

10. Métodos de evaluación del citocromo P-450 y de su papel en el metabolismo de fármacos

MARÍA TERESA DONATO MARTÍN
JOSÉ ENRIQUE O'CONNOR BLASCO

1. RESUMEN

El P-450, pieza clave en el metabolismo de xenobióticos, es uno de los principales responsables de la elevada variabilidad individual observada en los parámetros farmacocinéticos de los fármacos. Los pilares en los que se basa el desarrollo de nuevos fármacos son la evaluación de la actividad farmacológica, los posibles efectos tóxicos y el metabolismo de las moléculas candidatas. Las notables diferencias metabólicas existentes entre diferentes especies dificultan la extrapolación al hombre de los resultados obtenidos durante la experimentación con animales, por lo que se hace necesario el desarrollo de ensayos alternativos que posibiliten un estudio directo del metabolismo de fármacos en el hombre. Con este fin se han desarrollado modelos *in vitro* de origen humano entre los cuales los microsomas hepáticos, los hepatocitos primarios en cultivo y las líneas celulares constituyen las mejores alternativas. La caracterización metabólica de estos modelos requiere la utilización de ensayos para la evaluación de la función y la expresión del P-450 basados en la medida de actividades enzimáticas, cuantificación de proteínas y técnicas de biología molecular. En la actualidad se dispone de una amplia información sobre substratos e inhibidores se-

lectivos que permiten determinar de forma precisa la capacidad funcional de formas individuales del P-450 y, en combinación con los modelos *in vitro* más adecuados para cada caso, constituyen herramientas de gran utilidad para los estudios de metabolización de fármacos. El uso creciente por parte de la industria farmacéutica de los ensayos *in vitro* acelera considerablemente el proceso de identificación y descarte de los candidatos menos apropiados y posibilita la evaluación de un número mayor de moléculas. La estabilidad metabólica del fármaco, su perfil metabólico, los enzimas implicados, especialmente si se trata de formas polimórficas, y las posibles interacciones metabólicas son las principales áreas de interés.

2. INTRODUCCIÓN

El P-450 es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los fármacos. Su expresión está regulada por factores genéticos (algunos presentan formas polimórficas), fisiopatológicos (regulación hormonal, enfermedades) o ambientales (factores nutricionales, inducción, inhibición) que condicionan que los niveles hepáticos de los enzimas P-450 varíen extraordinariamente entre diferentes individuos (1). Esta variabilidad explica las notables diferencias que en ocasiones se observan en el metabolismo de fármacos y, en última instancia, justifica la aparición de alteraciones en la respuesta farmacológica o de diferencias individuales en la susceptibilidad a la acción de tóxicos o carcinógenos (2,3).

La respuesta farmacológica a un agente terapéutico es el resultado de su interacción con la célula diana y la subsiguiente transducción de la señal. Los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción a los que se ve sometido el fármaco regulan su concentración en el lugar de acción y, por tanto, juegan un papel determinante en su eficacia farmacológica. Un fármaco con una farmacocinética inapropiada puede originar una respuesta inadecuada o muy variable que comprometa su uso terapéutico (4). Por otro lado, un fármaco además de eficaz debe ser seguro. Durante el desarrollo de un nuevo medicamento las moléculas candidatas se seleccionan no sólo en función de su actividad farmacológica, sin también de su riesgo tóxico. La toxicidad del compuesto

dependerá de su capacidad de agresión a estructuras o procesos celulares y de los niveles intracelulares que se alcancen. De nuevo la farmacocinética del compuesto resulta clave en su efecto tóxico (5). La molécula finalmente seleccionada será aquella con un mejor balance entre el beneficio terapéutico y los posibles efectos adversos de su posterior uso clínico.

El metabolismo hepático de los fármacos tiene una notable influencia sobre su aclaramiento plasmático y es la causa más frecuente de la variabilidad individual que se observa en los parámetros farmacocinéticos (5,6). Es por tanto uno de los factores con más peso en su biodisponibilidad, su efecto farmacológico y su toxicidad. Es también una de las causas más frecuentes de incompatibilidad o de aparición de interacciones entre fármacos (7). El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo y costoso en el que se investiga si la molécula reúne los requisitos de eficacia terapéutica y seguridad exigidos por las autoridades sanitarias para su comercialización y administración al ser humano. Dada su trascendencia clínica, hoy en día las etapas iniciales del desarrollo de nuevos fármacos también incluyen una caracterización metabólica del compuesto (8). Si bien la respuesta farmacológica a un compuesto es, en gran medida, similar en el hombre y en los animales de experimentación, no ocurre así con su metabolismo, por lo que en ocasiones la extrapolación entre especies no es posible o presenta grandes dificultades (9).

El objetivo final es adquirir un conocimiento profundo del metabolismo de los fármacos en el hombre que permita mejorar su diseño y aumentar su seguridad. Dado que el P-450 es el elemento clave en el metabolismo de fármacos, los avances metodológicos que han permitido ampliar los conocimientos bioquímicos sobre este sistema enzimático han posibilitado de forma paralela el desarrollo de mejores estrategias para el estudio del metabolismo de fármacos. En el presente capítulo se recogen los principios metodológicos en los que se basa el estudio del P-450, con una atención particular a la experimentación *in vitro*. Los ensayos *in vitro* ofrecen al investigador la posibilidad de examinar de forma controlada y de reproducir en un modelo simplificado las situaciones que tendrán lugar en el organismo humano. Hoy por hoy constituyen la única herramienta disponible para predecir el metabolismo de nuevas moléculas durante las fases preclínicas de su desarrollo (8).

3. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DEL P-450

Desde el descubrimiento del P-450 el interés de la comunidad científica por ampliar los conocimientos sobre esta superfamilia de proteínas ha sido una constante. La identificación de sus múltiples isoenzimas, el estudio de sus características catalíticas, su papel en el metabolismo de fármacos, tóxicos y compuestos endógenos, la regulación de su expresión tanto constitutiva como inducida, o su inhibición por diferentes agentes son probablemente los aspectos que han concentrado un mayor esfuerzo. El elevado grado de conocimiento sobre el P-450 alcanzado en la actualidad se ha adquirido fundamentalmente en la última década. A ello han contribuido, por un lado el desarrollo y aplicación de las técnicas de biología molecular y por otro lado, el interés despertado en la industria farmacéutica. Desde el momento en que el sector farmacéutico se convenció del papel clave del P-450 sobre el metabolismo de los fármacos y, como consecuencia de ello, su influencia sobre los niveles plasmáticos y sus repercusiones sobre la respuesta terapéutica, los efectos tóxicos y las posibles interacciones con otros fármacos, su apoyo a las investigaciones realizadas en este campo ha ido creciendo.

Una pieza clave en estos estudios es, sin lugar a dudas, la adecuada elección del modelo biológico. Tal y como ocurre en otros campos de la ciencia, los primeros conocimientos se obtuvieron a partir de investigaciones realizadas en animales de experimentación. Pronto surgieron evidencias de la existencia de notables diferencias cuantitativas y cualitativas en el metabolismo de fármaco en el hombre y en otras especies. Estas diferencias son debidas a que cada especie presenta su propio patrón de enzimas de biotransformación (10). En el caso del P-450, no sólo la distribución de isoenzimas es diferente, sino que, además, existen P-450s que son propios de una especie en particular, e incluso formas homólogas pertenecientes a diferentes especies que presentan distinta actividad catalítica (11,12). De hecho las diferencias metabólicas entre el ser humano y la especie animal escogida para realizar los ensayos preclínicos son algunas de las causas más frecuentes del fracaso de nuevos fármacos (9). Habida cuenta de estas diferencias interespecies, y dado que el objetivo básico es el diseño de agentes terapéuticos seguros para su aplicación clínica, los estudios de metabolismo de fármacos deberían realizar-

se en la especie humana. Por razones obvias no es posible realizarlos con seres humanos, por lo que la disponibilidad de un modelo experimental alternativo resulta esencial.

En principio, los modelos hepáticos son los mejores candidatos al ser el hígado el órgano con mayor expresión de enzimas P-450 y, por tanto, con mayor capacidad biotransformadora. Un amplio abanico de modelos *in vitro* de origen hepático con distinto grado de complejidad que incluyen tanto sistemas subcelulares (enzimas purificados, fracciones celulares, homogenizados crudos), como celulares (hepatocitos en suspensión o cultivo primario, hepatomas, células transformadas) o tisulares (*slices*, lóbulo o hígado perfundido) ha sido desarrollados y utilizados. Cada uno de estos modelos presenta ventajas y desventajas frente a los demás y la mayor o menor frecuencia de aplicación depende de la relevancia de la información que proporcionan y de las limitaciones en su uso (disponibilidad del modelo, complejidad del sistema, requerimientos experimentales) (13,14). Entre ellos, los microsomas de hígado, los hepatocitos en cultivo y las líneas celulares son los más utilizados (Figura 1).

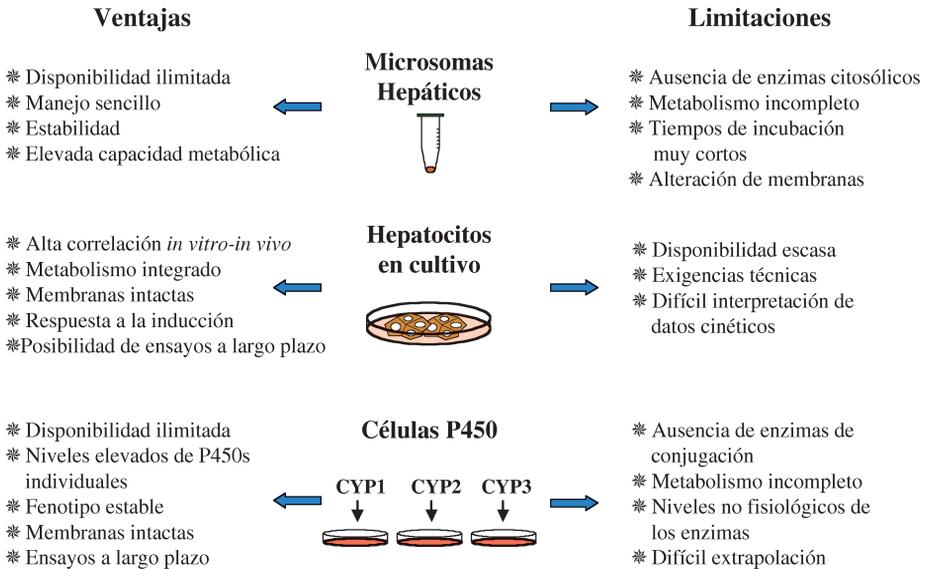


FIGURA 1. Características de los principales modelos experimentales utilizados en el estudio del citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos

3.1. Microsomas hepáticos

Uno de los modelos más ampliamente utilizados son los microsomas hepáticos. Se trata de un sistema subcelular obtenido mediante la centrifugación ($100.000 \times g$) de homogenados de hígado, lo que permite una purificación parcial de las membranas del retículo endoplásmico liso a las que se encuentran unidos el P-450 y otras enzimas (11). Entre sus ventajas se incluyen: 1) la facilidad de preparación (básicamente sólo se requiere disponer de una ultracentrífuga); 2) su elevada accesibilidad (si no se dispone de tejido hepático para su obtención se pueden adquirir preparados a través de diferentes fuentes comerciales); 3) su estabilidad (pueden conservarse a -80°C durante al menos dos años sin pérdidas significativas de actividad); 4) la sencillez en su manejo (no se requieren equipamientos adicionales); y 5) su elevada actividad biotransformadora (todos los P-450s hepáticos de metabolización de xenobióticos y algunos enzimas de conjugación están presentes). Todas estas características convierten a este modelo biológico en el más popular para estudios de metabolismo (11,14).

La utilización de microsomas preparados a partir de un *pool* de hígados permite obtener una visión general del metabolismo del fármaco independientemente de factores individuales (edad, sexo, raza, factores dietéticos, ambientales, patológicos, hormonales, etc.) que pudieran influir en la capacidad metabólica. Del mismo modo, la opción de disponer de varios lotes de microsomas perfectamente caracterizados y obtenidos cada uno de ellos a partir de un único hígado, permite el estudio de la influencia de ciertos factores de especial interés (p.e. polimorfismos genéticos). Las posibilidades que ofrece este modelo *in vitro* se han visto aumentadas considerablemente al extenderse el uso de los microsomas obtenidos a partir de células manipuladas para la expresión de un único P-450 (p.e. *Supersomes*®, 15). La principal limitación de los microsomas es que únicamente contienen enzimas unidos a membrana (fundamentalmente P-450) y no otras actividades de metabolización de fármacos (p.e. enzimas citosólicos de conjugación). Por tanto, este modelo experimental sólo puede ofrecer una reproducción parcial del metabolismo de fármacos que tiene lugar en el hígado. Además, al tratarse de un modelo subcelular, no permite realizar estudios que requieran el concurso coordinado de diferentes elementos o compartimentos celulares (p.e. inducción, transporte intracelular).

3.2. Hepatocitos primarios

Las limitaciones derivadas del uso de fracciones subcelulares se subsanan mediante los modelos experimentales constituidos por células enteras. Los hepatocitos, las células del parénquima hepático que realizan la mayor parte de las funciones diferenciadas propias del hígado, y entre ellas la biotransformación de xenobióticos, son las células de elección. Se obtienen mediante perfusión con colagenasa de muestras de tejido hepático (biopsias quirúrgicas, hepatectomías, tejido descartado para trasplante) (16). Tras el aislamiento, la suspensión de hepatocitos obtenida puede incubarse directamente con los fármacos cuyo metabolismo se desea estudiar. No obstante, las células sólo permanecen viables durante un corto periodo de tiempo, por lo que las incubaciones no pueden prolongarse más de unos 90 minutos, lo que limita considerablemente las posibilidades de uso de este sistema celular.

La viabilidad se alarga de forma notable cuando los hepatocitos se adhieren a un soporte de cultivo adecuado y se incuban en un medio que incluya todos los nutrientes y factores necesarios para su supervivencia (13,16). Los hepatocitos en cultivo disponen de tiempo suficiente para reparar las posibles lesiones sufridas durante su aislamiento. Durante las primeras horas de cultivo se observa una disminución gradual de los niveles y de la actividad de los enzimas P-450s, probablemente como consecuencia de la adaptación de las células a su nuevo entorno (17,18), pero posteriormente adquieren cierta estabilidad funcional durante varios días, e incluso semanas dependiendo de las condiciones de cultivo (13,19,20). La incubación de los hepatocitos en presencia del fármaco puede prolongarse durante varias horas e incluso días, lo que permite analizar compuestos que se metabolizan muy lentamente o realizar estudios de inducción. Esta posibilidad contrasta con las incubaciones con microsomas que por razones de estabilidad se limitan a una hora como máximo.

Al tratarse de células intactas, la integridad de las membranas se conserva, todos los sistemas enzimáticos están integrados y trabajan coordinadamente y los niveles fisiológicos de los cofactores y de coenzimas necesarios están garantizados. Además, se conservan los mecanismos de expresión génica y síntesis de proteínas lo que permite realizar estudios de regulación y de inducción. Por todo ello, el cultivo primario de hepatocitos se considera el modelo *in vitro* más aproximado al hígado (21,22).

Sin embargo no está exento de limitaciones. Los hepatocitos no proliferan en cultivo, por lo que cada experimento implica el aislamiento de una nueva preparación celular a partir de hígado fresco. Si consideramos además que la accesibilidad a tejido hepático de origen humano con fines experimentales es escasa, irregular e impredecible y está restringida por diversas consideraciones de tipo ético y legal, se comprende fácilmente que la principal limitación de este modelo es su reducida disponibilidad. Una posible alternativa para aliviar esta situación y extender el uso de hepatocitos humanos en cultivo primario es la criopreservación de las células una vez aisladas. El objetivo es rentabilizar al máximo la disponibilidad de muestras de hígado humano, al no ser necesario llevar a cabo los experimentos de forma inmediata al aislamiento celular, y posibilitando además su uso por parte de laboratorios diferentes a aquellos donde se realiza el proceso de aislamiento. Se han propuesto diferentes protocolos de criopreservación que, no obstante, aún deben ser convenientemente optimizados (22-24).

3.3. Líneas celulares

El uso de líneas celulares de origen hepático se ha propuesto como una alternativa al cultivo primario. Estas líneas celulares, fundamentalmente obtenidas a partir de hepatomas, tienen capacidad de proliferación en cultivo, mantienen un fenotipo estable y pueden sufrir procesos de congelación y descongelación sin pérdida de viabilidad o funcionalidad. Se trata por tanto de un modelo experimental de uso ilimitado, disponible en cualquier momento y fácil de conseguir. Desafortunadamente, todas las células de estas características descritas hasta el momento presentan una capacidad metabólica muy limitada en comparación con la de los hepatocitos. Expresan niveles aceptables de actividad NADPDH-citocromo P-450 reductasa y de algunos enzimas de conjugación, pero su capacidad oxidativa se ve restringida a la del CYP1A1, ya que la actividad del resto de enzimas P-450 es prácticamente indetectable (12,18,25). Por tanto, su uso en estudios de biotransformación presenta serias limitaciones y no constituye una buena alternativa al cultivo primario.

En vista de las notables limitaciones que presentan las líneas celulares derivadas de tejido hepático, en los últimos años se está invirtiendo un gran

esfuerzo es el desarrollo de modelos celulares que constituyan una seria alternativa a los hepatocitos primarios. Con este fin se han explorado diferentes aproximaciones experimentales en las que las técnicas de manipulación genética han jugado un papel crucial. Una de las opciones abordadas es la inmortalización de hepatocitos mediante su transfección con el antígeno SV40 LT o con ciertos oncogenes, o mediante la generación de líneas celulares a partir de animales transgénicos que expresan genes virales o factores de crecimiento (26-28). Por el momento ninguno de estos procedimientos de inmortalización ha proporcionado resultados satisfactorios al obtenerse células con baja expresión de enzimas de biotransformación y con cierta inestabilidad fenotípica. Otras alternativas basadas en técnicas de manipulación genética han permitido obtener células que expresan de forma constitutiva, permanente y estable un único isoenzima P-450. Para ello, líneas celulares de diferentes orígenes (hepáticas o no, humanas o de otras especies) son transfectadas mediante vectores adecuados con el cDNA que codifica el P-450 de interés (29-33) Este procedimiento permite generar líneas celulares individualizadas para cada P-450 muy útiles para identificar los enzimas responsables del metabolismo de un fármaco. La principal limitación de estas líneas celulares es que la manipulación conduce a la expresión, con frecuencia excesiva, de un enzima en particular, al tiempo que no se expresan niveles detectables del resto de P-450s (34). El objetivo final es lograr células que reproduzcan con gran aproximación el patrón de P-450s propios del hígado humano. Para ello los esfuerzos futuros en este sentido se encaminan hacia el desarrollo de modelos manipulados genéticamente que permitan la coexpresión controlada de varios isoenzimas.

4. HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN Y LA EXPRESIÓN DEL P-450

En paralelo al desarrollo de modelos biológicos para el estudio del P-450, el grado de conocimiento sobre este sistema enzimático ha ido creciendo de forma incansable alcanzando un ritmo vertiginoso en los últimos años. Desde un primer momento la comunidad científica se sintió fascinada por estos enzimas de características excepcionales. La amplia versatilidad de los P-450s, capaces de metabolizar innumerables sustratos y de catalizar una amplia variedad de transformaciones diferentes, los

convierte en proteínas singulares no comparables con ningún otro enzima. Es por ello que el estudio de su actividad se ha centrado no sólo en el esclarecimiento del ciclo catalítico o de los mecanismos de regulación de la actividad, sino también en conocer las claves de su variabilidad. El impulso definitivo ha sido proporcionado por las técnicas moleculares cuyo desarrollo y aplicación han sido determinantes para la adquisición de nueva información relacionada con la estructura, diversidad, origen, expresión, regulación o inducción de los P-450s.

4.1. Medida espectrofotométrica del P-450

Todos los P-450 son hemoproteínas que presentan una absorbancia a 450 nm cuando en estado reducido se unen al monóxido de carbono. Este máximo de absorbancia se conoce como pico de Soret y no aparece en la forma oxidada del P-450. Se debe a la formación de un complejo entre el átomo de hierro del grupo hemo del enzima y el monóxido de carbono (unión Fe^{2+} -CO). El grupo tiol de un residuo de cisteína ligado al átomo de hierro es el responsable de este pico de Soret en los P-450. En el resto de hemoproteínas, en las que la histidina y no la cisteína actúa como ligando, el máximo de absorbancia aparece a 420 nm. Esta propiedad de los P-450s es utilizada para su cuantificación espectrofotométrica según un método descrito por Omura y Sato en 1964 (35). Consiste en el tratamiento reductor del enzima con ditionita para la conversión del hierro del estado férrico al ferroso y el gaseo posterior con monóxido de carbono. La formación del complejo es inmediata y es independiente del isoenzima(s) del P-450 presente en la muestra. Se trata de un método sencillo de estimar el contenido total de P-450 en las muestras biológicas, el cual se puede utilizar para referir los valores de actividad.

4.2. Substratos

Los P-450s que participan en el metabolismo de substratos endógenos presentan una alta especificidad de substrato y, en general, catalizan una sola reacción. Por el contrario, los P-450 de metabolización de xenobióticos (pertenecientes a las familias 1 a 3), son capaces de metabo-

TABLA 1
*Características generales de los sustratos selectivos
 de los principales P-450s*

<i>Isoenzima</i>	<i>Características químicas</i>
CYP1A2	<ul style="list-style-type: none"> • Moléculas planas neutras o básicas y lipofílicas • Al menos un sitio dador de átomos de hidrógeno
CYP2C9	<ul style="list-style-type: none"> • Moléculas neutras o ácidas y anfipáticas o lipofílicas • Un sitio de oxidación situado a 5-8 Å de un heteroátomo dador de un enlace de hidrógeno
CYP2D6	<ul style="list-style-type: none"> • Arilaminas (básicas) y moléculas lipofílicas (forma neutra) • Un lugar de oxidación cercano a un nitrógeno protonado
CYP2E1	<ul style="list-style-type: none"> • Moléculas pequeñas (<200 D) lipofílicas lineales o cíclicas
CYP3A4	<ul style="list-style-type: none"> • Moléculas neutras o básicas y lipofílicas • Un sitio de oxidación de nitrógeno (N-desalquilación) o posiciones alélicas

lizar un gran número de sustratos con estructuras moleculares diferentes. Cada isoenzima presenta su propia especificidad de sustrato. El análisis de la estructura química y de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos metabolizados por cada enzima P-450 ha permitido establecer ciertas reglas al respecto (Tabla 1, 36,37).

A pesar de que cada P-450 presenta su propia especificidad de sustrato, un xenobiótico puede ser sustrato de diferentes isoenzimas del P-450, que lo pueden convertir en el mismo metabolito en todos los casos o en metabolitos diferentes. Este solapamiento funcional permite que en el supuesto de que el P-450 que cataliza una reacción en particular esté inhibido o inactivado, otros isoenzimas puedan substituirle. Se trata indudablemente de un sistema de seguridad para garantizar la neutralización y eliminación de todo xenobiótico que acceda al organismo. En definitiva, los xenobióticos tienden a ser biotransformados por varios P-450s y son pocos los metabolizados por un único enzima.

En los últimos años se ha profundizado en la búsqueda de moléculas que sean metabolizadas exclusivamente por un P-450. El objetivo es disponer de una serie de sustratos cuya oxidación se pueda identificar con la actividad

de un P-450 en particular. En relación con el P-450 nunca se puede hablar de especificidad de forma absoluta. El término selectividad es probablemente más apropiado. Partiendo de estas premisas, se dispone en la actualidad de sustratos y reacciones que podemos utilizar como herramientas de medida de la actividad de los principales P-450s hepáticos responsables del metabolismo de fármacos en el hombre (Tabla 2). Se trata de una información muy útil que, como se verá más adelante permite, por ejemplo, reconocer el efecto inhibitor de un fármaco sobre la actividad de ciertos P-450s.

TABLA 2

Substratos selectivos para la determinación in vitro de la actividad de isoenzimas P-450^{12,34,38,39}

CYP	Substrato	Reacción	Técnica	
1A2	7-Metoxiresorufina	O-Desmetilación	Fluorimetría	
	Cafeína	N-Desmetilación	HPLC	
	Fenacetina	O-Desetilación	HPLC	
2A6	Cumarina	7-Hidroxilación	Fluorimetría	
2B6	Bupropion	Hidroxilación	HPLC	
2C8	Paclitaxel (Taxol)	6 α -Hidroxylición	HPLC	
2C9	Tolbutamida	Metil-hidroxilación	HPLC	
	Fenitoína	4'-Hidroxilación	HPLC	
	Diclofenac	4'-Hidroxilación	HPLC	
	S-Warfarin	7-hHidroxilación	HPLC	
	Naproxeno	O-Desmetilación	HPLC	
	2C19	S-Mefenitoína	4'-Hidroxilación	HPLC
	2D6	Debrisoquina	4-Hidroxilación	HPLC
Bufuralol		1-Hidroxilación	HPLC	
Dextrometorfano		O-Desmetilación	HPLC	
Desipramina		2-Hidroxilación	HPLC	
Nortriptilina E		10-Hidroxilación	HPLC	
2E1		Clorzoxazona	6-Hidroxilación	HPLC
	4-Nitrofenol	3-Hidroxilación	Espectrofotometría	
	N-Nitrosodimetilamina	N-Desmetilación	Espectrofotometría	
	Anilina	4-Hidroxilación	Espectrofotometría	
3A4	Nifedipina	Oxidación	HPLC	
	Eritromicina	N-Demethylation	Espectrofotometría	
	Testosterona	6 β -Hidroxilación	HPLC	
	Midazolam	1-Hidroxilación	HPLC	
	Triazolam	1-Hidroxilación	HPLC	

En determinadas situaciones en las que no es esencial el uso de sustratos específicos se puede optar por otras alternativas que aporten ventajas de tipo técnico. Tal es el caso de los sustratos cuya oxidación se puede cuantificar por medida de la fluorescencia emitida por el metabolito. Se trata de ensayos muy rápidos, sencillos y sensibles (Tabla 3). Por regla general estos sustratos son metabolizados por más de un enzima y no son adecuados para ensayos en los que participa más de un P-450 (p. e. microsomas hepáticos, hepatocitos). Sin embargo, resultan de gran utilidad en los estudios con los modelos experimentales que contienen un único P-450.

TABLA 3
*Substratos para la medida de actividades P-450 mediante técnicas de fluorescencia*⁴⁰⁻⁴⁵

<i>CYP</i>	<i>Substrato</i>	<i>Metabolito</i>
1A2	CEC	CHC
	BFC	HFC
	7-Etoxioresorufina	Resorufina
2A6	7-Metoxioresorufina	Resorufina
	Cumarina	7-Hidroxycumarina
2B6	EFC	HFC
	Benzoxioresorufina	Resorufina
2C8	Dibencilfluoresceína	Fluoresceína
2C9	Dibencilfluoresceína	Fluoresceína
	MFC	HFC
	Dibencilfluoresceína	Fluoresceína
2C19	3-O-Metilfluoresceína	Fluoresceína
	CEC	CHC
	AMMC	AHMC
2D6	MAMC	HAMC
	CEC	CHC
CYP2E1	MFC	HFC
	7-Etoxicumarina	7-Hidroxycumarina
CYP3A4	7-Benciloxiquinolina	Quinolinol
	BFC	HFC
	DFB	DHB
	Benzoxioresorufina	Resorufina
	Dibencilfluoresceína	Fluoresceína

CEC: 3-Ciano-7-etoxicumarina; CHC: 3-Ciano-7-hidroxycumarina; BFC: 7-benciloxi-4-trifluorometilcumarina; HFC: 7-hidroxi-4-trifluorometilcumarina; EFC: 7-Etoxi-4-trifluorometilcumarina; MFC: 7-metoxi-4-trifluorometilcumarina; AMMC: 3-(2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil(-7-metoxi-4-metilcumarin); AHMC: 3-(2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil(-7-hidroxi-4-metilcumarin); MAMC: 7-metoxi-4-(aminometil)-cumarina; HAMC: 7-hidroxi-4-(aminometil)-cumarina DFB: (3,4-difluorobenziloxi)-5,5-dimetil-4-(4-metilsulfonilfenil)-5H-furan-2-ona; DHB: 3-hidroxi-5,5-dimetil-4-(4-metilsulfonilfenil)-5H-furan-2-ona.

La expresión hepática de los diferentes P-450 está sujeta a múltiples factores genéticos y ambientales que conducen a notables diferencias en el patrón enzimático de diferentes individuos y, por consiguiente, a una capacidad metabólica individualizada. La existencia de formas polimórficas de algunos P-450s y los fenómenos de inducción o inhibición por xenobióticos son los principales responsables, pero no los únicos, de esta variabilidad funcional. Como consecuencias inmediatas de la misma pueden aparecer respuestas farmacológicas no esperadas o efectos tóxicos. Un metabolismo anormalmente rápido o lento del fármaco puede resultar en ineficacia terapéutica o una respuesta exagerada. La aparición de metabolitos no habituales puede producir reacciones adversas, interacciones medicamentosas o efectos tóxicos no conocidos. Esta biotransformación anormal puede tener lugar en sujetos en los que el P-450 responsable del metabolismo del fármaco se expresa como una forma polimórfica no funcional o está inhibido, por lo que el compuesto sufre una oxidación alternativa por un isoenzima diferente.

La disponibilidad de compuestos que puedan ser administrados a un individuo y cuyo metabolismo pueda ser utilizado como parámetro indicador de la actividad de un único P-450 resulta una herramienta de gran valor para “fenotipar metabólicamente” al sujeto o detectar posibles situaciones de inhibición enzimática o de inducción (46). Para que un sustrato pueda ser utilizado con este propósito, además de ser específico debe cumplir otros requisitos que permitan su administración a seres humanos. La molécula ideal ha de ser segura (sin efectos tóxicos colaterales), de fácil adquisición, con una farmacocinética dependiente de su metabolismo hepático, que no se una a proteínas y cuyo metabolito sea fácilmente cuantificable en fluidos biológicos (47). Por razones de seguridad la mayor parte de los compuestos propuestos son fármacos y también se incluyen algunos metabolitos formados durante la oxidación de compuestos endógenos (Tabla 4).

Los denominados sustratos multienzimáticos son aquellos sobre los que actúan más de un P-450 catalizando cada uno de ellos una reacción diferente. Estos compuestos resultan muy útiles para la cuantificación simultánea de la actividad de varios P-450s, ya que cada metabolito formado se identifica de forma específica con la actividad de un isoenzima. La testosterona, progesterona y warfarina son hidroxilados de forma estereo- y regio-selectiva por diferentes P-450s, constituyendo buenos ejemplos de sustratos multienzimáticos (48-50).

TABLA 4
Substratos e inhibidores para la caracterización in vivo de la actividad de los P-450s^{1,2,46,47}

<i>CYP</i>	<i>Substrato</i>	<i>Reacción</i>	<i>Método de análisis</i>	<i>Otros substratos</i>	<i>Inhibidores</i>
1A2	Cafeína	N-Desmetilación	Orina, test respiratorio	Teofilina	Furafilina Fluvoxamina
2A6	Cumarina	7-Hidroxilación	Orina	Fenacetina ^s	Metoxalen Tranilcipromine
2B6	Bupropion	Hidroxilación	Orina		
2C9	Tolbutamida	Metilhidroxilación	Orina	Naproxeno	Sulfafenazol
	Diclofenac	4'-hidroxilación	Orina, sangre	Ibuprofeno	
	Fenitoína	4'-hidroxilación	Sangre	Diazepam	
2C19	S-Mefenitoína	4'-hidroxilación	Orina	Imipramina	
				Omeprazol	
2D6	Debrisoquina	4-hidroxilación	Orina	Codeína	Quinidina
	Dexatrometorfano	O-Desmetilación	Orina		
2E1	Clorzoxazona	6-Hidroxilación	Orina, sangre		Disulfiram
3A4	Midazolam	1'-Hidroxilación	Orina, sangre	Alfentanil	Ketokonazol
	Eritromicina	N-Desmetilación	Test respiratorio	Lidocaine	Itraconazol
	Nifedipina	Oxidación	Sangre	Triazolam	
	6β-hidroxicortisol	Metabolito endógeno	Sangre		

Otra estrategia para valorar de forma global la capacidad funcional de diferentes P-450s *in vivo* e *in vitro* es la combinación de varios substratos, cada uno de ellos específico para un P-450 particular (12,51-55). Este “cóctel de substratos” permite analizar simultáneamente la actividad de varios P-450s con el consiguiente ahorro de tiempo, volumen de muestras y molestias al paciente, en el supuesto de que se trate de un ensayo *in vivo*. La principal dificultad de estos ensayos es de tipo analítico, al requerirse técnicas de identificación muy sensibles y específicas.

4.3. Ensayos de actividad

Los P-450s son proteínas de membrana que catalizan fundamentalmente reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis. La oxidación del sustrato puede tener lugar a través de diferentes reacciones entre las que se incluyen hidroxilaciones aromáticas o alifáticas, O-, N- y S-desalquilaciones, desaminaciones, N- y S-oxidaciones o epoxidaciones. Se trata de reacciones de monooxigenación en las que un átomo del oxígeno molecular es incorporado en la molécula del sustrato y el otro es reducido hasta agua. Para poder realizar su función catalítica, el P-450 necesita el concurso del enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa (56). Es una flavoproteína, también localizada en las membranas del retículo endoplásmico, que se encarga de transferir los electrones necesarios para la reacción desde el NADPH hasta el centro catalítico del P-450 (en el capítulo 1 se recogen los detalles del ciclo catalítico). A diferencia del P-450, se trata de una única forma enzimática que es capaz de colaborar con todos los P-450s.

Para la medida de la actividad del P-450 es imprescindible asegurarse que la reductasa está presente y es activa. En principio los microsomas hepáticos y los hepatocitos contienen niveles adecuados de esta actividad y no es necesario tomar precauciones en este sentido (16,57). Los ensayos con líneas celulares manipuladas genéticamente para la expresión de enzimas P-450s requieren mayor cautela. En estas células, especialmente si se trata de sistemas de expresión heteróloga, la concentración relativa del enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa y del P-450 puede diferir de la correspondiente al hígado o los hepatocitos humanos. Estas diferencias pueden afectar notablemente a la

actividad enzimática del P-450 y pueden conducir a interpretaciones erróneas de los resultados (34,58). La medida directa de la reducción del P-450 entraña dificultades importantes, por lo que habitualmente se opta por un método alternativo que emplea citocromo c exógeno como aceptor de electrones (59). Se trata de una técnica muy sencilla basada en el máximo de absorbancia a 550 nm característico de la forma reducida del citocromo c (Fe^{2+}).

A la hora de realizar el ensayo de la actividad con fracciones subcelulares (p.e. microsomas), además del sustrato adecuado es necesario aportar NADPH o un sistema regenerante del mismo que garantice una concentración suficiente durante toda la reacción. Los sistemas de regeneración de NADPH más comúnmente utilizados están basados en las reacciones catalizadas por las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o isocitrato deshidrogenasa (57,60). De forma habitual el sustrato se incuba con la proteína microsomal (0.5-1 mg/ml) en un baño a 37° C y en agitación durante 5-20 minutos (excepcionalmente hasta 1 hora). Tras parar la reacción (por precipitación de proteína o congelación rápida en nitrógeno líquido), se procede a la cuantificación de los metabolitos formados.

Cuando los ensayos de la actividad se realizan directamente con células, éstas utilizan su propio NADPH, por lo que no se requiere el aporte exógeno del cofactor. Las monocapas celulares se incuban con medio de cultivo que contiene el sustrato y como precaución previa se debe comprobar que la concentración del sustrato no resulta citotóxica. En función de la información que se desee obtener se seleccionará el sustrato más adecuado. En la actualidad se dispone de una batería de ensayos selectivos para los principales P-450 de metabolismo de fármacos. La sensibilidad de algunos de estos ensayos permiten incluso la medida de actividad en células cultivadas en placas de 96 pocillos (61-64). El tiempo de incubación es muy variable y, dependiendo de la velocidad a la que se metaboliza el sustrato, puede prolongarse desde 30 minutos hasta 24 horas, por lo que este sistema es apto para sustratos que se metabolizan muy lentamente. Al tratarse de células enteras, todos los sistemas enzimáticos permanecen intactos y se conservan niveles fisiológicos de los sustratos y cofactores endógenos. Por tanto, los metabolitos formados como consecuencia de la

oxidación por el P-450 pueden a su vez ser utilizados como sustratos por las enzimas de fase 2, formándose los correspondientes conjugados. Como paso previo al análisis, es necesario hidrolizar los posibles conjugados formados. Un procedimiento habitual es la incubación de las muestras con β -glucuronidasa y arilsulfatasa (2-4 horas, 37°C, pH 4.5) (61).

4.4. Inhibidores

Son numerosos los ejemplos de xenobióticos considerados como inhibidores del P-450. Algunos de ellos son moléculas que tras unirse al centro catalítico del enzima son oxidadas a muy baja velocidad, imposibilitando la unión de otro sustrato. Se trata de una inhibición competitiva reversible. Otros compuestos son convertidos por el P-450 en metabolitos reactivos que se unen irreversiblemente al propio enzima bloqueando su actividad (sustratos suicidas) (38,47,65,66).

La mayor parte de los inhibidores son poco específicos al ser capaces de actuar sobre varios P-450s. Los inhibidores más útiles desde el punto de vista experimental son los que se utilizan para inhibir un único P-450 (Tabla 5). Al igual que ocurre con los sustratos, es más conveniente hablar de selectividad y siempre en términos relativos. De hecho algunos inhibidores que se consideran como específicos/selectivos para un P-450 también pueden actuar sobre otros isoenzimas, aunque esto ocurra a concentraciones muy elevadas (38). La clave es utilizar concentraciones del compuesto que sólo inhiban el P-450 de interés. Estas precauciones no son necesarias en modelos experimentales que sólo expresan un isoenzima activo.

Los inhibidores selectivos constituyen una herramienta muy útil para la identificación de los P-450s implicados en el metabolismo de un fármaco. En un principio se aplicaron a ensayos realizados con microsomas, pero su uso se ha extendido también a las células en cultivo (67,68). En los modelos celulares el efecto del inhibidor sobre la actividad no depende únicamente de su acción directa sobre el enzima, sino también de factores derivados de la captación del compuesto por parte de las células, de su transporte intracelular y de su accesibilidad al compartimento celular donde se encuentra localizado el enzima.

TABLA 5
Inhibidores selectivos de las enzimas P-450s

<i>CYP</i>	<i>Inhibidor</i> ^{15,38,65}	<i>Inhibición</i>
1A2	Furafilina	Irreversible ^b
	7,8-Benzoflavona	Competitiva
	Fluvoxamina	Competitiva
2A6	Metoxalen	Irreversible
	Triptamina	Competitiva
	Tranilcipromina	Competitiva
2C8	Quercetina	Competitiva
2C9	Sulfafenazol	Competitiva
	Ácido tienflico	Irreversible
2C19	Tranilcipromina ^a	Competitiva
2D6	Quinidina	Competitiva
2E1	Dietilditiocarbamato	Irreversible
	4-Metilpirazol	Competitiva
	Disulfiram	Irreversible
3A4	Troleandromicina	Complejo inactivo ^c
	Eritromicina	Complejo inactivo
	Ketoconazol	Competitiva
	Getodene	Irreversible

(a) También inhibe el CYP2A6.

(b) El compuesto es oxidado por el P450 para formar un intermediario reactivo que produce una inactivación irreversible del enzima (substrato suicida).

(c) La activación metabólica por el P450 genera un metabolito que forma un complejo estable e inactivo con el grupo hemo del propio P450. Esta inactivación funcional del enzima puede ser reversible.

4.5. Anticuerpos. Ensayos de proteína

Los anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen los P-450s son de gran utilidad práctica para la identificación cuantitativa o semicuantitativa de cada isoenzima. Estos anticuerpos se generan fácilmente mediante inmunización con la proteína purificada a partir de tejido hepático o de sistemas heterólogos de expresión del P-450, o a partir de péptidos sintéticos (69,70). En la actualidad existe una amplia oferta comercial de anticuerpos obtenidos frente a diferentes P-450s humanos y de otras especies animales. Mediante la aplicación de técnicas adecuadas (p. e. *Western-blot*) es posible identificar la presencia de diferentes P-450

en las muestras biológicas, cuantificar sus niveles y observar posibles cambios en el contenido de proteína en respuesta a determinados factores o inductores (70). No obstante, las técnicas basadas en la identificación de proteínas no son lo suficientemente sensibles para poder ser aplicadas cuando la muestra disponible es escasa (p.e. hepatocitos en cultivo) o cuando el contenido en P-450 es muy reducido (p.e. expresión constitutiva de isoenzimas minoritarios). Por otro lado, los niveles de proteína no siempre son indicativos de la capacidad metabólica. La síntesis de formas no funcionales de la proteína por defectos en la incorporación del grupo hemo o situaciones de inhibición enzimática son algunos ejemplos. En última instancia, si lo que se pretende es conocer el metabolismo de un determinado fármaco, los factores que influyen en el mismo y sus posibles interacciones metabólicas, los estudios basados en la medida de la actividad resultan imprescindibles, mientras que la información adicional proporcionada por los ensayos de cuantificación de proteínas puede resultar irrelevante.

Los anticuerpos con capacidad inhibitoria han sido muy utilizados como herramientas de identificación de los P-450s implicados en el metabolismo de un compuesto en particular (69,71-73). El uso combinado de anticuerpos y microsomas hepáticos permite demostrar la participación relativa de varios P-450s en el metabolismo. No obstante, es difícil disponer de anticuerpos apropiados para los ensayos de inhibición, ya que no todos los anticuerpos que reconocen al enzima son capaces de bloquear su actividad metabólica. Esta escasa disponibilidad, junto con el aumento de la oferta de modelos manipulados genéticamente para la expresión individualizada de P-450s, ha reducido la aplicación de antisueños para estos estudios.

4.6. Cuantificación basada en técnicas de biología molecular

La caracterización del sistema P-450 mediante el empleo de las herramientas que se han comentado hasta el momento no es sencilla. No siempre es posible disponer de sustratos, inhibidores o anticuerpos lo suficientemente específicos/selectivos para garantizar el estudio de un isoenzima del P-450 en concreto. Por otro lado, la cantidad de material biológico de origen humano disponible para los ensayos es, con frecuencia,

insuficiente para realizar medidas de actividad enzimática o de niveles de proteína. Estas limitaciones pueden superarse con facilidad con el uso de las técnicas moleculares de amplificación. Estos procedimientos permiten cuantificar con gran especificidad, sensibilidad y rapidez cantidades reducidas de mRNA o DNA que difícilmente podrían ser detectados mediante otros métodos analíticos.

El análisis de DNA permite la identificación de polimorfismos genéticos. Para ello se recurre al uso combinado de técnicas de amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de un fragmento de DNA genómico que contiene la secuencia polimórfica y el posterior análisis del fragmento amplificado con enzimas de restricción (RFLP, polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) o técnicas alternativas (3,74,75). Los recientes avances tecnológicos en el desarrollo de *chips* de DNA también se han sido aplicados con esta finalidad (75). Estos métodos de genotipación pueden predecir con gran fiabilidad la existencia de fenotipos metabólicos de interés clínico que pueden conducir a variaciones en la respuesta farmacológica o la susceptibilidad a agentes tóxicos o carcinogénicos (3).

Estas técnicas también se pueden aplicar al análisis de mRNA de los diferentes P-450s. Tras la extracción del mRNA celular y la obtención mediante transcripción reversa de los cDNAs, se amplifica de forma selectiva el cDNA correspondiente al P-450 de interés. Las técnicas de RT-PCR son rápidas, específicas y sensibles, permitiendo la detección de muy pocas moléculas de mRNA (76,77). La RT-PCR es adecuada para estudios donde la cantidad de material biológico (células, tejido) es escasa o el mRNA que se desea medir presenta niveles muy bajos o una alta homología con otros mRNAs. Su principal inconveniente es que pequeñas variaciones en las condiciones de reacción se magnifican considerablemente durante el proceso de amplificación, lo que dificulta la cuantificación de mRNAs específicos. No obstante, en los últimos años se han desarrollado técnicas de RT-PCR en las que con el uso estándares internos y externos adecuados se puede cuantificar de forma simultánea, precisa, fiable y reproducible el contenido de mRNA de los principales P-450s hepáticos de metabolización de fármacos (78).

Los niveles de mRNA de un determinado P-450 no siempre se corresponden con su capacidad funcional (79). Los mecanismos de con-

trol traduccional, la vida media de la proteína y los polimorfismos genéticos, entre otros factores, pueden alterar el paralelismo entre la cantidad de mRNA y la actividad enzimática. Por tanto, es necesario obrar con prudencia a la hora de aplicar los ensayos de cuantificación de mRNAs para una estimación rápida y sensible de la capacidad metabólica. En principio, para aquellos P-450s cuya expresión se regula fundamentalmente a nivel pretraduccional (p.e. isoenzimas CYP3A4, CYP1A1/2 o CYP2B6) los cambios en el contenido de mRNA pueden identificarse como indicativos de variaciones en la expresión del enzima y su actividad (80).

4.7. Citometría de flujo y microscopía confocal

La citometría de flujo (CMF) es una reciente e importante herramienta metodológica de análisis multiparamétrico celular. La CMF permite, básicamente, la medida de la emisión de múltiples fluorescencias, inducida por la iluminación adecuada de células individuales o partículas subcelulares aisladas, cuando son impulsadas a gran velocidad por un flujo de líquido portador frente a un sistema óptico de detección. La CMF es el único sistema analítico por el que miles de células individuales pueden ser caracterizadas, estructuralmente y funcionalmente, en pocos segundos. Como resultado, poblaciones celulares complejas pueden ser descritas en función de las características biométricas de sus individuos (81)

La microscopía confocal de barrido láser (MCBL) comparte con la CMF el poder multiparamétrico del análisis de fluorescencia y la posibilidad de restringir el estudio a células individuales. Por tratarse de una metodología microscópica, en la que las células son examinadas en monocapa o en secciones de espesor fino, tanto el número total de células analizadas como la velocidad de adquisición de datos en MCBL no son comparables a las de la CMF, pero la MCBL supera a esta última técnica en la información de carácter topológico, ya que su elevado poder de resolución permite determinar, entre otros aspectos de relevancia citológica, la distribución de estructuras y funciones intracelulares, la reconstrucción tridimensional de estructuras microscópicas y la colocalización subcelular de parámetros biométricos (82).

Además de sus especiales características técnicas, la CMF y la MCBL se han beneficiado del desarrollo reciente de un gran número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a componentes celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos subcelulares o que modifican sus propiedades de fluorescencia en función del microambiente celular o de su propia transformación a través de reacciones enzimáticas específicas. Por estas razones, ambas técnicas citológicas se están convirtiendo en metodologías de elección en estudios de relevancia bioquímica y molecular (82,83).

La CMF se viene utilizando en diferentes aplicaciones relacionadas directa o indirectamente con el estudio del P-450. Las primeras aplicaciones en este sentido se encuentran integradas en la cuantificación de la actividad general o de distintas isoformas del P-450 en células individuales mediante el uso de sustratos fluorogénicos, como los descritos en la Tabla 3. En este sentido, es pionero el trabajo de Miller (84), que aplicó los primeros derivados etilados de la fluoresceína a caracterizar la actividad del P-450 en homogenados de hígado de ratón y en células de hepatoma murino. Otros sustratos fluorogénicos se han incorporado a los estudios por CMF, siendo importante el destacar que, por las características de la fuente de iluminación más común en CMF y en MCBL (el láser de ión argón, sintonizado a 488 nm), los sustratos de preferencia son los que presentan absorción en la banda del azul (85). Los derivados de la fluoresceína presentan emisión verde (84,86), mientras que los derivados de la resorufina presentan emisión en longitudes de onda cercanas al rojo (87-91). Los sustratos fluorogénicos derivados de la cumarina son excitables por la luz ultravioleta (91), lo que limita su aplicación, tanto en CMF como en MCBL, por ser poco frecuentes los sistemas citométricos dotados de dicha fuente de iluminación, aunque esta estrategia ha permitido, por ejemplo, detectar subpoblaciones de hepatocitos con diferente actividad de P-450 (91).

La capacidad multiparamétrica de la CMF y de la MCBL puede permitir, incluso, el análisis simultáneo de la actividad de isoformas del P-450 utilizando mezclas de sustratos fluorogénicos que sean excitables por la misma longitud de onda y generen emisiones de fluorescencia diferenciadas. Un ejemplo de esta aproximación, desarrollada en nuestro laboratorio, se muestra en la Figura 2. En ella se ilustra cómo la incuba-

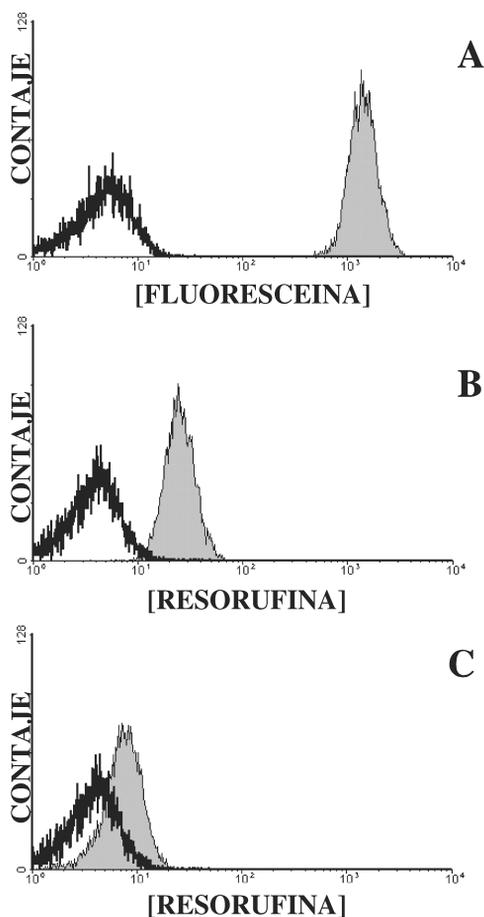


FIGURA 2. Medida por citometría de flujo de la actividad de citocromo P450 en cultivos de células V79. Las células fueron incubadas en monocapa durante 3 horas con concentraciones adecuadas de los sustratos fluorogénicos dibencilfluoresceína más etoxiresorufina o dibencilfluoresceína más benzoxiresorufina. Tras dispersión enzimática de la monocapa, la suspensión celular fue analizada en un citómetro de flujo EPICS XL-MCL. (A) muestra que las células poseen una elevada actividad biotransformadora sobre el sustrato dibencilfluoresceína (trazado gris), evidenciado por una elevada intensidad de fluorescencia verde de la fluoresceína generada. (B) y (C) muestran que las células expresan una actividad biotransformadora intermedia y baja, respectivamente, sobre los sustratos etoxiresorufina (B) y benzoxiresorufina (C), evidenciadas por la menos intensidad de fluorescencia roja de la resorufina liberada a partir de cada sustrato. Los trazados transparentes superpuestos en cada gráfica muestran la autofluorescencia verde (A) y roja (B, C) de las células no incubadas con sustratos. La intensidad de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias.

ción de células en monocapa con una mezcla de sustratos (“Cyp Mix”) de excitación en el azul y emisión en el verde (dibencilfluoresceína, sustrato de CYP 2A8, CYP 2A9 y CYP 3A4) y en el rojo (benzoxiresorufina, sustrato de CYP 3A4 y CYP 2B6), seguida de la dispersión de las células y su análisis por CMF en suspensión, permite evaluar de forma rápida la presencia de actividades P-450 en cultivos celulares de interés.

Una estrategia citométrica relacionada es la que permite cuantificar la cantidad de P-450 expresada por una población celular de interés (89) o su presencia en la membrana plasmática (92), mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos, específicos para una isoforma del P-450.

La velocidad de metabolización de sustratos fluorogénicos del P-450 puede ser también determinada mediante análisis cinético por CMF. La capacidad analítica de los citómetros de flujo modernos permite el análisis de miles de células por segundo, por lo que la capacidad de resolución temporal del análisis secuencial es cercana al milisegundo. De esta forma, es posible preparar suspensiones de células de interés, determinar su autofluorescencia basal (debida a la emisión de los pigmentos respiratorios intracelulares) y añadir el sustrato de estudio, siguiendo las variaciones temporales de fluorescencia que acompañan a la metabolización de la molécula sustrato fluorogénica. Esta aproximación es similar al análisis cinético por espectrofluorimetría en cubeta, pero proporciona la sustancial ventaja de poder detectar subpoblaciones celulares con diferente actividad P-450. Con respecto al análisis clásico por CMF, consistente en medidas a punto final tras incubación más o menos prolongada de las células con los sustratos fluorogénicos, esta estrategia posee la ventaja de su brevedad, que podría convertirla en una posible alternativa como método de screening de alto rendimiento. La Figura 3 presenta un ejemplo de la aproximación cinética al estudio por CMF de la actividad P-450, aplicada en nuestro laboratorio a una línea celular que expresa CYP3A4, utilizando como sustrato fluorogénico la etoxiresorufina.

Otra aproximación de relevancia en la aplicación de la CMF y la MCBL al estudio funcional de P-450 en células intactas consiste en analizar los efectos de moléculas relacionadas con el papel metabólico del citocromo en situaciones experimentales controladas. Entre las estrategias desarrolladas en este contexto, es frecuente el tratamiento

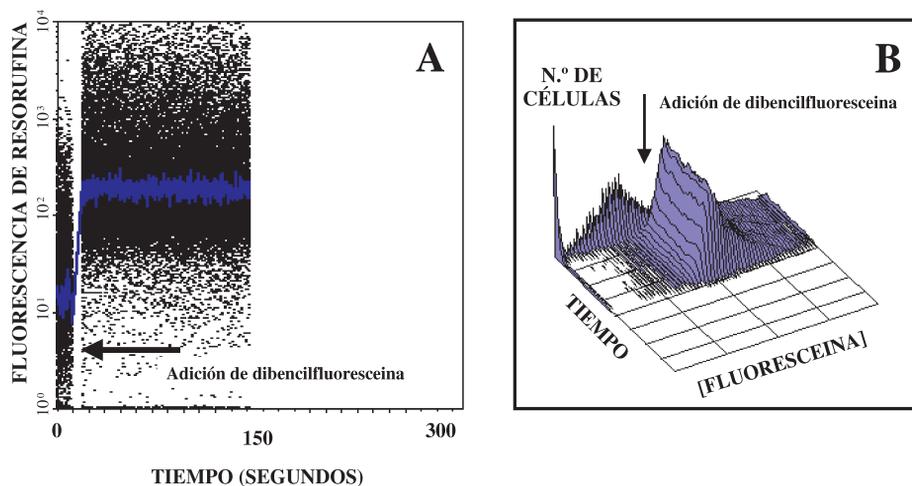


FIGURA 3. Medida cinética por citometría de flujo de la actividad de citocromo P450 en cultivos de células V79. (A) Tras dispersión enzimática de la monocapa, la suspensión celular fue analizada en un citómetro de flujo EPICS XL-MCL para obtener la línea basal de autofluorescencia. A continuación (flecha), se interrumpe la adquisición y se añade al tubo de muestra una concentración adecuada del sustrato fluorogénico dibencilfluoresceína. Al continuar el análisis se observa un aumento rápido de la fluorescencia, indicando la transformación del sustrato. (B) Muestra una representación tridimensional del mismo experimento, en la que se aprecia la existencia de heterogeneidad en la cantidad de sustrato transformado en la población celular. La intensidad de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias.

de líneas celulares que expresan de forma natural o artificial isoformas de P-450, con sustratos específicos generadores de metabolitos tóxicos. La CMF se suele aplicar para detectar indicadores de lesión celular o muerte, tanto por apoptosis como por necrosis (93,94). Una estrategia complementaria consiste en determinar el papel protector de inhibidores de la actividad de isoformas de P-450 o la potenciación de los efectos tóxicos de unas moléculas por otras (95). La capacidad multiparamétrica de la CMF y su complementariedad con el análisis de imagen cuantitativo que proporciona la MCBL supondrán, sin duda, una alternativa metodológica para caracterizar las propiedades biológicas de líneas celulares que expresan diferentes formas del P-450, los efectos metabólicos de sustratos específicos y los fenómenos de interacción entre inhibidores y sustratos (96).

5. EVALUACIÓN DEL PAPEL DEL P-450 EN EL METABOLISMO DE FÁRMACOS

El desarrollo de un nuevo fármaco requiere una caracterización exhaustiva no sólo de su actividad farmacológica y sus posibles efectos tóxicos, sino también de su perfil metabólico en el hombre, de la velocidad y grado de metabolización, de las rutas metabólicas implicadas en su eliminación, de los enzimas responsables de las mismas, y de su posible efecto inhibitor/inductor sobre los P-450s. Hoy en día, la aplicación de ensayos cinéticos y metabólicos basados en modelos hepáticos de origen humano durante las primeras fases del desarrollo del fármaco conduce a una selección más rápida, segura y racional de las diferentes moléculas candidatas. El uso creciente por parte de la industria farmacéutica de estos sistemas *in vitro* ha acelerado considerablemente el proceso de identificación y descarte de los candidatos menos apropiados y, por tanto, posibilita la evaluación de un número mayor de moléculas. La estabilidad metabólica del fármaco, su perfil metabólico, los enzimas implicados, especialmente si se trata de formas polimórficas, y las posibles interacciones metabólicas son las principales áreas de interés (Figura 4).

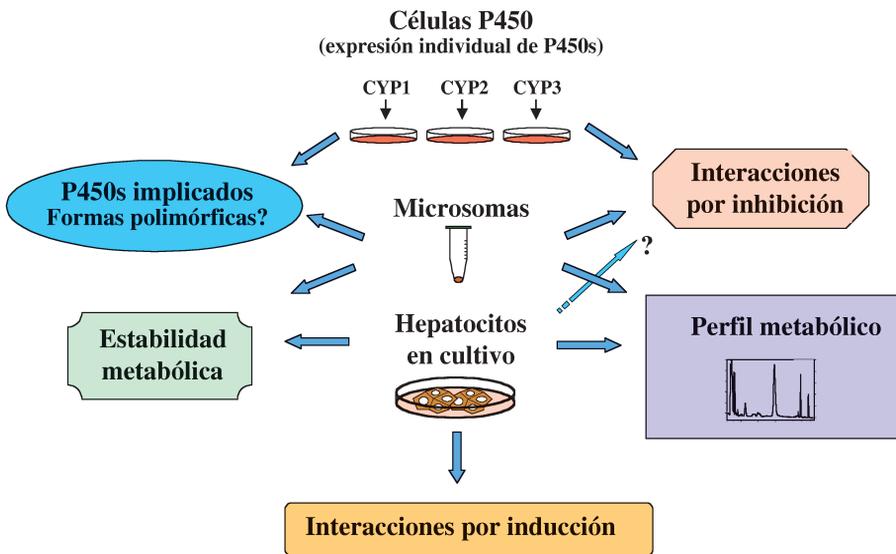


FIGURA 4. Principales aplicaciones de los modelos hepáticos *in vitro* durante el desarrollo de nuevos fármacos.

5.1. Estabilidad metabólica

La estabilidad metabólica del compuesto es uno de los criterios de selección preliminar de nuevos fármacos. Una molécula con un metabolismo excesivamente rápido resulta poco aconsejable y es descartada en los primeros estudios. Si este tipo de ensayos se realiza con modelos animales existe la posibilidad de que moléculas que en un principio se consideran con una estabilidad adecuada, deban ser descartadas en una etapa posterior al comprobarse su rápida metabolización por los enzimas humanos. Los ensayos de estabilidad con modelos *in vitro* de origen humano realizados en las etapas preliminares del proceso facilitan la tarea, aceleran el proceso, reducen la probabilidad de resultados erróneos y, en definitiva, suponen un considerable ahorro. La estabilidad metabólica se pueden estudiar fácilmente mediante la incubación del compuesto con microsomas hepáticos o hepatocitos y la posterior cuantificación de su velocidad de desaparición del medio de incubación (13,22,97).

5.2. Perfil metabólico

Los enzimas hepáticos de biotransformación, tanto de oxidación como de conjugación, convierten el fármaco en metabolitos más hidrosolubles, y por tanto más fácilmente eliminables. Las reacciones de metabolización no sólo producen cambios en la solubilidad del substrato, sino que al mismo tiempo modifican su actividad biológica. Con frecuencia la transformación del fármaco conduce a la pérdida o reducción de su acción farmacológica y de sus efectos tóxicos. No obstante, pueden producir procesos de activación con formación de metabolitos más potentes que la molécula original o con una actividad farmacológica totalmente diferente o con generación de metabolitos reactivos potencialmente tóxicos. Estas eventualidades deben estar previstas, por lo que durante el desarrollo del fármaco debe explorarse su perfil metabólico. El objetivo es identificar la naturaleza de todas las moléculas formadas, mayoritarias o no, para poder evaluar los posibles fenómenos de neutralización o activación farmacológica y/o toxicológica derivados del metabolismo.

Para estos ensayos se requiere el uso de modelos que contengan todos los P-450s hepáticos que participan en el metabolismo de fármacos. Los

sistemas biológicos que expresan sólo un enzima o un número reducido de los mismos ofrecen una información parcial que puede conducir a interpretaciones erróneas. A modo de ejemplo, en estos sistemas podría no detectarse la formación de metabolitos secundarios (los que se originan a partir de otros metabolitos formados por un P-450 diferente). El perfil metabólico del fármaco se obtiene, por tanto, tras la incubación del fármaco con microsomas hepáticos o hepatocitos y su posteriormente análisis cromatográfico (p.e. HPLC/MS) (98,99). La mayor parte de las moléculas en desarrollo tienen un marcado carácter lipofílico por lo que para su solubilización se recurre con frecuencia al empleo de solventes orgánicos miscibles con agua. A la hora de elegir el solvente más adecuado se debe tener en cuenta que pueden producir un efecto inhibitorio de algunas actividades del P-450 (en general se recomienda utilizar concentraciones del solvente < 1%) (100). El uso de células en cultivo, si bien puede aportar cierta dificultad al ensayo y a la interpretación de los resultados, proporciona una información más cercana a lo que ocurre *in vivo* (13). Diversos estudios refuerzan la idea de que los hepatocitos proporcionan un perfil metabólico más completo y reproducen mejor que los microsomas el metabolismo de fármacos que tiene lugar en el hígado (101-103).

5.3. Identificación de los P-450s responsables del metabolismo

El hígado humano contiene cerca de 20 enzimas P-450s relacionados la biotransformación de xenobióticos, pero no todos ellos participan con igual intensidad en el metabolismo de fármacos. En la figura 5 se compara la abundancia relativa en el hígado humano de los principales P-450s y su papel en el metabolismo de fármacos. El CYP3A4 es el isoenzima hepático más abundante y, al mismo tiempo, es el que tiene una mayor participación metabólica. En la actualidad se sabe que el CYP3A4 interviene en la oxidación de un elevado número de agentes terapéuticos. En la tabla 6 se recogen algunos de los ejemplos más significativos. El CYP2D6 también juega un papel importante, incluso más destacado que el de otros enzimas más abundantes en hígado (p. e. CYP2C9, CYP2E1 o CYP1A2).

Una vez conocido el perfil metabólico del fármaco, el siguiente paso es la identificación de los enzimas que intervienen en cada uno de los procesos que conducen a la formación de los metabolitos. Esta caracteri-

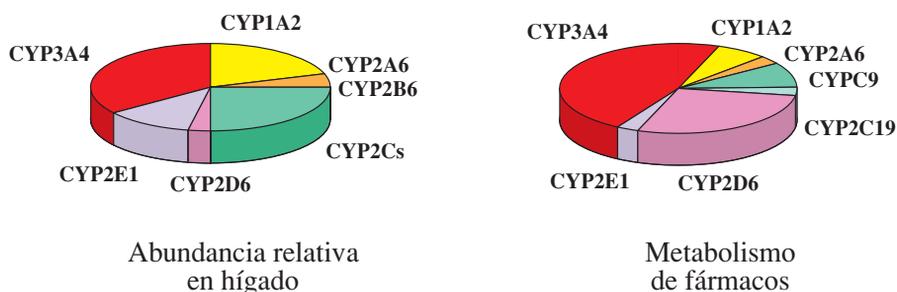


FIGURA 5. *Los enzimas P450 hepáticos implicados en el metabolismo de fármacos.*

zación resulta fundamental por tres razones básicas: 1) es el punto de partida para la identificación de posibles interacciones metabólicas entre el fármaco y otras moléculas; 2) ayuda a explicar y prevenir la posible variabilidad en la farmacocinética, farmacodinamia y el potencial tóxico del fármaco observada en sujetos con diferente fenotipo metabólico (patrón enzimático diferente por influencia de la edad, sexo, estados patológicos, consumo de alcohol, inducción, etc.); y 3) es de especial importancia identificar el papel de isoenzimas polimórficos en el metabolismo del fármaco para prevenir la aparición de efectos inesperados del fármaco y, si fuera necesario, establecer una pauta individualizada de administración.

La incubación del fármaco con microsomas completamente caracterizados fue el primer protocolo utilizado con este objetivo. La caracterización de los microsomas consiste en la cuantificación de todas las formas de P-450 presentes. De forma habitual se hace en términos de actividad catalítica, con la ayuda de sustratos selectivos o, alternativamente, en términos de contenido en proteína, mediante técnicas de inmunocuantificación (p.e. *Western blot*). La posibilidad de disponer de un banco de microsomas con diferente patrón de enzimas P-450s permite establecer correlaciones entre la velocidad de metabolización del fármaco estudiado y la actividad (o contenido de proteína) individual de cada P-450. El análisis por regresión lineal de los resultados obtenidos (formación del metabolito del fármaco vs. actividad específica del isoenzima) indica el grado de participación de ese P-450 en la formación del metabolito (99,105,106). Conocidos los solapamientos en la especificidad de sustrato existentes entre diferentes P-450s y ante la posibilidad de que varios P-450s intervengan en el metabolismo, deberían evitarse concentraciones saturantes del sustrato (105). La confirma-

TABLA 6

Fármacos y substratos endógenos oxidados por el isoenzima CYP3A4^{58,104}

1. <i>Fármacos</i>		
1.1 <i>Analgésicos-anestésicos</i>	1.7 <i>Antifúngicos</i>	1.14 <i>Psicotrópicos</i>
Alfentanilna	Ketokonazol	Alprazolam
Etilmorfina	Itraconazol	Benzfetamina
Fentanil	Miconazol	Clozapina
Lidocaina	1.8 <i>Antihipertensivos</i>	Diazepam
1.2 <i>Antiarrítmicos</i>	Amlodipina	Midazolam
Amiodarona	Diltiazem	Zoldipén
Digoxina	Felodipina	Triazolam
Propafenona	Losartan	1.15 <i>Quimioterápicos</i>
Quinidina	Nircadipina	Busulfan
Verapamil	Nifedipina	Ciclofosfamida
1.3 <i>Antibióticos</i>	1.9 <i>Antihistamínicos</i>	Doxorubicina
Azitromicina	Astemizol	Etoposido
Claritromicina	Ebastina	Isofosfamida
Clindamicina	Loratidina	Paclitaxel
Dapsona	Mizolastina	Tamoxifen
Eritromicina	Terfenadina	Tenipoxide
Rifampicina	1.10 <i>Antiulcerosos</i>	Vinblastina
1.4 <i>Anticonvulsivantes</i>	Lansoprazol	Vincristina
Carbamazepina	Omeprazol	1.16 <i>Otros</i>
Clonazepam	1.11 <i>Anti-VIH</i>	Alpidem
Etoxisumida	Indinavir	Dextrometorfano
Zonisamida	Ritonavir	Etinilestradiol
1.5 <i>Antidepresivos</i>	Saquinavir	Haloperidol
Amitriptilina	1.12 <i>Inmunosupresores</i>	Metadona
Imipramina	Ciclosporina	Ondansetrón
Nefozodona	Rapamicina	Salmeterol
Sertralina	Tacrolimus	Simvastatin
1.6 <i>Antiinflamatorios</i>	1.13 <i>Opiáceos</i>	Teofilina
Acetaminofeno	Codeína	Terguride
Meloxicam	Morfina	Warfarina
2. <i>Substratos endógenos</i>		
Androstenediona	Dehidroepiandrosterona	Progesterona
Cortisol	Estradiol	Testosterona

ción del papel de un enzima en particular se obtiene con la ayuda de inhibidores químicos selectivos y/o de anticuerpos inhibidores (71,73,98,107). En estos ensayos el metabolismo del sustrato de interés se cuantifica en presencia de diferentes concentraciones del agente inhibidor. La inhibición completa de la formación del metabolito es indicativa de la participación del P-450 para el cual es selectivo el inhibidor.

En los últimos años, la identificación se ha simplificado notablemente con el desarrollo de células manipuladas genéticamente para la expresión de una única forma de P-450. La incubación del fármaco con microsomas obtenidos a partir de estos modelos celulares permite identificar de forma sencilla e inequívoca los P-450s responsables de la formación de cada metabolito (15,108). Alternativamente el estudio se puede realizar por incubación directa del sustrato con las células en cultivo (109). El ensayo por separado con cada línea celular permite establecer si el fármaco es sustrato de un isoenzima en particular y qué metabolito(s) es formado por cada P-450. A diferencia de los experimentos realizados con fracciones subcelulares, la incubación con las células en monocapa se puede prolongar durante varias horas. Estos modelos son particularmente útiles para el estudio de compuestos que se metabolizan muy lentamente y/o para identificar la participación de formas minoritarias del P-450. La presencia de una única actividad P-450 es al mismo tiempo la principal ventaja y la más seria limitación de estos modelos. El hecho de que sólo se exprese un P-450 no permite estimar el grado de participación del enzima en la reacción canalizada ni la contribución real de dicha reacción dentro del metabolismo global del fármaco. Estos sistemas con frecuencia presentan una sobreexpresión del enzima en comparación con el hígado humano, lo que impide calibrar la relevancia que pueda tener el metabolito formado por ese P-450 en el conjunto del metabolismo hepático del fármaco.

Conocidas las limitaciones de cada modelo, resulta ventajoso un uso combinado de los mismos que permita aprovechar las virtudes de cada uno ellos (103,110,111). Una aproximación de este tipo se puede abordar por comparación de la cinética de metabolización del compuesto y de la actividad individual de cada P-450 (utilizando sustratos adecuados) en hepatocitos y en líneas celulares que expresan un único P-450 (109). Teniendo en cuenta además la abundancia relativa de cada P-450 en el hígado humano se puede hacer una estimación de la participación de los distintos P-450s en el metabolismo *in vivo* del compuesto.

5.4. Interacciones metabólicas

Durante la administración simultánea de dos o más fármacos se pueden originar interacciones metabólicas que alteren la farmacocinética de al menos uno de los fármacos, con las correspondientes implicaciones farmacológicas y/o toxicológicas. Una interacción de este tipo ocurre cuando la presencia de uno de los fármacos interfiere con el metabolismo de otro acelerándolo o disminuyéndolo (101).

5.4.1. Inhibición

Una posible causa de interferencia es que ambos fármacos sean sustratos del mismo P-450 y se produzca una competencia por su unión al enzima. Alternativamente, uno de los compuestos puede bloquear o inactivar irreversiblemente la actividad del P-450 que metaboliza al otro fármaco. En definitiva en ambos casos se produce una elevación de los niveles circulantes de éste último que, en el caso de fármacos con un índice terapéutico estrecho, conduce a situaciones de sobredosis con respuesta exagerada y/o toxicidad (Lin and Lu 1998). Se estima que alrededor del 75% de los fármacos son metabolizados por el CYP3A4 y/o el CYP2D6, por tanto, es fácil imaginar que la mayor parte de las interacciones metabólicas se deben a interferencias a nivel de estas enzimas (Tabla 7) (7,58,112).

TABLA 7

Inhibidores e inductores de las enzimas CYP2D6 y CYP3A4 con mayor relevancia clínica

<i>CYP</i>	<i>Inhibidores</i>	<i>Inductores</i>
2D6	Antiarrítmicos: quinidina, amiodarona Antidepresivos: fluoxetina, paroxetina, sertralina	
3A4	Azoles antifúngicos: ketokonazol, itraconazol, miconazol, fluconazol Antibióticos macrólidos: eritromicina, claritromicina, troleandomicina Inhibidores de la proteasa del VIH: ritonavir, indinavir, amprenavir Antidepresivos: fluoxetina, fluvoxamina, nefazodona Antiarrítmicos: amiodarona Zumo de pomelo	Antituberculosos: rifampicina, rifampin, rifabutin Anticonvulsivantes: fenobarbital, carbamapecina, fenitoina Glucocorticoides: dexametasona Hierba de S. Juan

En el estudio de las interacciones metabólicas motivadas por efectos de inhibición son dos las cuestiones básicas a responder: 1) si el nuevo fármaco interfiere sobre la actividad de los P-450s y, por tanto, sobre el metabolismo de otros compuestos, o 2) si, por el contrario, es su metabolismo el que se ve afectado por la presencia de otros fármacos. Aunque relacionados son aspectos diferentes del problema y requieren su tratamiento por separado.

La capacidad de inhibir los P-450s se considera como un efecto no deseado de los fármacos y es una de las causas de que una molécula candidata sea rechazada. Por razones económicas, es fundamental que los posibles descartes se realicen lo antes posible, por lo que la información sobre el potencial inhibidor del compuesto debe obtenerse durante las fases preliminares del desarrollo del fármaco. Hoy en día estos ensayos se realizan en modelos *in vitro* en los que sólo se expresa un P-450 (fracciones subcelulares o células en cultivo) mediante la incubación simultánea de diferentes concentraciones de la molécula en desarrollo y de un sustrato específico para el enzima P-450 a estudiar (Tablas 2 y 3). Con estos estudios es fácil identificar la posible inhibición funcional de los diferentes P-450s y, en su caso, establecer comparaciones con los efectos producidos por fármacos relacionados y obtener información sobre la IC₅₀ (concentración que inhibe la actividad en un 50%), los parámetros cinéticos de inhibición e incluso el tipo de inhibición (64,113,114). Además, el uso de modelos celulares permite reconocer interferencias en los mecanismos de transporte. No obstante, en estos sistemas que sólo expresan un P-450 no es posible detectar las interferencias producidas por el fármaco cuando la acción inhibitoria es debida a un metabolito generado por un enzima diferente. Ante este tipo de eventualidades el uso de modelos con una competencia metabólica más completa (microsomas, hepatocitos) resultaría más apropiado.

La segunda cuestión planteada es la identificación de posibles alteraciones en el metabolismo del fármaco en desarrollo producidas por otros compuestos. El desconocimiento de estas interacciones conduce a la aparición de efectos exagerados del fármaco cuando se administra de forma simultánea a agentes inhibidores del P-450. El objetivo es conocer de antemano estas interacciones farmacocinéticas y evitar riesgos innecesarios con el establecimiento de las correspondientes incompatibilidades entre

fármacos. El protocolo a seguir es similar al supuesto anterior y consiste en analizar el metabolismo del fármaco en presencia de concentraciones variables de los otros compuestos con capacidad de inhibición conocida. El conocimiento previo de los P-450s que intervienen en el metabolismo del nuevo fármaco constituye una gran ayuda. De nuevo, aunque el uso de células en lugar de microsomas puede complicar el ensayo, proporciona una información más completa y aproximada a la que tiene lugar *in vivo* (67,68,115).

5.4.2. *Inducción*

Otro importante mecanismo de interacciones medicamentosas es la inducción de algunos P-450s por determinados fármacos. La mayor parte de los P-450s implicados en la biotransformación de compuestos exógenos son influenciados en mayor o menor medida por la presencia de xenobióticos (38,116). La administración repetida de un fármaco puede acelerar su propio metabolismo (autoinducción) o el de otros agentes terapéuticos. En principio la inducción actúa como un mecanismo de protección al favorecer una eliminación más rápida de los xenobióticos y reducir el tiempo de tránsito por el organismo y sus posibles efectos tóxicos. No obstante, una metabolización más activa no necesariamente se correlaciona con una disminución de la toxicidad. La inducción, por tanto, puede tener consecuencias negativas al favorecer la aparición de metabolitos tóxicos. Además, la inducción puede afectar a la actividad farmacológica del compuesto con consecuencias variables. En aquellos casos en los que la forma activa sea el compuesto original se producirá una disminución de la eficacia terapéutica. Por el contrario, si la molécula activa es un metabolito, la inducción provocará una mayor respuesta farmacológica. En ambos casos, un conocimiento previo del riesgo de aparición de tales efectos sería lo recomendable. Nuevamente son los fármacos metabolizados por el CYP3A4 los que con mayor frecuencia presentan incompatibilidades metabólicas relacionadas con la inducción (Tabla 7) (7,58,112).

La evaluación del potencial inductor de un compuesto no puede realizarse en microsomas u otros modelos subcelulares, sino que se requiere un sistema celular capaz de reproducir *in vitro* la transcripción y traducción de los genes de los P-450s propia del hígado. Sin lugar a dudas, el cultivo pri-

mario de hepatocitos es el modelo más adecuado (20,117-120). Desde el punto de vista de las interacciones metabólicas, la inducción del P-450 puede ser definida como el aumento en la biosíntesis del enzima catalíticamente activo en respuesta a agentes químicos. El efecto inductor puede reconocerse fácilmente *in vitro* como un incremento de la actividad en respuesta al estímulo, como consecuencia del aumento de la cantidad del enzima presente en las células (17,117,118). Tras el tratamiento de los hepatocitos con el compuesto durante 24-72 horas, se cuantifica la actividad del P-450 con sustratos específicos y los resultados se comparan con la actividad de las células no expuestas al inductor. En general los hepatocitos en cultivo responden muy bien a los inductores del CYP1A2 y del CYP3A4 y, en menor medida, a los del CYP2A6, CYP2B6 y CYP2E1 (19,117,119,121).

Alternativamente, el efecto inductor puede evaluarse aplicando técnicas cuantitativas de RT-PCR (77,78). La mayor sensibilidad de estas técnicas permite una disminución considerable en el número de hepatocitos necesarios para cada ensayo. Este aspecto es de gran importancia, ya que precisamente la principal limitación de los estudios con hepatocitos humanos es su escasa disponibilidad. Además, ofrecen la posibilidad de realizar ensayos de inducción en células (p.e. hepatomas) con un menor nivel de expresión de P-450 que los hepatocitos (122). Finalmente, mediante estas técnicas de RT-PCR se han observado cambios en los niveles de mRNA de algunos P-450s (p.e. CYP2C9) que hasta el momento se habían considerado como no inducibles (123,124).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Shimada, T, Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. & Guengerich, F.P. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 japenese and 30 caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**, 414-423.
- (2) Fuhr, U. (2000) Induction of drug metabolising enzymes. Pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clin Pharmacokinet* **38**, 493-504.
- (3) Ingelman-Sundberg, M. (2001) Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutation Res* **482**, 11-19.

- (4) Thompson, T.N. (1997) Experimental models for evaluating enzyme induction potential of new drug candidates in animals and humans and a strategy for their use. *Adv Pharmacol* **43**, 205-229.
- (5) Spatzenegger, M. & Jaeger, W. (1995) Clinical importance of hepatic cytochrome P-450 in drug metabolism. *Drug Metab Rev* **27**, 397-417.
- (6) Lu, A.Y.H. (1998). Drug-metabolism research challenges in the new millennium: individual variability in drug therapy and drug safety. *Drug Metab Dispos* **26**, 1217-1222.
- (7) Finch, C.K., Chrisman, C.R., Baciewicz, A.M., & Self TH. (2002) Rifampin and rifabutin drug interactions: an update. *Arch Intern Med* **162**, 985-992.
- (8) McGuinness, D.F. & Riley RJ. (2001). Predicting drug pharmacokinetics in humans from in vitro metabolism studies. *Biochem Soc Trans* **29**, 135-9.
- (9) Lin, J.H. (1998) Applications and limitations of interspecies scaling and in vitro extrapolation in pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos* **26**, 1202-1212.
- (10) Nedelcheva, V. & Gut, I. (1994) P-450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**, 1151-1175.
- (11) Pearce, R., Gateway, D. & Parkinson, A. (1992) Species differences and inter-individual variation in liver microsomal cytochrome P-450A enzymes: effects on coumarin, dicoumarol and testosterone oxidation. *Arch Biochem Biophys* **298**, 211-225.
- (12) Donato, M.T., Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (1999) Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* **31**, 542-549.
- (13) Bayliss, M.K. & Cross, D.M. (2000) The importance of hepatocytes in drug metabolism studies: an industrial perspective. In *The hepatocyte review* (eds. MN Berry and A. Edwards), pp. 365-389. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- (14) Donato, M.T. & Castell, J.V. (2003) Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P-450 in drug metabolism. *Clin Pharmacokinet* **42**, 153-178.
- (15) Rodrigues, A.D. (1999) Integrated cytochrome P-450 reaction phenotyping. Attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P-450 and native human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **57**, 465-480.
- (16) Gómez-Lechón, M.J., Donato, T., Ponsoda, X., Fabra, R., Trullenque, R. & Castell, J.V. (1997) Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research. In *Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research*, *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, (Castell, J.V. and Gómez-Lechón, M.J. Eds.), Academic Press, London, pp. 129-153.

- (17) Donato, M.T., Gómez-Lechón, M.J. & Castell, J.V. (1990) Effect of xenobiotics on monooxygenase activities in cultured human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **39**, 1321-1326.
- (18) Rodríguez-Antona, C.; Donato, M.T.; Boobis, A., Edwards, R.J.; Watts, P.S.; Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (2002) Cytochrome P-450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* **32**, 505-520.
- (19) Runge, D., Kohler, C., Kostrubsky, V., Jager, D., Lehmann, T., Runge, D.M., May, U., Stolz, D.B., Strom, S.C., Fleig, W.E. & Michalopoulos, G.K. (2000) Induction of cytochrome P-450 (CYP)1A1, CYP1A2m and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated proteine (MPR-1) by prototypical inducers in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 333-341.
- (20) LeCluyse, E.L. (2001) Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P-450 expression and regulation. *Eur J Pharmac Sci* **13**, 343-368.
- (21) Andersson, T.B., Sjoberg, H., Hoffmann, K.J., Boobis, A.R., Watts, P., Edwards, R., Lake, B.G., Price, R.J., Renwich, A.B., Gómez-Lechón, M.J., Castell, J.V., Ingelman-Sundberg, M., Hidestrand, M., Goldfarb, P.S., Lewis, D., Corcos, L., Guillouzo, A. Taatvitsainen, P. & Pelkonen, O. (2001) An assessment of human liver-derived in vitro systems to predict the in vivo metabolism and clearance of almokalant. *Drug Metab Dispos* **29**, 712-20
- (22) Hewitt, N.J., Bühring, K.U., Desenbrock, J., Haunschild, J., Ladstetter, B. & Utesch, D. (2001) Studies comparing in vivo/in vitro metabolism of three pharmaceutical compounds in rat, dog, monkey, and human using cryopreserved hepatocytes, microsomes, and collagen gel immobilized hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos* **29**, 1042-1050.
- (23) Mitry, R.R., Hughes, R.D. and Dhawan, A. (2002) Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 463-467.
- (24) Alexandre, E., Viollon-Abadie, C., David, P., Gandillet, A., Coassolo, P., Heyd, B., Manton, G., Wolf, P., Bachellier, P., Jaeck, D. and Richert, L. (2002) Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies. *Cryobiology*, **44**, 103-113.
- (25) Donato, M.T., Bassi, A.M., Gómez-Lechón, M.J., Penco, S., Herrero, E., Adamo, d., Castell, J.V. & Ferro, M. (1994) Evaluation of the xenobiotic biotransformation capability of six rodent hepatoma cell lines in comparison with rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* **30A**, 574-580.
- (26) Klocke, R., Gómez-Lechón, M.J., Ehrhardt, A., Mendoza-Figueroa, T., Donato, M.T., López-Sevilla, R., Castell, J.V. & Paul, D. (2002). Establishment and cha-

- racterization of immortal hepatocytes derived from various transgenic mouse lines. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 864-871.
- (27) Paul, D., Höhne, M., Pinkert, C., Piasecki, A., Ummelmann, E. & Brinster, R.L. (1988) Immortalized differentiated hepatocyte lines derived from transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes. *Exp. Cell. Res* **175**, 354-362.
- (28) Roberts, E.A., Letarte, M., Squire, J. & Yang, S. (1994) Characterization of human hepatocyte lines derived from normal liver tissue. *Hepatology* **19**, 1390-1399.
- (29) Crespi, C.L., Gonzalez, F.J., Steimel, D.T., Turner, T.R., Gelboin, H.V., Penman, B.W. & Langenbach, R. (1991) A metabolically competent human cell line expressing five cDNAs encoding procarcinogen-activating enzymes: application to mutagenicity testing. *Chem Res Toxicol* **4**, 566-572.
- (30) Doehmer, J., Wolfel, C., Dogra, S., Doehmer, C., Seidel, A., Platt, K.L., Oesch, F. & Glatt, H.R. Applications of stable V79-derived cell lines expressing rat cytochromes P-4501A1, 1A2, and 2B1. *Xenobiotica* **22**, 1093-1099.
- (31) Macé, K., Offord, E. & Pfeifer, A. Drug metabolism and carcinogen activation studies with human genetically engineered cells. In *Isolation, culture ad use of human hepatocytes in drug research, In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, (Castell, J.V. and Gómez-Lechón, M.J. Eds.), Academic Press, London, pp. 433-456.
- (32) Masimirembwa, C.M., Otter, C., Berg, M., Jonsson, M., Leidvik, B., Jonsson, E., Hohansson, T., Backman, A., Edlund, A. & Andersson, T.B. (1999) Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes P-450: validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research. *Drug Metab Dispos* **27**, 1117-1122.
- (33) Yoshitomi, S., Ikemoto, K., Takahashi, J., Miki, H., Namba, M. & Asahi, S. (2001) Establishment of the transformants expressing human cytochrome P-450 subtypes in Hep G2, and their implications on drug metabolism and toxicology. *Toxic In Vitro* **15**, 245-256.
- (34) Venkatakrisnan, K., Von Molte, L.L., Court, M.H., Harmatz, J.S., Crespi, C. & Greenblatt, D.J. (2000) Comparison between cytochrome P-450 (CYP) content and relative activity approaches to scaling from cDNA-expressed CYPs to human liver microsomes: ratios of accessory proteins as sources of discrepancies between the approaches. *Drug Metab Dispos* **28**, 1493-1504.
- (35) Omura, T. & Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* **239**, 2370-2378.
- (36) Smith, D.A., Ackland, M. & Jones, B.C. (1997) Properties of cytochrome P-450 isoenzymes and their substrates. Part 2: properties of cytochrome P-450 substrates. *Drug Discov Today* **2**, 479-486.

- (37) Lewis, D.F., Modi, S. & Dickins, M. (2002) Structure-activity relationships for human cytochrome P-450 substrates and inhibitors. *Drug Metab Rev* **34**, 69-82.
- (38) Pelkonen, O., Maenpaa, J., Taavitsainen, P., Rautio, A. & Raunio, H. (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P-450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* **28**, 1203-1253.
- (39) Masimirembwa, C.M., Thompson, R. & Andersson, T.B. (2001) In vitro high throughput screening of compounds for favorable metabolic properties in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* **4**, 245-263.
- (40) Crespi, C.L., Miller, V.P. & Penman, B.W. (1997) Microtiter plate assay for inhibition of human drug-metabolizing cytochromes P-450. *Anal Biochem* **248**, 188-190.
- (41) Ekins, S., VandenBranden, M., Ring, B.J. & Wrighton, S.A. (1997) Examination of purported probes of human CYP2B6. *Pharmacogenetic*. **7**, 165-179.
- (42) Chauret, N., Tremblay, N., Lackman, R.L., Gauthier, J.Y., Silva, J.M., Marois, J., Yergey, J.A. & Nicoll-Griffith, D.A. (1999) Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P-4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Anal Biochem* **276**, 215-226.
- (43) Renwick, A.B., Surrty, D., Price, R.J., Lake, B.G. & Evans, D.C. (2000) Metabolism of 7-benzoyloxy-4-trifluoromethyl-coumarin by human hepatic cytochrome P-450 isoforms. *Xenobiotica* **30**, 955-969.
- (44) Stresser, D.M., Blanchard, A.P., Turner, S.D., Erve, J.C., Dandeneau, A.A., Miller, V.P. & Crespi, C.L. (2000). Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorimetric substrates. *Drug Metab Dispos* **28**, 1440-1448.
- (45) Venhors, J., Onderwater, R.C.A., Meerman, J.H.N., Vermeulen, N.P.E. & Commandeur, J.N.M. (2000) Evaluation of a novel high-throughput assay for cytochrome P-450 2D6 using 7-methoxy-4-(aminophenyl)-coumarin. *Eur J Pharmaceut Sci* **12**, 151-158.
- (46) Rendic, S. & Di Carlo, F. (1997) Human cytochrome P-450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metab Rev* **29**, 413-580.
- (47) Pelkonen, O. (2002) Human CYPs: in vivo and clinical aspects. *Drug Metab Rev* **34**, 37-46.
- (48) Kaminsky, L.S. & Zhang, Z.Y. (1997) Human P-450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther* **73**, 67-74
- (49) Yamazaki, H. & Shimada, T. (1997) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P-450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **346**, 161-169.

- (50) Niwa, T., Yabusaki, Y., Honma, K., Matsuo, N., Tatsuta, K., Ishibashi, F & Katagiri, M. (1998) Contribution of human hepatic cytochrome P-450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica* **28**, 539-547.
- (51) Frye, R.E., Matzke, G.R., Adedoyin, A., Porter, J.A. & Branch, R.A. (1997) Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther* **62**, 265-276.
- (52) Scott, R.J., Palmer, J., Lewis, I.A.S. & Pleasance, S. (1999) Determination of a "GW cocktail" of cytochrome P-450 probe substrates and their metabolites in plasma and urine using automated solid phase extraction and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**, 2305-2319.
- (53) Dierks, E.A., Stams, K.R., Lim, H.K., Cornelius, G., Zhang, H. & Ball, S.E. (2001) A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P-450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* **29**, 23-29.
- (54) Testino, S.A. & Patonay, G. (2003) High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P-450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **30**, 1459-1467.
- (55) Christensen, M., Andersson, K., Dalén, P., Mirghani, R., Muirhead, G.J., Nordmark, A., Tybring, G., Wahlberg, A., Yasar, U. & Bertilsson, L. (2003) The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P-450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther* **73**, 517-528.
- (56) Ortiz de Montellano, P.R. & De Voss J.J. (2002) Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P-450. *Na tProd Rep* **19**, 477-493.
- (57) Pearce, R.E., McIntyre, C.J., Madan, A., Sanzgiri, U., Draper, A.J., Bullock, P.L., Cook, D.C., Burton, L.A., Latham, J., Nevins, C. & Parkinson, A.. (1996) Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P-450 activity. *Arch Biochem Biophys* **331**, 145-169.56.
- (58) Guengerich, F.P. (1999) Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 1-17.
- (59) Schenkman, J.B. (1972) The effects of temperature and substrates on component reactions of the hepatic microsomal mixed-function. *Mol Pharmacol* **8**, 178-188.
- (60) Kronbach, T., Mathys, D., Gut, J., Catin, T. & Meyer, U.A. (1987) High-performance liquid chromatographic assays for bufuralol 1'-hydroxylase, debrisoquine 4-hydroxylase, and dextromethorphan O-demethylase in microsomes and purified cytochrome P-450 isozymes of human liver. *Anal Biochem* **162**, 24-32.

- (61) Donato, M.T., Gómez-Lechón, M.J. & Castell, J.V. (1993) A microassay for measuring cytochrome P-450IA1 and P-450IIB1 activities in intact of human hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* **213**, 29-33.
- (62) Donato, M.T., Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (1998) The coumarin 7-hydroxylation microassay in living hepatic cells in culture. *ATLA* **26**, 213-239.
- (63) Price, R.J., Surry, D., Rewick, A.B., Meneses-Lorente, G., Lake, B.G. & Evans, D.C. (2000) CYP isoform induction screening in 96-well plates: use of 7-benzoyloxy-4-trifluoromethylcoumarin as a substrate for studies with rat hepatocytes. *Xenobiotica* **30**, 781-795.
- (64) Palamanda, J.R., Favreau, L., Lin, C. & Nomeir, A.A. (1998) Validation of a rapid microtiter plate assay to conduct cytochrome P-450 2D6 enzyme inhibition studies. *Drug Discovery Today* **3**: 466-470
- (65) Lin, J.H. & Lu, Y.H. (1998) Inhibition and induction of cytochrome P-450 and de clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **35**, 361-390.
- (66) Murray, M. (1999) Mechanisms and significance of inhibitory drug interactions involving cytochrome P-450 enzymes. *Int J Mol Med* **3**, 227-238.
- (67) Cohen, L.H., van Leeuwen, R.E., van Thiel, G.C., van Pelt, J.F. & Yap, S.H. (2000) Equally potent inhibitors of cholesterol synthesis in human hepatocytes have distinguishable effects on different cytochrome P-450 enzymes. *Biopharm Drug Dispos* **21**, 353-364.
- (68) Li, A.P. & Jurima-Romet, M. (1997) Applications of primary human hepatocytes in the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions: evaluation of model drugs terfenadine and rifampin. *Chem Biol Toxicol* **13**, 365-374.
- (69) Gelboin, H.V. (1993) Cytochrome P-450 and monoclonal antibodies. *Pharmacol Rev* **45**, 413-453
- (70) Edwards, R.J., Adams, D.A., Watts, P.S., Davies, D.S. & Boobis, A.R. (1998) Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic-metabolising forms of cytochrome P-450 in humans. *Biochem Pharmacol* **56**, 377-387.
- (71) Yang, T.J., Krausz, K.W., Sai, Y., Gonzalez, F.J. & Gelboin, H.V. (1999) Eight inhibitory monoclonal antibodies define the role of individual P-450s in human liver microsomal diazepam, 7-ethoxycoumarin, and imipramine metabolism. *Drug Metab Dispos* **27**, 102-109.
- (72) Komatsu, K., Ito, K., Nakajima, Y., Kanamitsu, S., Imaoka, S., Funae, Y., Green, C.E., Tyson, C.A., Shimada, N. & Sugiyama, Y. (2000) Prediction of in vivo drug-drug interactions between tolbutamide and various sulfonamides in humans based on in vitro experiments. *Drug Metab Dispos* **28**, 475-481
- (73) Kobayashi K, Kogo M, Tani M, Shimada, N., Ishizki, T., Namazawa, S., Yoshida, T., Tamamoto, T., Kuroiwa, Y. & Chiba, K. (2001) Role of CYP2C19 in ste-

- reoselective hydroxylation of mephobarbital by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **29**, 36-40.
- (74) Oscarson, M., Gulisten, H., Rautio, A., Bernal, M.L., Sinues, B., Dahi, M.L., Stengard, J.H., Pelkonen, O., Raunio, H. & Jngelman-Sundberg, M. (1998) Genotyping of human cytochrome P-450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase. *FEBS Lett.* **438**, 201-205.
- (75) Tribut, O., Lessard, Y., Reyman J.M., Allain, H. & Bentué-Ferrer, D. (2002) Pharmacogenomics. *Med Sci Monit* **8**, RA152-163.
- (76) Pan, J., Xiang, Q. & Ball, S. (2000) Use of a novel real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the effects of cytokines on cytochrome P-450 mRNA expression in mouse liver. *Drug Metab Dispos* **28**, 709-713.
- (77) Bowen, W.P., Carey, J.E., Miah, A., McMurray, H.F., Munday, P.W., James, R.S., Coleman, R.A. & Brown, A.M. (2000). Measurement of cytochrome P-450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos* **28**, 781-788.
- (78) Rodríguez-Antona, C., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J. & Castell, J.V. (2000). Quantitative RT-PCR measurement of human cytochrome P-450s: application to drug induction studies. *Arch Biochem Biophys* **376**, 109-116.
- (79) Sumida, A., Kinoshita, K., Fukuda, T., Matsuda, H., Yamamoto, I., Inaba, T. & Azuma, J. (1999) Relationship between mRNA levels quantified by reverse transcription-competitive PCR and metabolic activity of CYP3A4 and CYP2E1 in human liver. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 499-503.
- (80) Rodríguez-Antona, C., Donato, M.T., Pareja, E., Gómez-Lechón, M.J & Castell, J.V. (2001) Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity. *Arch Biochem Biophys* **393**, 308-315.
- (81) Alvarez, A.M., Callaghan R.C. & O'Connor, J.E. (1997) Análisis del Estrés Oxidativo por Citometría de Flujo. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (Cascales, M., Ed.). Real Academia de Farmacia, Madrid, pp. 337-364.
- (82) Callaghan R.C., O'Connor, J.E., Alvarez A.M. (1997) Microscopía Confocal y Estrés Oxidativo en Células. En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (Cascales, M., Ed.). Real Academia de Farmacia, Madrid, pp. 365-380.
- (83) O'Connor, J.E., Callaghan, R.C., Escudero, M., Herrera, G., Martínez, A., Monteiro, M.C. & Montolíu, H. (2001) The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life* **51**, 231-239
- (84) Miller, A.G. (1983) Ethylated fluoresceins: Assay of cytochrome P-450 activity and application to measurements in single cells by flow cytometry. *Anal Biochem* **133**, 46-57.

- (85) Miller, A.D. (1990) Flow cytometric techniques for measurement of cytochrome P-450 activity in viable cells. *Methods Cell Biol* **33**, 71-79.
- (86) Black, K.A., Novicki, D.L., Vincent, J.L. & Smith, G.J. (1997) Flow cytometric analysis of xenobiotic metabolism activity in isolated rat hepatocytes. *Cytometry* **14**, 334-338.
- (87) Marrone, B.L., Simpson, D.J., Yoshida, T.M., Unkefer, C.J., Whaley, T.W. & Buican, T.N. (1991) Single cell endocrinology: analysis of P-450scc activity by fluorescence detection methods. *Endocrinology* **128**, 2654-2656.
- (88) Sidhu, J.S., Kavanagh, T.J., Reilly, M.T. & Omiecinski, C.J. (1993) Direct determination of functional activity of cytochrome P-4501A1 and NADPH DT-diphosphorase in hepatoma cell lines using noninvasive scanning laser cytometry. *J Toxicol. Environ Health* **40**, 177-194.
- (89) Stauber, K.L., Laskin, J.D., Yurkow, E.J., Thomas, P.E., Laskin, D.L. & Conney, A.H. (1995) Flow cytometry reveals subpopulations of murine epidermal cells that are refractory to induction of cytochrome P-4501A1 by beta-naphthoflavone. *J Pharmacol Exp Ther* **273**, 967-976.
- (90) Heinonen, J.T., Sidhu, J.S., Reilly, M.T., Farin, F.M., Omiecinski, C.J., Eaton, D.L. & Kavanagh, T.J. (1996) Assessment of regional cytochrome P-450 activities in rat liver slices using resorufin substrates and fluorescence confocal laser cytometry. *Environ Health Perspect.* **104**, 536-543.
- (91) Willson, R.A., Liem, H.H., Miyai, K. & Muller-Eberhard, U. (1985) Heterogeneous distribution of drug metabolism in elutriated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **34**, 1463-1470.
- (92) Loeper, J., Le Berre, A. & Pompon, D. (1998) Topology inversion of CYP2D6 in the endoplasmic reticulum is not required for plasma membrane transport. *Mol Pharmacol* **53**, 408-414.
- (93) Cascales, M., Alvarez, A., Gascó P., Fernández-Simón, L., Sanz N. & Boscá L. (1994) Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* **20**, 992-1001.
- (94) Ellouk-Achard, S., Martin, C., Pham-Huy, C., Duc, H.T., Thevenin, M., Duterre-Catella, H., Warnet, J.M. & Claude, J.R. (1997) Implication of CYP 3A in the toxicity of cyclosporin G (CsG), cyclosporin A (CsA) and FK506 on rat hepatocytes in primary culture. *Arch Toxicol* **71**, 437-442.
- (95) Xu, Y., Leo, M.A. & Lieber, C.S. (2003) Lycopene attenuates alcoholic apoptosis in HepG2 cells expressing CYP2E1. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 614-618.
- (96) Alvarez-Barrientos, A., Callaghan, R.C., Coecke, S., Martínez, A., Nieto, R., O'Connor, J.E., Prieto & P., Torralbo, P. Flow cytometry and confocal microscopy

- as an integrated alternative approach to the analysis of drug-metabolism dependent cytotoxicity. 18th European Workshop on Drug Metabolism, Valencia, Septiembre 2002.
- (97) Wrighton, S.A., Vandenbranden, M., Stevens, J.C., Shipley, L.A., Ring, B.J., Rettie, A.E. & Cashman, J.R.. (1993) In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development. *Drug Metab Rev* **25**, 453-484.
 - (98) Senda, C., Kishimoto, W., Sakai, K. Nagakura, A. & Igarashi, T. (1997) Identification of human cytochrome P-450 isoforms involved in the metabolism of brotizolam. *Xenobiotica* **27**, 913-922.
 - (99) Teramura, T., Fukunaga, Y., Van Hoogdalem, E.J., Watanabe, T. & Higuchi, S. (1997) Examination of metabolic pathways and identification of human liver cytochrome P-450 isozymes responsible for the metabolism of barnidipine, a calcium channel blocker. *Xenobiotica* **27**, 885-900.
 - (100) Chauret, N., Gauthier, A., Martin, J. & Nicoll-Griffith, D.A. (1997) In vitro comparison of cytochrome P-450-mediated metabolic activities in human, dog, cat, and house. *Drug Metab Dispos* **25**, 1130-1136
 - (101) Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda, K., Suzuki, H. & Sigiyama, Y. (1998) Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* **50**, 387-411.
 - (102) Iwatsubo, T., Hirota, N., Ooie, T., Suzuki, H., Shimada, N., Chiba, K., Ishizaki, T., Green, C.E., Tyson, C.A., & Sugiyama Y. (1997). Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol Ther* **73**, 147-171
 - (103) Iwatsubo, T., Suzuki, H., Shimada, N., Chiba, K., Ishizaki, T., Green, C.E., Tyson, C.A., Yokoi, T., Kamataki, T. & Sugiyama Y. (1997) Prediction of in vivo hepatic metabolic clearance of YM796 from in vitro data by use of human liver microsomes and recombinant P-450 isozymes. *J Pharmacol Exp Ther* **282**, 909-919.
 - (104) De Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S. & van den Anker, J.N. (1999) Cytochrome P-450 3A ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet* **37**, 485-505.
 - (105) Clarke, S.E. (1998) In vitro assessment of human cytochrome P-450. *Xenobiotica* **28**, 1161-1202
 - (106) Renwick, A.B., Mistry, H., Ball, S.E., Walters, D.G., Kao, J. & Lake, B.G. (1998) Metabolism of zaleplon by human hepatic microsomal cytochrome P-450 isoforms. *Xenobiotica* **28**, 337-348.
 - (107) Gelboin, H.V., Krausz, K.W., Gonzalez, F.J., Yang, T.J. (1999) Inhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P-450 enzymes: A new avenue for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 432-438.

- (108) McGinnity, D.F., Parker, A.J., Soars, M., & Riley, R.A. (2000). Automated definitions of the enzymology of drug oxidation by the major human drug metabolizing cytochromes P-450s. *Drug Metab Dispos* **28**, 1327-1334.
- (109) Bort, R., Macé, K., Boobis, A., Gómez-Lechón, M.J., Pfeifer, A. & Castell, J.V. (1999) Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochem Pharmacol* **58**, 787-796
- (110) Shimada, T., Mimura, M., Inoue, K., Nakamura, S., Oda, H., Ohmori, S. & Yamazaki, H. (1997) Cytochrome P-450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, guinea pigs, dogs, monkeys, and humans. *Arch Toxicol* **71**, 401-408.
- (111) Ohyama, K., Nakajima, M., Nakamura, S., Shimada, N., Yamazaki, H. & Yokoi, T. (2000) A significant role of human cytochrome P-450 2C8 in amiodarone N-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab Dispos* **28**, 1303-1310.
- (112) Dresser, G.K., Spence, J.D. & Bailey, D.G. (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P-450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* **38**, 41-57.
- (113) Rodrigues, A.D. & Wong, S.L. (1997) Application of human liver microsomes in metabolism-based drug-drug interactions: in vitro-in vivo correlations and the Abbot Laboratories experience. *Adv Pharmacol* **43**, 65-101.
- (114) Bapiro, T.E., Egnell, A.C., Hasler, J.A. & Masimirembwa, C.M. (2001) Application of higher throughput screening (HTS) inhibition assays to evaluate the interaction of antiparasitic drugs with cytochrome P-450s. *Drug Metab Dispos* **29**, 30-35
- (115) Pichard, L., Fabre, I., Fabre, G., Domergue, J., Saint Aubert, B., Mourad, G. & Maurel, P. (1990) Cyclosporin and drug interactions. Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cylosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **18**, 595-606.
- (116) Ronis, M.J. & Ingelman-Sundberg, M. (1999) Induction of human drug-metabolizing enzymes: mechanisms and implications. In: Woolf TF, editor. *Handbook of drug metabolism*. New York: Marcel Dekker, Inc, pp. 239-262.
- (117) Donato, M.T., Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (1995) Effect of model inducers on cytochrome P-450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* **23**, 553-558.
- (118) Li, A.P., Maurel, P., Gómez-Lechón, M.J., Cheng, L.C. & Jurima-Romet, M. (1997) Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P-450 induction. *Chem-Biol Interac* **107**, 5-16.

- (119) McCune, J.S., Haeke, R.L. LeCluyse, E.L., Gillenwater, H.H., Hamilton, O., Ritchie, J. & Lindley, C. (2000). In vivo and in vitro induction of human cytochrome P-4503A4 by dexamethasone. *Clin Pharmacol Ther* **68**, 356-366.
- (120) Lu, C. & Li, A.P. (2001) Species comparison in P-450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P-450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem Biol Interact* **134**, 271-281.
- (121) Meunier, V., Bourrie, M., Julian, B., Marti, E., Guillou, F., Berger, Y. & Fabre, G. (2000) Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica* **30**, 589-607.
- (122) Sumida, A., Yamamoto, I., Zhou, Q., Moriskai, T. & Azuma J. (1999) Evaluation of induction of CYP3A mRNA using the HepG2 cell line and reverse transcription-PCR. *Biol Pharm Bull* **22**, 61-65.
- (123) Sumida, A., Fukuen, S., Yamamoto, I., Matsuda, H., Naohara, M. & Azuma J. (2001) Quantitative analysis of constitutive and inducible CYPs mRNA expression in the HepG2 cell line using reverse transcription-competitive PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 756-760.
- (124) Gerbal-Chaloin, S., Pascussi, J.M., Pichard-Garcia, L., Daujat, M., Waechter, F., Fabre, J.M., Carrere, N. & Maurel, P. (2001) Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* **29**, 242-251.