzimas del CYP450 (Lee y Neal, 1978; Mizutani *et al.*, 2000) y la flavoproteína oxidasa de función mixta (FMO) (Poulsen *et al.*, 1974; Kedderis y Rickert, 1985). Por medio de CYP450 se convierte en N-metilourea y glioxal, los cuales se consideran los metabolitos del MMI responsables de la hepatotoxicidad inducida por el mismo (Mizutani *et al.*, 2000).

El PTU se metaboliza en el hígado por glucuronidación y metabolización por medio de una monooxigenasa dependiente de flavina (FMO3), generando metabolitos hepatotóxicos (Fröhlich y Wahl, 2019).

Diversos estudios han establecido la importancia de los mecanismos de defensa celular como el glutatión en la prevención de la hepatotoxicidad inducida por fármacos antitiroideos, de manera que un agotamiento del glutatión tisular puede producir reacciones tóxicas (Mizutani *et al.*, 1999; Heidari *et al.*, 2013; Heidari *et al.*, 2014)

Se llevó a cabo un ensayo clínico resumido en la Tabla 3 para determinar los cambios en la microbiota intestinal inducidos por los fármacos antitiroideos. Se comparó el efecto de la administración con MMI y PTU en pacientes con los pacientes no tratados. Los resultados mostraron que *Faecalibacterium* y *Clostridium* se redujeron en los pacientes tratados mientras que *E. rectale*, *Romboutsia* y *Dorea* mostraron un incremento (Sun *et al.*, 2020).

Por otra parte, se describieron los cambios que producían cada uno de los fármacos antitiroideos en la composición y estructura de la microbiota. El índice ACE (representa la riqueza comunitaria de la microbiota intestinal) aumentó en pacientes tratados con MMI respecto a PTU y ambos respecto al control. En cuanto a su diversidad microbiana los tratados con MMI mostraron una mayor proporción de *Firmicutes*, mientras que en los tratados con PTU la proporción de *Bacteroidetes* fue mayor como se indica en la Tabla 3 (Sun *et al.*, 2020; Virili *et al.*, 2021).

Se asume que la microbiota alterada desempeña un importante papel en la lesión hepática producida por fármacos antitiroideos mediante la hipótesis de la endotoxemia intestinal. La biosíntesis de LPS se incrementó en los pacientes, lo que coincidió con las variaciones de las

concentraciones de LPS en heces. Además, aumentó la invasión bacteriana de células epiteliales intestinales y toxinas bacterianas implicadas en la alteración de la homeostasis metabólica, causando inflamación crónica y translocación bacteriana intestinal (Sun *et al.*, 2020).

El grupo de investigación de Sun *et al.*, profundizó en dichos resultados mediante un modelo experimental en ratas (Tabla 3), con el fin de corroborar el efecto de los fármacos antitiroideos en las alteraciones de la microbiota intestinal. Los resultados presentaron diversas variaciones en cuanto a las comunidades de la microbiota intestinal, posiblemente debido a las divergencias existentes entre la microbiota humana y la de rata. En cuanto al análisis de la función de la microbiota intestinal, los resultados fueron consistentes con los obtenidos en pacientes (Sun *et al.*, 2020). Asimismo, se estudiaron las alteraciones en la estructura y función de la barrera intestinal en los enterocitos de las ratas. Se observó que las mitocondrias presentaban desprendimientos de las vellosidades epiteliales intestinales. Además, debido a la destrucción de la barrera intestinal, las ratas tratadas presentaban niveles de FITC-dextrano más altos (Sun *et al.*, 2020). Un estudio previo realizado por el grupo de Heidari *et al* indicó que el reactivo glioxal podría ser responsable de estas alteraciones (Heidari *et al.*, 2013).

Tabla 3. Principales efectos hepatotóxicos producidos por fármacos no antibióticos y su relación con la alteración de la microbiota intestinal. Fuente propia.

FÁRMACO	TIPO DE ENSAYO	RESULTADOS	FUENTE
<b>Tacrina</b>	Ensayo preclínico en ratas macho tratadas oralmente por medio de una sonda	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevación: ALT y AST</li> <li>• Disfunción mitocondrial</li> <li>• Producción de ácido litocólico, ácido indolacético o ácido p-hidroxifenilacético</li> <li>• Incremento: <i>Enterobacterias</i> y <i>Bacteroides</i></li> <li>• Disminución: <i>Lactobacillus</i></li> </ul>	(Berson <i>et al.</i> , 1996; Mansouri <i>et al.</i> , 2003; Russell <i>et al.</i> , 2013; Yip <i>et al.</i> , 2018)
<b>Paracetamol</b>	Ensayo clínico en pacientes sanos con 4 g/día de APAP	• Elevación de transaminasas	(Watkins <i>et al.</i> , 2006)
	Ensayo preclínico en ratones machos y hembras GF y SPF	• CYP1A2 y CYP3A4 reducen la hepatotoxicidad.	(Jourova <i>et al.</i> , 2020)
	Ensayo preclínico en ratones macho inyectados intraperitonealmente con 500 mg/kg peso corporal	• Bloqueo TLRs-MYC reduce la respuesta intrahepática inflamatoria.	(Kolodziejczyk <i>et al.</i> , 2020)
	Ensayo preclínico en ratones con inyección intraperitoneal y administrados oralmente con APAP	• Vancomicina incrementa el glutatión y el ácido 2-hidroxi-butírico y reduce bacterias Gram +.	(Zheng <i>et al.</i> , 2020)
	Ensayo preclínico en ratones tratados oralmente con probióticos	• <i>L. reuteri</i> degrada APAP	(Kim <i>et al.</i> , 2018)

	Ensayo preclínico en ratones en ayunas 12 horas antes de la inyección intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mayor permeabilidad en el intestino agrava la hepatotoxicidad.</li> </ul>	(Elinav <i>et al.</i> , 2018; Schneider <i>et al.</i> , 2020).
	Ensayo preclínico en ratones alimentados con probióticos antes del sacrificio con APAP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Factor Nrf2: mejora actividad antioxidante y respuesta xenobiótica. <i>L. rhamnosus</i> regula positivamente</li> </ul>	(Saeedi <i>et al.</i> , 2020)
	Ensayo preclínico en hepatocitos tratados con APAP y cultivados junto con <i>E. lactis</i> y <i>L.acidophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>E. lactis</i> IITRHR1 y <i>L acidophilus</i> MTCC447: protección</li> </ul>	(Sharma <i>et al.</i> , 2011)
<b>Fármacos antitiroideos</b>	Ensayo clínico en pacientes con enfermedad de Graves tratados con MMI y PTU	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reducción: <i>Faecalibacterium</i> y <i>Clostridium</i>.</li> <li>Incremento: <i>Eubacterium rectale</i>, <i>Romboutsia</i> y <i>Dorea</i>.</li> <li>Aumento: Síntesis polisacáridos e invasión y toxinas bacterianas</li> </ul>	(Sun <i>et al.</i> , 2020)
	Ensayo clínico en pacientes con enfermedad de Graves tratados con MMI y PTU	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aumento del índice ACE</li> <li>MMI: incrementa <i>Firmicutes</i>.</li> <li>PTU: aumenta <i>Bacteroidetes</i>.</li> </ul>	(Sun <i>et al.</i> , 2020; Virili <i>et al.</i> , 2021)
	Ensayo preclínico en ratas hembras tratadas oralmente con MMI y PTU	<ul style="list-style-type: none"> <li>Variación en la microbiota intestinal.</li> <li>Alteración mitocondrial en los enterocitos.</li> </ul>	(Sun <i>et al.</i> , 2020)

ACE: Estimador de cobertura basado en abundancia; ALT: Alanina aminotransferasa; APAP: paracetamol; AST aspartato aminotransferasa; CYP1A2: citocromo P450 1A2; CYP3A4: citocromo P450 3A4; MMI: metimazol; PTU: propiltiouracilo.

En conjunto, dichos resultados demuestran que los fármacos antitiroideos producen cambios en la microbiota intestinal y un aumento de LPS en las heces. El aumento de la concentración de LPS y los cambios de los parámetros clínicos indican que la microbiota intestinal media la lesión hepática inducida por fármacos antitiroideos en un mecanismo que involucra la endotoxemia intestinal (Sun *et al.*, 2020).

## 5. CONCLUSIONES

En estos apartados se han resumido los resultados encontrados respecto a tres tipos de fármacos en el desarrollo de DILI y la implicación de la microbiota intestinal. Las conclusiones obtenidas de esta revisión bibliográfica son las siguientes:

- Los antibióticos están relacionados con la microbiota intestinal en el desarrollo de DILI produciendo alteraciones en las poblaciones microbianas, destacando el género *Bacteroides* y generando alteraciones histológicas.
- El triptolide y el genipósido producen daño hepático mediado por la microbiota intestinal. En el caso del triptolide el uso de probióticos mejora la patología mientras que el uso de antibióticos promueve el daño hepático. Con el genipósido los antibióticos protegen frente a DILI.

- La tacrina genera daño hepático, indicado por el aumento de las transaminasas, además de producir alteraciones mitocondriales y de las comunidades microbianas de la microbiota intestinal.
- Un gran número de estudios relacionados con el APAP han demostrado su papel hepatotóxico. Se han determinado distintas rutas implicadas en el daño hepático y varios géneros bacterianos que mejoran y protegen contra la lesión hepática.
- Los fármacos antitiroideos son responsables de DILI y producen cambios en la población microbiana de la microbiota intestinal favoreciendo la invasión bacteriana. Concretamente, el MMI incrementa la población de *Firmicutes* y el PTU de *Bacteroides*.

## 6. REFERENCIAS

- Allen, J. M., Mailing, L. J., Niemi, G. M., Moore, R. *et al.* (2018) “Exercise alters gut microbiota composition and function in lean and obese humans”, *Medicine and science in sports and exercise*, 50(4).
- Aller, R., De Luis, D. A., Izaola, O., Conde, R. *et al.* (2011) “Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial”, *European review for medical and pharmacological sciences*, 15(9), pp. 1090-5.
- Andersen, M. L. y Winter, L. M. (2019) “Animal models in biological and biomedical research-experimental and ethical concerns”, *Anais da academia brasileira de ciências*, 91.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D. *et al.* (2011) “Enterotypes of the human gut microbiome”, *Nature*, 473(7346), pp. 174-180.
- Behr, C., Slopianka, M., Haake, V., Strauss, V. *et al.* (2019) “Analysis of metabolome changes in the bile acid pool in feces and plasma of antibiotic-treated rats”, *Toxicology and applied pharmacology*, 363, pp. 79-87.
- Berson, A., Renault, S., Letteron, P., Robin, M. A. *et al.* (1996) “Uncoupling of rat and human mitochondria: a possible explanation for tacrine-induced liver dysfunction”, *Gastroenterology*, 110(6), pp. 1878-1890.
- Blaak, E. E., Canfora, E. E., Theis, S., Frost, G. *et al.* (2020) “Short chain fatty acids in human gut and metabolic health”, *Beneficial microbes*, 11(5), pp. 411-455.
- Boelsterli, U. A. (2002) “Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity”, *Drug safety*, 25(9), pp. 633-648.
- Boxill, G. C., Nash, C. B. y Wheeler, A. G. (1958) “Comparative pharmacological and toxicological evaluation of N-acetyl-p-aminophenol, salicylamide, and acetylsalicylic acid”, *Journal of the american pharmaceutical association (Scientific Ed.)*, 47(7), pp. 479-487.
- Bron, P. A., Van Baarlen, P. y Kleerebezem, M. (2012) “Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa”, *Nature reviews microbiology*, 10(1), pp. 66-78.
- Bunchorntavakul, C. y Reddy K. R. (2013) “Acetaminophen-related Hepatotoxicity”, *Clinics in liver disease*, 17(4), pp. 587-607.
- Cammarota, G., Ianiro, G., Bibbò, S. y Gasbarrini, A. (2014) “Gut microbiota modulation: Probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation?”, *Internal and emergency medicine*, 9(4), pp. 365-373.
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., *et al.* (2009) “Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability”, *Gut*, 58(8), pp. 1091-1103.
- Carbajo-Pescador, S., Porras, D., García-Mediavilla, M. V., Martínez-Flórez, S. *et al.* (2019) “Beneficial effects of exercise on gut microbiota functionality and barrier integrity, and gut-liver crosstalk in an in vivo model of early obesity and non-alcoholic fatty liver disease”, *Disease models & mechanisms*, 12(5), p. dmm039206.
- Chalermrat, B. y Rajender, K. (2013) “Acetaminophen-related Hepatotoxicity”, *Clinics in liver disease*, 17(4), pp. 587-607.
- Chen, T., Li, R. y Chen, P. (2021) “Gut microbiota and chemical-induced acute liver injury”, *Frontiers in*

- physiology*, 12, pp. 1–12.
- Clayton, T. A., Baker, D., Lindon, J. C., Everett, J. R. *et al.* (2009) “Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism”, *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(34), pp. 14728-14733.
- Cohen, N. A. y Maharshak, N. (2017) “Novel indications for fecal microbial transplantation: update and review of the literatura”, *Digestive diseases and sciences*, 62(5), pp. 1131-1145.
- Dalton, A., Mermier, C. y Zuhl, M. (2019) “Exercise influence on the microbiome–gut–brain axis”, *Gut microbes*, 10(5), pp. 555-568.
- Daubioul, C., Rousseau, N., Demeure, R., Gallez, B. *et al.* (2002) “Dietary fructans, but not cellulose, decrease triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker fa/fa rats”, *The journal of nutrition*, 132(5), pp. 967-973.
- Davidson, M. K., Lindsey, J. R. y Davis, J. K. (1987) “Requirements and selection of an animal model”, *Israel journal of medical sciences*, 23(6), pp. 551-555.
- Delaune, V., Orci, L. A., Lacotte, S., Peloso, A. *et al.* (2018) “Fecal microbiota transplantation: a promising strategy in preventing the progression of non-alcoholic steatohepatitis and improving the anti-cancer immune response”, *Expert opinion on biological therapy*, 18(10), pp. 1061–1071.
- Dinleyici, E. C., Eren, M., Ozen, M., Yargic, Z. A. *et al.* (2012) “Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrhea”, *Expert opinion on biological therapy*, 12(4), pp. 395-410.
- Eder, H. (1964) “Chronic toxicity studies on phenacetin, N-acetyl-p-aminophenol (NAPA) and acetylsalicylic acid on cats”, *Acta pharmacologica et toxicologica*, 21(2), pp. 197-204.
- Eiseman, B., Silen, W., Bascom, G. S. y Kauvar, A. J. (1958) “Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis”, *Surgery*, 44(5), pp. 854-859.
- Elinav, E., Henao-Mejia, J., Strowig, T. y Flavell, R. (2018) “NLRP6 and dysbiosis: avoiding the luring attraction of over-simplification”, *Immunity*, 48(4), pp. 603-604.
- Famouri, F., Shariat, Z., Hashemipour, M., Keikha, M. *et al.* (2017) “Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents”, *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 64(3), pp. 413-417.
- Ferner, R. E., Dear, J. W. y Bateman, D. N. (2011) “Management of paracetamol poisoning”, *British medical journal*, 342.
- Fröhlich, E. y Wahl, R. (2019) “Microbiota and thyroid interaction in health and disease”, *Trends in endocrinology & metabolism*, 30(8), pp. 479-490.
- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995) “Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics”, *The journal of nutrition*, 125(6), pp. 1401-1412.
- Gil-Cardoso, K., Ginés, I., Pinent, M., Ardévol, A. *et al.* (2016) “Effects of flavonoids on intestinal inflammation, barrier integrity and changes in gut microbiota during diet-induced obesity”, *Nutrition research reviews*, 29, pp. 234–248.
- Grehan, M. J., Borody, T. J., Leis, S. M., Campbell, J. *et al.* (2010) “Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora”, *Journal of clinical gastroenterology*, 44(8), pp. 551-561.
- Gubert, C., Kong, G., Renoir, T. y Hannan, A. J. (2020) “Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases”, *Neurobiology of disease*, 134, p. 104621.
- Han, X., Shen, T. y Lou, H. (2007) “Dietary polyphenols and their biological significance”, *International journal of molecular sciences*, 8(9), pp. 950-988.
- Hanssen, N. M., De Vos, W. M. y Nieuwdorp, M. (2021) “Fecal microbiota transplantation in human metabolic diseases: From a murky past to a bright future?”, *Cell metabolism*, 33(6), pp. 1098-1110.
- Heidari, R., Babaei, H. y Eghbal, M. (2013) “Mechanisms of methimazole cytotoxicity in isolated rat hepatocytes”, *Drug and chemical toxicology*, 36(4), pp. 403-411.
- Heidari, R., Babaei, H. y Eghbal, M. A. (2013) “Cytoprotective effects of organosulfur compounds against methimazole induced toxicity in isolated rat hepatocytes”, *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3(1), p. 135.
- Heidari, R., Babaei, H., Roshangar, L. y Eghbal, M. A. (2014) “Effects of enzyme induction and/or glutathione depletion on methimazole-induced hepatotoxicity in mice and the protective role of N-acetylcysteine”, *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(1), p. 21.
- Hernández, S. (2006) “El modelo animal en las investigaciones biomédicas”, *Biomedicina*, 2(3), pp. 252-256.

- Hotel, A. C. P. y Cordoba, A. (2001) "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria", *Prevention*, 5(1), pp. 1-10.
- Hu, S., Tang, B., Lei, Y., Tang, L. *et al.* (2021) "Triptolide induced liver injury via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism", *Journal of gastroenterology and hepatology*, 36, pp. 175-175.
- Hu, X., Wang, T., Liang, S., Li, W. *et al.* (2015) "Antibiotic-induced imbalances in gut microbiota aggravates cholesterol accumulation and liver injuries in rats fed a high-cholesterol diet", *Applied microbiology and biotechnology*, 99(21), pp. 9111-9122.
- Huang, S. J., Mu, F., Li, F., Wang, W. *et al.* (2020) "Systematic Elucidation of the Potential Mechanism of Erzhi Pill against Drug-Induced Liver Injury via Network Pharmacology Approach", *Evidence-based complementary and alternative medicine*. doi: 10.1155/2020/6219432.
- Huang, J. F., Zhao, Q., Dai, M. Y., Xiao, X. R., *et al.* (2020) "Gut microbiota protects from triptolide-induced hepatotoxicity: Key role of propionate and its downstream signalling events", *Pharmacological research*, 155, p. 104752.
- Iorga, A. y Dara, L. (2019) "Cell death in drug-induced liver injury", *Advances in pharmacology*, 85, pp. 31-74.
- Jaeschke, H., McGill, M. R. y Ramachandran, A. (2012) "Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity", *Drug metabolism reviews*, 44(1), pp. 88-106.
- Jaeschke, H., Williams, C. D., McGill, M. R., Xie, Y. *et al.* (2013) "Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products", *Food and chemical toxicology*, 55, pp. 279-289.
- Jaeschke, H. y Ramachandran, A. (2020) "Mechanisms and pathophysiological significance of sterile inflammation during acetaminophen hepatotoxicity", *Food and chemical toxicology*, 138, p. 111240.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C. y Jansson, J. K. (2010) "Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota", *Microbiology*, 156(11), pp. 3216-3223.
- Jin, M. J., Kim, I. S., Kim, D. H. y Yoo, H. H. (2014) "Effects of intestinal microbiota on the bioavailability of geniposide in rats", *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(40), pp. 9632-9636.
- Jourová, L., Vavreckova, M., Zemanova, N., Anzenbacher, P. *et al.*, (2020) "Gut microbiome alters the activity of liver cytochromes P450 in mice with sex-dependent differences", *Frontiers in pharmacology*, 11, p. 01303.
- Juárez-Fernández, M., Porras, D., Petrov, P., Román-Sagüillo, S. *et al.* (2021) "The Synbiotic Combination of Akkermansia muciniphila and Quercetin Ameliorates Early Obesity and NAFLD through Gut Microbiota Reshaping and Bile Acid Metabolism Modulation", *Antioxidants*, 10(12), p. 2001.
- Kang, M. J., Khanal, T., Kim, H. G., Lee, D. H. *et al.* (2012) "Role of metabolism by human intestinal microflora in geniposide-induced toxicity in HepG2 cells", *Archives of pharmacal research*, 35(4), pp. 733-738.
- Kaplowitz, N. (2002) "Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. In Seminars in liver disease", *Thieme medical publishers*, 22(2), pp. 137-144.
- Kedderis, G. L. y Rickert, D. E. (1985) "Loss of rat liver microsomal cytochrome P-450 during methimazole metabolism. Role of flavin-containing monooxygenase", *Drug metabolism and disposition*, 13(1), pp. 58-61.
- Kim, J. K., Choi, M. S., Jeong, J. J., Lim, S. M., *et al.* (2018) "Effect of probiotics on pharmacokinetics of orally administered acetaminophen in mice", *Drug metabolism and disposition*, 46(2), pp. 122-130.
- Kolodziejczyk, A. A., Federici, S., Zmora, N., Mohapatra, G. *et al.* (2020) "Acute liver failure is regulated by MYC- and microbiome-dependent programs", *Nature medicine*, 26(12), pp. 1899-1911.
- Langlands, S. J., Hopkins, M. J., Coleman, N. y Cummings, J. H. (2004) "Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel", *Gut*, 53(11), pp. 1610-1616.
- Leach J (2013) "Gut microbiota: please pass the microbes", *Nature*, 504(7478), p. 33.
- Li, Y., Pan, H., Li, X., Jiang, N., *et al.* (2019) "Role of intestinal microbiota-mediated genipindialdehyde intermediate formation in geniposide-induced hepatotoxicity in rats", *Toxicology and applied pharmacology*, 377, p. 114624.

- Lindsay, R. H., Cash, A. G., Vaughn, A. W. y Hill, J. B. (1977) “Glucuronide conjugation of 6-n-propyl-2-thiouracil and other antithyroid drugs by guinea pig liver microsomes in vitro”, *Biochemical pharmacology*, 26(7), pp. 617-623.
- Liu, Y. T., Hu, Y. Q., Wang, Y. L., Huang, K. *et al.* (2022) “Antibiotic pretreatment promotes orally-administered triptolide absorption and aggravates hepatotoxicity and intestinal injury in mice”, *Journal of ethnopharmacology*, 292, p. 115224.
- Lozupone, C. A. y Knight, R. (2008) “Species divergence and the measurement of microbial diversity”, *FEMS microbiology reviews*, 32(4), pp. 557-578.
- Luo, Y., Zhang, X., Zhang, W., Yang, Q. *et al.* (2021) “Compatibility with Semen Sojæ Praeparatum attenuates hepatotoxicity of Gardeniæ Fructus by regulating the microbiota, promoting butyrate production and activating antioxidant response”, *Phytomedicine*, 90, p. 153656.
- Malhi, H. y Gores, G. J. (2008) “Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury”, *Gastroenterology*, 134(6), pp. 1641–1654.
- Mansouri, A., Haouzi, D., Descatoire, V., Demeilliers, C. *et al.* (2003) “Tacrine inhibits topoisomerases and DNA synthesis to cause mitochondrial DNA depletion and apoptosis in mouse liver”, *Hepatology*, 38(3), pp. 715-725.
- Matzinger, P. (1998) “An innate sense of danger”, *Seminars in immunology*, 10(5), pp. 399–415.
- McGill, M. R., Sharpe, M. R., Williams, C. D., Taha, M. *et al.* (2012) “The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation”, *The journal of clinical investigation*, 122(4), pp. 1574-1583.
- McGill, M. R., Williams, C. D., Xie, Y., Ramachandran, A. *et al.* (2012) “Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity”, *Toxicology and applied pharmacology*, 264(3), pp. 387-394.
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E. *et al.* (2017) “The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota”, *Microbiology and molecular biology reviews*, 81(4), p. e00036-17.
- Mizutani, T., Murakami, M., Shirai, M., Tanaka, M. *et al.* (1999) “Metabolism-dependent hepatotoxicity of methimazole in mice depleted of glutathione”, *Journal of applied toxicology*, 19(3), pp. 193-198.
- Mizutani, T., Yoshida, K., Murakami, M., Shirai, M. *et al.* (2000) “Evidence for the involvement of N-methylthiourea, a ring cleavage metabolite, in the hepatotoxicity of methimazole in glutathione-depleted mice: structure– toxicity and metabolic studies”, *Chemical research in toxicology*, 13(3), pp. 170-176.
- Nabavi, S., Rafraf, M., Somi, M. H., Homayouni-Rad, A. *et al.* (2014) “Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease”, *Journal of dairy science*, 97(12), pp. 7386-7393.
- National Institutes of Health (2022).
- Neyrinck, A. M., Van Hee, V. F., Piront, N., De Backer, F. *et al.* (2012) “Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satietogenic gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice”, *Nutrition & diabetes*, 2(1), p. e28-e28.
- Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J. *et al.* (2009) “Mechanisms of action of probiotics: recent advances”, *Inflammatory bowel diseases*, 15(2), pp. 300-310.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R. *et al.* (2012) “Host-gut microbiota metabolic interactions”, *Science*, 336(6086), pp. 1262-1267.
- O'Hara, A. M. y Shanahan, F. (2006) “The gut flora as a forgotten organ”, *EMBO reports*, 7(7), pp. 688-693.
- Ordonez, R., Carbajo-Pescador, S., Mauriz, J. L. y Gonzalez-Gallego, J. (2015) “Understanding nutritional interventions and physical exercise in non-alcoholic fatty liver disease”, *Current molecular medicine*, 15(1), pp. 3–26.
- Pan, Y., Cao, M., You, D., Qin, G. *et al.* (2019) “Research progress on the animal models of drug-induced liver injury: current status and further perspectives”, *BioMed research international*. doi.org/10.1155/2019/1283824
- Park, B. K., Kitteringham, N. R., Powell, H. y Pirmohamed, M. (2000) “Advances in molecular toxicology - Towards understanding idiosyncratic drug toxicity”, *Toxicology*, 153(1-3), pp. 39–60.
- Pisonero-Vaquero S., Martínez-Ferreras Á., García-Mediavilla M. V., Martínez-Flórez S. *et al.* (2015) “Quercetin ameliorates dysregulation of lipid metabolism genes via the PI3K/AKT pathway in a diet-

- induced mouse model of nonalcoholic fatty liver disease”, *Molecular nutrition & food research*, 59(5), pp. 879–893.
- Porras, D., Nistal, E., Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J. *et al.* (2018) “Intestinal microbiota modulation in obesity-related non-alcoholic fatty liver disease”, *Frontiers in physiology*, p. 1813.
- Potter, W. Z., Thorgeirsson, S. S., Jollow, D. J. y Mitchell, J. R. (1974) “Acetaminophen-induced hepatic necrosis V. Correlation of hepatic necrosis, covalent binding and glutathione depletion in hamsters”, *Pharmacology*, 12(3), pp.129-143.
- Poulsen, L. L., Hyslop, R. M. y Ziegler, D. M. (1974) “S-oxidation of thioureylenescatalyzed by a microsomal flavoprotein mixed-function oxidase”, *Biochemical pharmacology*, 23(24), pp. 3431-3440.
- Purushotham, A., Xu, Q., Lu, J., Foley, J. F. *et al.* (2012) “Hepatic deletion of SIRT1 decreases hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ /farnesoid X receptor signaling and induces formation of cholesterol gallstones in mice”, *Molecular and cellular biology*, 32(7), pp. 1226-1236.
- Quintás, G., Martínez-Sena, T., Conde, I., ParejaIbars, E. *et al.* (2021) “Metabolomic analysis to discriminate drug-induced liver injury (DILI) phenotypes”, *Archives of toxicology*, 95(9), pp. 3049-3062.
- Quiroga, R., Nistal, E., Estébanez, B., Porras, D. *et al.* (2020) “Exercise training modulates the gut microbiota profile and impairs inflammatory signaling pathways in obese children”, *Experimental & molecular medicine*, 52(7), pp. 1048-1061.
- Roberfroid, M. (2007) “Prebiotics: the concept revisited”, *The journal of nutrition*, 137(3), pp. 830S-837S.
- Robin, M. A., Le Roy, M., Descatoire, V., y Pessayre, D. (1997) “Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis”, *Journal of hepatology*, 26, pp. 23-30.
- Russell, W. R., Duncan, S. H., Scobbie, L., Duncan, G. *et al.* (2013) “Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein”, *Molecular nutrition & food research*, 57(3), pp. 523-535.
- Russmann, S., Kullak-Ublick, G. y Grattagliano, I. (2009) “Current Concepts of Mechanisms in Drug-Induced Hepatotoxicity”, *Current medicinal chemistry*, 16(23), pp. 3041–3053.
- Saedi, B. J., Liu, K. H., Owens, J. A., Hunter-Chang, S. *et al.* (2020) “Gut-resident lactobacilli activate hepatic Nrf2 and protect against oxidative liver injury”, *Cell metabolism*, 31(5), pp. 956-968.
- Schneider, K. M., Elfers, C., Ghallab, A., Schneider, C. V. *et al.* (2021) “Intestinal dysbiosis amplifies acetaminophen-induced acute liver injury”, *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 11(4), pp. 909-933.
- Sharma, S., Singh, R. L. y Kakkar, P. (2011) “Modulation of Bax/Bcl-2 and caspases by probiotics during acetaminophen induced apoptosis in primary hepatocytes”, *Food and chemical toxicology*, 49(4), pp. 770-779.
- Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K. *et al.* (2019) “Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures”, *Journal of AOAC international*, 102(5), pp. 1397-1400.
- Slavin, J. (2013) “Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits”, *Nutrients*, 5(4), pp. 1417-1435.
- Spor, A., Koren, O. y Ley, R. (2011) “Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome”, *Nature reviews microbiology*, 9(4), pp. 279-290.
- Sugatani, J., Sadamitsu, S., Wada, T., Yamazaki, Y. *et al.* (2012) “Effects of dietary inulin, statin, and their co-treatment on hyperlipidemia, hepatic steatosis and changes in drug-metabolizing enzymes in rats fed a high-fat and high-sucrose diet”, *Nutrition & metabolism*, 9(1), pp. 1-14.
- Sun, J., Zhao, F., Lin, B., Feng, J. *et al.* (2020) “Gut microbiota participates in antithyroid drug induced liver injury through the lipopolysaccharide related signaling pathway”, *Frontiers in pharmacology*, p. 2094.
- Teschke, R. y Uetrecht, J. (2021) “Mechanism of idiosyncratic drug induced liver injury (DILI): unresolved basic issues”, *Annals of translational medicine*, 9(8), pp. 730–730.
- Uetrecht, J. P. (1999) “New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the “danger hypothesis” and innate immune system”, *Chemical research in toxicology*, 12(5), 387-395.
- Ursell, L. K., Clemente, J. C., Rideout, J. R., Gevers, D. *et al.* (2012) “The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites”, *Journal of allergy and clinical immunology*, 129(5), pp. 1204-1208.
- Villanueva-Paz, M., Morán, L., López-Alcántara, N., Freixo, C. *et al.* (2021) “Oxidative stress in drug-induced liver injury (Dili): From mechanisms to biomarkers for use in clinical practice”, *Antioxidants*,

- 10(3), pp. 1–35.
- Virili, C., Stramazzo, I., y Centanni, M. (2021) “Gut microbiome and thyroid autoimmunity”, *Best practice & research clinical endocrinology & metabolism*, 35(3), p. 101506.
- Watkins, P. B., Kaplowitz, N., Slattery, J. T., Colonese, C. R. *et al.* (2006) “Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: a randomized controlled trial”, *Jama*, 296(1), pp. 87-93.
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G. *et al.* (2009) “Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites”, *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(10), pp. 3698-3703.
- Wilson, B. y Whelan, K. (2017) “Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders”, *Journal of gastroenterology and hepatology*, 32, pp. 64-68.
- Wong, V. W. S., Wong, G. L. H., Chim, A. M. L., Chu, W. C. W. *et al.* (2013) “Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study”, *Annals of hepatology*, 12(2), pp. 256-262.
- Wu, H., Rao, Q., Ma, G. C., Yu, X. H. *et al.* (2020) “Effect of triptolide on dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis and gut microbiota in mice”, *Frontiers pharmacology*, 10, pp. 1-13.
- Xi, C., Peng, S., Wu, Z., Zhou, Q. *et al.* (2017) “Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved”, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 90, pp. 531-541.
- Yamano, T., Tsujimoto, Y., Noda, T., Shimizu, M. *et al.* (1990) “Hepatotoxicity of geniposide in rats”, *Food and chemical toxicology*, 28(7), pp. 515-519.
- Yang, J., Sun, L., Wang, L., Hassan, H. M. *et al.* (2017) “Activation of Sirt1/FXR signaling pathway attenuates triptolide-induced hepatotoxicity in rats”, *Frontiers in pharmacology*, 8, p. 260.
- Yildirim, A., Tamer, S. A., Sahin, D., Bagriacik, F. *et al.* (2019) “The effects of antibiotics and melatonin on hepato-intestinal inflammation and gut microbial dysbiosis induced by a short-term high-fat diet consumption in rats”, *British journal of nutrition*, 122(8), pp. 841-855.
- Yip, L. Y. y Chan, E. C. Y. (2015) “Investigation of host–gut microbiota modulation of therapeutic outcome”, *Drug metabolism and disposition*, 43(10), pp. 1619-1631.
- Yip, L. Y., Aw, C. C., Lee, S. H., Hong, Y. S. *et al.* (2018) “The liver–gut microbiota axis modulates hepatotoxicity of tacrine in the rat”, *Hepatology*, 67(1), pp. 282-295.
- Yokoi, T. y Oda, S. (2021) “Models of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury”, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 61, pp. 247–268.
- Zhang, F., Luo, W., Shi, Y., Fan, Z. *et al.* (2012) “Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation?”, *The american journal of gastroenterology*, 107(11), pp. 1755-author.
- Zhang, Z., Li, M., Cui, B. y Chen, X. (2022) “Antibiotic Disruption of the Gut Microbiota Enhances the Murine Hepatic Dysfunction Associated With a High-Salt Diet”, *Frontiers in pharmacology*, 344.
- Zheng, N., Gu, Y., Hong, Y., Sheng, L. *et al.* (2020) “Vancomycin pretreatment attenuates acetaminophen-induced liver injury through 2-hydroxybutyric acid”, *Journal of pharmaceutical analysis*, 10(6), pp. 560-570.
- Zheng, X., Xie, G., Zhao, A., Zhao, L. *et al.* (2011) “The footprints of gut microbial–mammalian co-metabolism”, *Journal of proteome research*, 10(12), pp. 5512-5522.
- Zhou, Y. X., Zhang, R. Q., Rahman, K., Cao, Z. X. *et al.* (2019) “Diverse Pharmacological Activities and Potential Medicinal Benefits of Geniposide”, *Evidence-based complementary and alternative medicine*. doi: [10.1155/2019/4925682](https://doi.org/10.1155/2019/4925682)
- Zwierzyna, M. y Overington, J. P. (2017) “Classification and analysis of a large collection of in vivo bioassay descriptions”, *PLOS computational biology*, 13(7), p. e1005641.