

## CAPÍTULO 3

# EL METABOLISMO DE FÁRMACOS, GENERACIÓN DE METABOLITOS REACTIVOS Y SU PAPEL EN EL ORIGEN DE LAS REACCIONES INMUNOLÓGICAS A FÁRMACOS

*José. V. Castell*

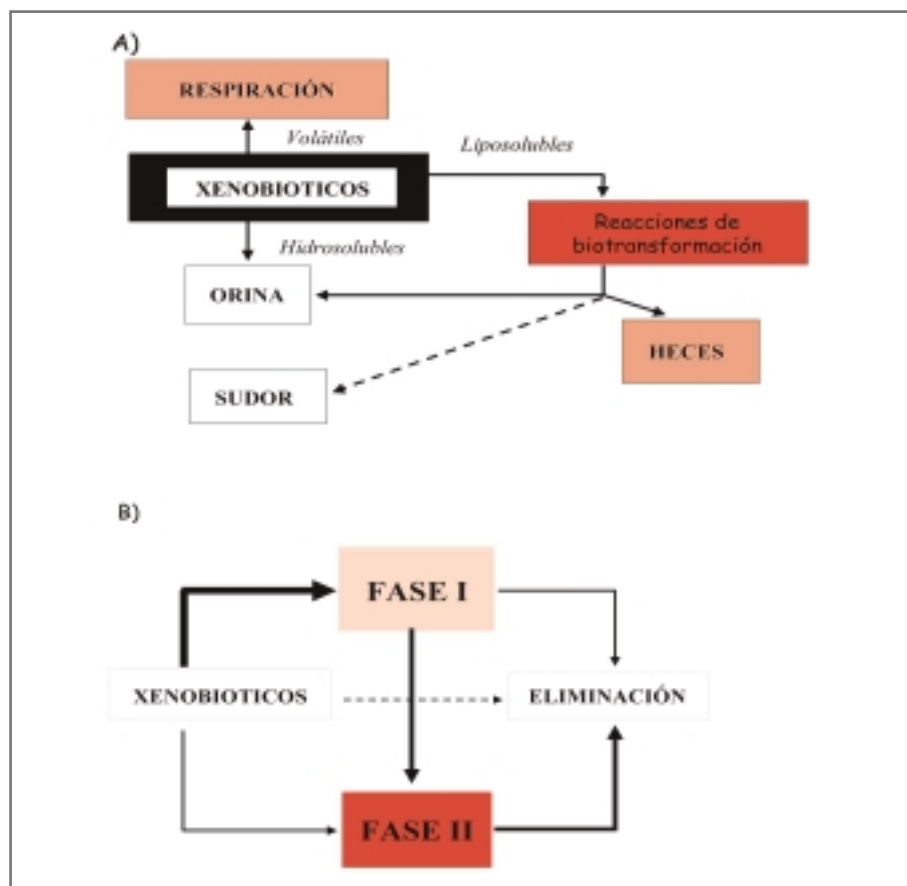
### EL PORQUÉ DE LA EXISTENCIA DEL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

Una capacidad metabólica singular que los animales superiores y el ser humano han adquirido en el transcurso de la evolución, es la de metabolizar compuestos extraños para el organismo, sin relevancia para su metabolismo energético, para facilitar su eliminación del organismo. Estos compuestos, denominados xenobióticos, se encuentran presentes en los alimentos, en el medio ambiente, con lo que inevitablemente entramos en contacto con ellos. Suelen ser de naturaleza lipofílica, por lo que tienen una tendencia natural a acumularse en los entornos lipídicos del organismo. A diferencia de los compuestos volátiles (cuya eliminación se facilita mediante intercambio gaseoso en los pulmones) o los hidrosolubles (filtración renal), la eliminación de los compuestos lipófilos es mucho más problemática, por lo que su acumulación en el organismo puede llegar a desencadenar fenómenos de toxicidad.

El hígado contribuye de forma mayoritaria a la función de facilitar la eliminación de los xenobióticos lipófilos, mediante un conjunto de reacciones, globalmente denominadas de biotransformación, en las que se modifica de manera más o menos compleja la estructura química de los xenobióticos para aumentar su hidrosolubilidad y así facilitar su eliminación. Intestino, pulmones, piel y riñón siguen en importancia al hígado, en cuanto a su capacidad para

metabolizar xenobióticos. También contribuyen a estos procesos de biotransformación los microorganismos saprofitos que colonizan el tracto intestinal.

El resultado final de la biotransformación de un xenobiótico es la formación de metabolitos que, por su menor lipofilicidad son más solubles en agua, más fácilmente eliminables por vía renal o biliar y, por lo general, menos tóxicos (Fig. 1). Es por ello por lo que a estas reacciones se les denomina también reacciones de detoxificación.

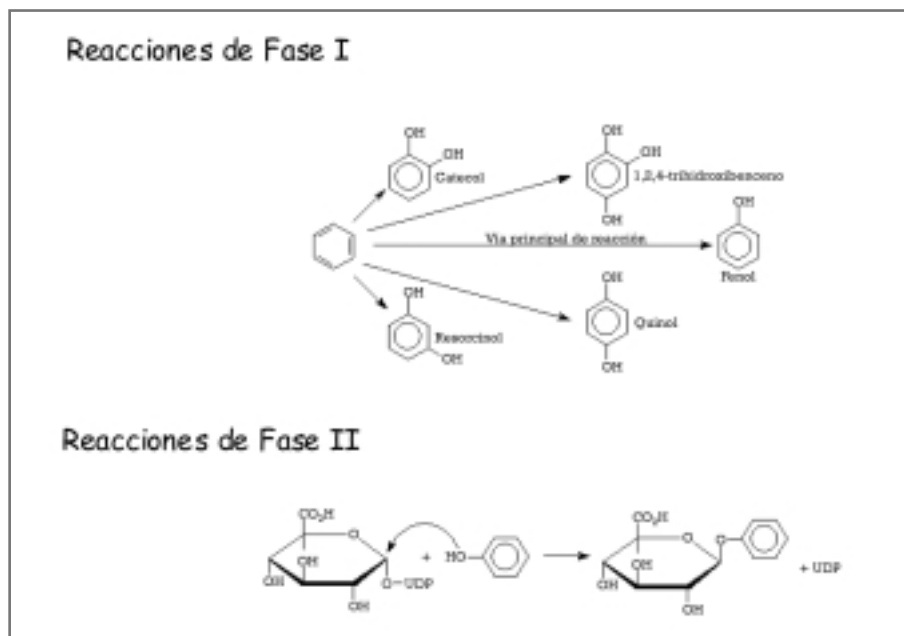


**Fig. 1.** El fenómeno de la biotransformación de xenobióticos. A) Los xenobióticos (fármacos) con los que entramos en contacto solo pueden eliminarse con facilidad del organismo si son volátiles o hidrosolubles. B) Los compuestos lipófilos, cuya tendencia es la de acumularse en los entornos lipídicos del organismo, necesitan sufrir reacciones de biotransformación (de Fase I y/o Fase II) que los hagan hidrosolubles para facilitar su eliminación renal o biliar-fecal.

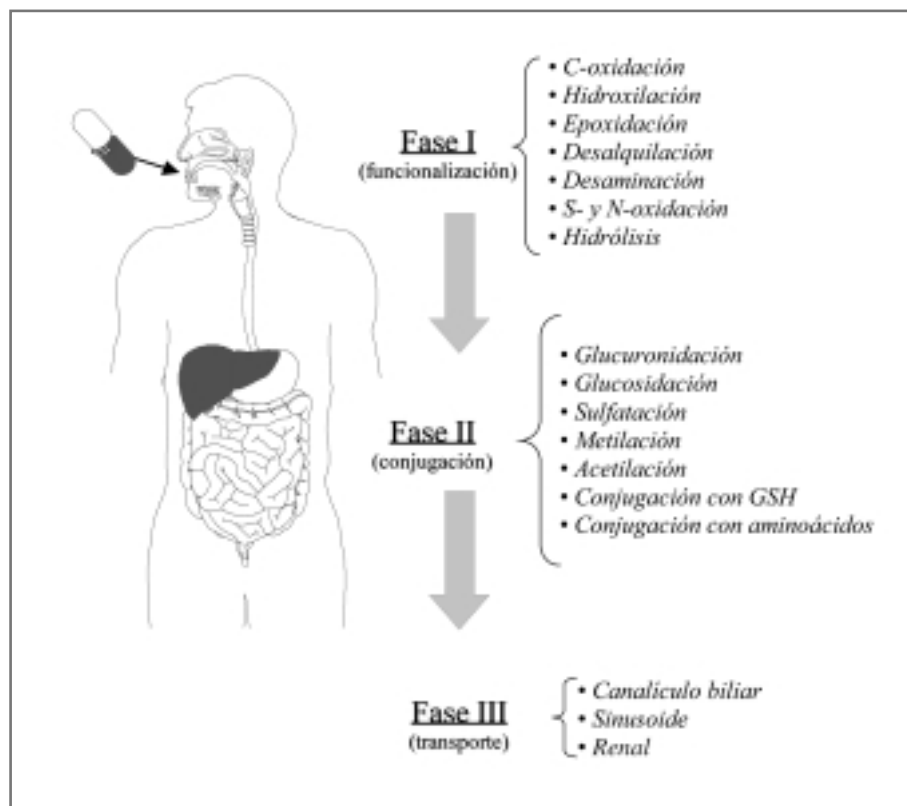
Los fármacos son xenobióticos. En su tránsito a través del organismo, son absorbidos y distribuidos a través de los fluidos corporales hasta alcanzar los tejidos y órganos diana, en donde ejercen su acción farmacológica y farmacodinámica específica. Solo una pequeña parte alcanza el tejido/receptor/enzima diana mientras que la mayor parte sufre modificaciones (metabolizados) y finalmente son eliminados. Los fármacos pues, son susceptibles de ser metabolizados mediante las reacciones de biotransformación lo que facilita asimismo su eliminación del organismo.

## ETAPAS DEL METABOLISMO Y ENZIMAS IMPLICADAS

El proceso de biotransformación se subdivide en etapas o fases (Fig.2a y 2b). Bajo la denominación de Fase I se engloban procesos químicos de distinta



**Fig. 2a.** Reacciones de Fase I y II: metabolismo del benceno. El benceno, sustancia lipófila, muy poco soluble en agua, sufre en el organismo distintas reacciones de oxidación catalizadas por CYP1A1 y CYP2E1, dando origen a derivados fenólicos (reacción de Fase I). Dichos metabolitos son ciertamente más polares y reactivos, pero no poseen la suficiente hidrosolubilidad que garantiza una fácil eliminación. El fenol, metabolito mayoritario, es conjugado con ácido glucurónico (reacción de Fase II) lo que aumenta notablemente su hidrosolubilidad y es fácilmente eliminado por vía renal.



**Fig. 2b.** Etapas en la biotransformación de xenobióticos. Los xenobióticos (compuestos foráneos, ajenos al metabolismo celular), sufren distintos procesos en el organismo, encaminados a facilitar su eliminación y evitar su acumulación y potenciales efectos tóxicos. Los procesos se agrupan en *fases*. En la *Fase I*, los xenobióticos sufren reacciones de funcionalización de distinta naturaleza, destinadas a introducir nuevos grupos funcionales en la molécula. En la *Fase II*, los metabolitos son conjugados con moléculas endógenas, lo que finalmente facilita notablemente su eliminación del organismo (*Fase III*).

naturaleza (principalmente oxidación, oxigenación, reducción e hidrólisis, así como, de-aliquilaciones, deshalogenaciones), cuyo resultado es la modificación química de las moléculas con la aparición de nuevos grupos funcionales. El metabolito resultante es más polar, más reactivo, y sensiblemente menos lipófilo. Estos procesos son mayoritariamente catalizados por enzimas presentes en la fracción microsomal del homogenado celular. Su mayor concentración y diversidad se encuentra en los hepatocitos.

Con frecuencia, los metabolitos generados en la Fase I se unen covalentemente a moléculas endógenas de la célula tales como ácido glucorónico, glutatión, sulfato y aminoácidos generando conjugados (Reacciones de Fase II). Este proceso conlleva un considerable aumento de la hidrosolubilidad y, por lo general, también una disminución de su actividad farmacológica y/o toxicológica. Estas reacciones están catalizadas por enzimas presentes en la fracción citosólica celular.

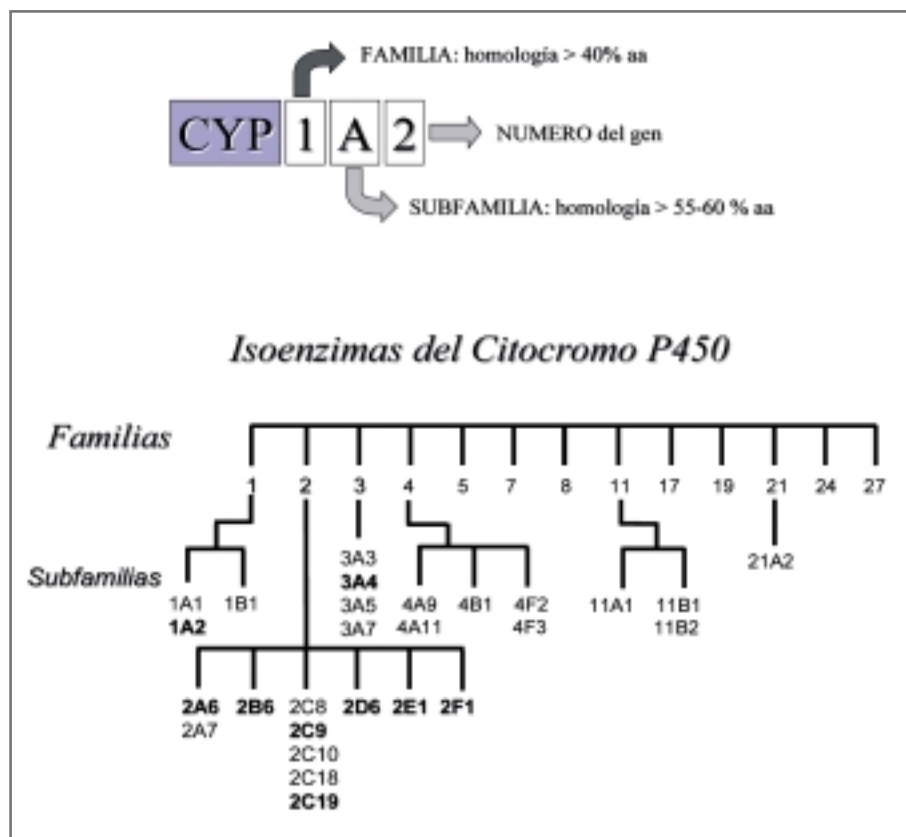
Ambos procesos facilitan la eliminación renal o biliar de los metabolitos (Fase III), pero no todos los xenobióticos necesariamente sufren un proceso de fase I seguido de otro de fase II. El objetivo principal de las reacciones de biotransformación es el modificar la hidrofobicidad de un compuesto de manera que se facilite su eliminación y, en ocasiones, tal objetivo se alcanza con solo reacciones de fase I, solo de fase II, o ambas. Desde una perspectiva celular, la primera opción es que un fármaco sufra solo reacciones de conjugación, porque son seguidas de una fácil eliminación de los conjugados. Solo cuando dicha reacción no es posible (por ejemplo porque el compuesto carece de grupos funcionales necesarios, a través de los cuales puede conjugarse), y dada su naturaleza lipófila tiende a acumularse en la célula, hay una opción real para que éste sufra también reacciones de fase I (Fig. 1).

Las reacciones de fase I son catalizadas por un grupo de enzimas que se encuentran tanto en el citosol como en el retículo endoplásmico de las células. En la fracción microsomal destaca sobretodo la presencia de una actividad monooxigenasa singular. En la fracción citosólica celular se encuentran otras actividades enzimáticas, no oxidativas, incluidas también en las reacciones de fase I tales como las esterasas, reductasas, deshidrogenasas e hidrolasas, etc.

Las monooxigenasas son enzimas que hacen uso del oxígeno molecular, del que utilizan uno de los átomos para oxigenar al xenobiótico (oxidación + incorporación de oxígeno a una molécula orgánica), al tiempo que el otro átomo termina reducido a  $H_2O$ . Existen dos grandes familias de oxigenasas en el hígado: las dependientes de citocromo P450 (denominadas P450, CYP) y las flavín monooxigenasas (denominadas FMO). A diferencia de las segundas, la acción de los CYP requiere de la coparticipación de una enzima auxiliar (CYP-reductasa), a través de la cual fluyen los electrones necesarios para la reducción de uno de los átomos de oxígeno hacia la formación de  $H_2O$ .

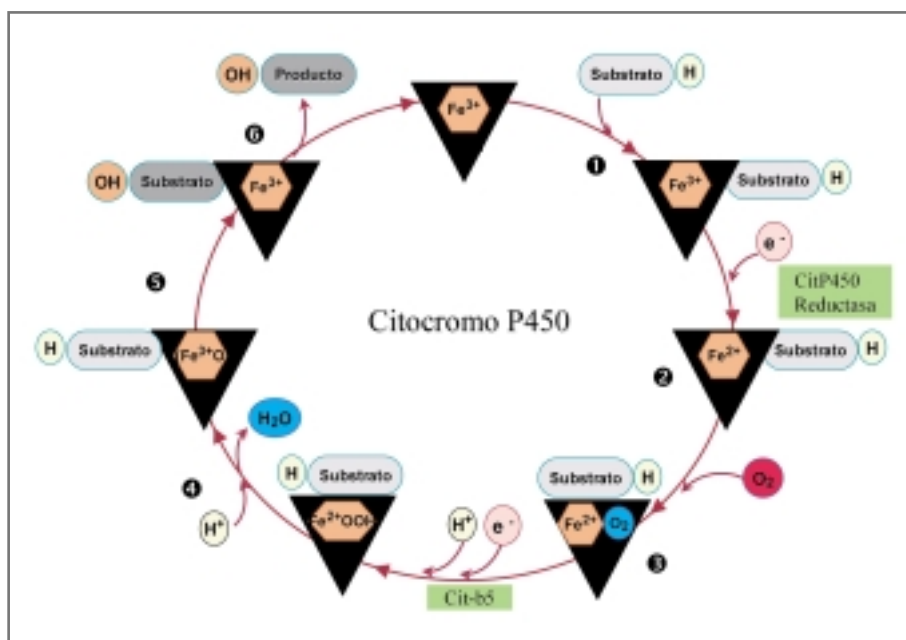
Las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (denominadas de manera abreviada P450) es un conjunto de hemoproteínas de peso molecular alrededor de los 50 KDa. Los genes que las codifican (denominados CYP, de manera abreviada) son posiblemente los más estudiados y mejor conocidos, dentro de las enzimas de

metabolización de fármacos. El citocromo P450 constituye una familia relativamente extensa de genes (CYP) agrupados en varias familias y subfamilias en función del grado de homología de los genes que las codifican (Fig. 3). En el ser humano existen 16 familias y 29 subfamilias, con un total de unos 50 genes CYP identificados. Los genes pertenecientes a las familias 1, 2 y 3, son los que están implicados, de manera más directa, en el metabolismo de los fármacos. En concreto, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4 son responsables del metabolismo de la gran mayoría de los fármacos actualmente en uso clínico.



**Fig. 3.** Nomenclatura y clasificación de los principales CYP humanos. Existen en el genoma humano alrededor de 50 genes CYP. La clasificación de los genes CYP en familias y subfamilias se basa en el grado de homología existente en la secuencia de aminoácidos. Alrededor de 10 genes CYP, que codifican por sendas enzimas P450, son relevantes en el metabolismo de fármacos (realzados en negrita).

El ciclo catalítico de citocromo P450 implica varias etapas sucesivas. Comienza por la incorporación del xenobiótico al centro catalítico de la enzima que en ese momento tiene el átomo de Fe del grupo prostético hemo, en estado oxidado ( $\text{Fe}^{+3}$ ). La catálisis por P450 transcurre con el concurso del citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH, que suministra el electrón necesario para la reducción a  $\text{Fe}^{+2}$ . Es en ese momento, cuando el oxígeno molecular entra en el centro catalítico de la enzima asociándose al grupo hemo. El electrón del  $\text{Fe}^{+2}$  es transferido a la molécula de oxígeno. Un segundo electrón, canalizado a través del citocromo b5, permite reducir parcialmente a la molécula de oxígeno unida que, junto con un  $\text{H}^+$ , libera uno de sus átomos en forma de  $\text{H}_2\text{O}$ . El otro átomo de oxígeno, todavía unido al centro ca-



**Fig. 4.** Mecanismo de la catálisis del citocromo P450. La reacción de monooxigenación catalizada por el P450 implica varios pasos sucesivos. El citocromo se encuentra en estado  $\text{Fe}^{+3}$ , y en estas condiciones se une el xenobiótico (1). El citocromo es reducido ( $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ ) gracias al citocromo P450 reductasa que recibe sus electrones a partir de NADPH (2). Es en ese momento cuando el oxígeno molecular entra en el centro catalítico de la enzima asociándose al grupo hemo (3). Un segundo electrón canalizado a través del citocromo b5 permite reducir parcialmente a la molécula de oxígeno unida que, junto con un  $\text{H}^+$ , libera uno de sus átomos en forma de  $\text{H}_2\text{O}$  (4). El otro átomo de oxígeno oxida al xenobiótico que se encuentra en el centro catalítico de la enzima (5) y finalmente se libera de la enzima (6).

talítico, oxida al xenobiótico que allí encuentra. El compuesto oxidado se libera de la enzima. La enzima puede iniciar ahora un nuevo ciclo de catálisis (Fig. 4). Los citocromos son enzimas que están implicados en un importante número de reacciones químicas (Fig. 5). Poseen una cierta permisividad en cuanto al sustrato sobre el que actúan, de manera que sus especificidades se solapan asegurando que virtualmente cualquier xenobiótico sea metabolizado por ellos.

Las *flavín-monooxigenasas* ocupan el segundo lugar en importancia en cuanto a las oxidaciones metabólicas. Estas enzimas están implicadas en

<b>Hidroxilación aromática</b>	
<b>Hidroxilación alifática</b>	$R-CH_3 \xrightarrow{[OH]} R-CH_2-OH + H^+$
<b>N-Dealquilación</b>	$R-NH-CH_3 \xrightarrow{[OH]} [R-NH-CH_2OH] \longrightarrow RNH_2 + CH_2O$
<b>O-Dealquilación</b>	$R-O-CH_3 \xrightarrow{[OH]} [R-O-CH_2OH] \longrightarrow ROH + CH_2O$
<b>Deanimación</b>	$R-CH(NH_2)-CH_3 \xrightarrow{[OH]} R-C(OH)(NH_2)-CH_3 \longrightarrow R-CO-CH_3 + NH_3$
<b>N-Oxidación</b>	$(CH_3)_2N \xrightarrow{[OH]} [(CH_3)_2NOH]^+ \longrightarrow (CH_3)_2NO + H^+$
<b>Sulfoxidación</b>	$R-S-R' \xrightarrow{[OH]} [R-SOH-R']^+ \longrightarrow R-SO-R' + H^+$

Fig. 5. Principales tipos de reacciones catalizadas por el citocromo P450. Los citocromos son enzimas de una cierta baja especificidad en cuanto al sustrato, pero que catalizan un número de reacciones definidas de oxigenación.



la oxigenación de compuestos nitrogenados (con la formación de N-óxidos), organofosforados y organosulfurados. Existen distintas isoformas que se localizan mayoritariamente en el hígado, pero también en pulmón. A diferencia de los citocromos, son enzimas que poseen como coenzima flavina-adenosina dinucleótido (FAD) y son capaces de utilizar directamente NADPH como cofactor para reducir uno de los dos átomos de oxígeno. Su mecanismo de acción catalítico es singular: a diferencia de los citocromos P450, la interacción del xenobiótico con la enzima es mucho más laxa. La oxidación se produce a través de un intermedio reactivo oxidante generado en el mismo centro catalítico de la enzima (hidroperoxi-flavin monooxigenasa) que oxida al fármaco.

Finalmente existen otras reacciones de oxidación, catalizadas por diversas enzimas. En primer lugar las aminooxidadas MAO (monoaminooxidasa) y DAO (diaminooxidasa), encargadas de la desaminación oxidativa de substratos endógenos (la mayor parte de aminas biógenas, tales como dopamina, serotonina, norepinefrina y epinefrina). En segundo lugar la xantina oxidasa, que convierte hipoxantina en xantina y finalmente en ácido úrico, pero que es capaz de oxidar también distintos fármacos (teofilina, 6-mercaptopurina, alopurinol).

Reacciones de oxidación son también las deshidrogenaciones catalizadas por alcohol y aldehído deshidrogenasas, enzimas poco específicas que se encuentran abundantes en el citosol de los hepatocitos, y participan en el metabolismo de alcoholes de cadena corta, principalmente etanol.

Las reacciones de reducción son catalizadas fundamentalmente por la NADPH citocromo reductasa microsomal, así como por la enzima citosólico diaforasa. Existen actividades nitro- y azo-reductasas en las que participan enzimas citosólicas, así como la flora bacteriana, lo que se pone de manifiesto en aquellos fármacos que sufren un ciclo enterohepático.

Con relación a las reacciones de hidrólisis, el hígado posee una importante actividad esterásica con al menos tres familias de esterasas identificadas, en relación al metabolismo de los xenobióticos (esterasas tipos A, B y C).

Finalmente, por su importancia cabe destacar las reacciones de hidrólisis de ésteres y de amidas, y las de hidratación. Dentro de esta última, cabe señalar la catalizada por la epoxidohidrolasa, enzima que convierte un epóxido en un diol por su relevancia en la detoxificación de epóxidos aromáticos cancerígenos.

Las reacciones de fase II facilitan la conjugación de los xenobióticos, o de los metabolitos generados en las reacciones de fase I, con moléculas endógenas tales como el ácido glucorónico, glutatión, sulfato o aminoácidos. Los conjugados con ácido glucorónico son formados por la enzima UDP-glucuronil transferasa, de la que existen varias isoformas con distintas especificidades en cuanto a sustrato. La enzima utiliza un éster uridíndifosfato del ácido glucorónico (UDPGA), como donador de ácido glucorónico y es capaz de formar O-, N- y S-glucuronatos. En el hígado predomina la isoforma UGT1A1, pero también existe actividad UGT en la mayor parte de los tejidos.

La conjugación con glutatión está catalizada por la glutatión-transferasa (GST), enzima de la que se conocen seis isoformas que difieren en cuanto a la especificidad por el sustrato y su distribución tisular. La enzima usa directamente GSH, formando tioéteres. Los conjugados con glutatión son eliminados directamente por la bilis, y en menor medida por la orina. En este último caso, antes de ser excretado, el conjugado con GSH sufre un proceso metabólico por el que secuencialmente es eliminado el resto  $\gamma$ -glutámico, la glicina, de la molécula de GSH y finalmente es acetilado el grupo amino de la cisteína, dando origen a derivados del ácido mercaptúrico que son los metabolitos que finalmente aparecen en la orina. Existe actividad GST en aquellos tejidos que están en contacto con el O<sub>2</sub>, o bien en los que existe un metabolismo oxidativo importante.

En el hígado tienen también lugar otras reacciones de fase II. Cabe mencionar la conjugación con sulfato (donador PAPS, fosfoadenosil-fosfo-sulfato), la conjugación con aminoácidos (principalmente glicina, cisteína), y la N-acetilación catalizada por la NAT-2.

## **BIOTRANSFORMACIÓN, BIOACTIVACIÓN Y DETOXIFICACIÓN**

Por lo general, las reacciones de biotransformación modifican los fármacos para convertirlos en metabolitos más hidrosolubles y, en definitiva, más fácilmente eliminables. Es cierto que dichas modificaciones químicas y el aumento de la solubilidad conllevan una disminución del potencial tóxico, razón por la cual estos procesos se les conoce también

con el nombre de reacciones de detoxificación. Sin embargo, hay casos en los que, como consecuencia del propio metabolismo del fármaco, se originan especies químicamente reactivas capaces de interactuar con biomoléculas de la célula. Este escenario puede presentarse como consecuencia de reacciones catalizadas por los citocromos P450. En el transcurso de las reacciones de oxidación en las que intervienen, se pueden generar intermedios electrófilos reactivos; compuestos ávidos de electrones capaces de abstraerlos de otras biomoléculas, capaces de reaccionar con nucleófilos presentes en la célula y/o unirse covalentemente a macromoléculas. El resultado es por tanto una reacción de bioactivación del compuesto.

Además de las especies reactivas derivadas del propio fármaco, también pueden generarse especies reactivas de oxígeno capaces de iniciar reacciones radicalarias en cadena de peroxidación de lípidos, todo ello con el resultado de daño celular. La reacción catalizada por el P450 implica una reducción parcial de la molécula de  $O_2$ . Ello conlleva un considerable aumento de la reactividad, que la propia molécula de oxígeno carece. Si la activación del oxígeno queda confinada en el centro catalítico de la enzima, la reacción transcurre hasta la oxidación del fármaco sin mayores incidencias. Sin embargo, en ocasiones las reacciones pueden no completarse totalmente, bien por impedimentos estéricos del propio sustrato, bien porque alguna de las isoformas del P450, concretamente CYP2E1, son enzimas que dejan escapar con relativa facilidad intermedios reactivos, generando anión superóxido ( $O_2^{-1}$ ), peróxido ( $O_2^{-2}$ ), e incluso radicales derivados del propio fármaco (Figs. 6a, b y c).

Para contrarrestar estos efectos deletéreos, la mayoría de las células con capacidad para metabolizar fármacos (y en particular los hepatocitos), poseen eficaces mecanismos de defensa. Entre ellos cabe señalar enzimas especializadas capaces de conjugar dichos intermedios (por ejemplo GST), moléculas reductoras (GSH) y mecanismos de reparación de ADN y proteínas.

La capacidad de biotransformación y los mecanismos de defensa no se expresan por igual en los diferentes tejidos. El hígado, en concreto, es un órgano especialmente capacitado para el metabolismo de xenobióticos y, en paralelo, está bien dotado de recursos para minimizar el efecto que las reacciones de biotransformación puedan tener. Pero ello no es así en

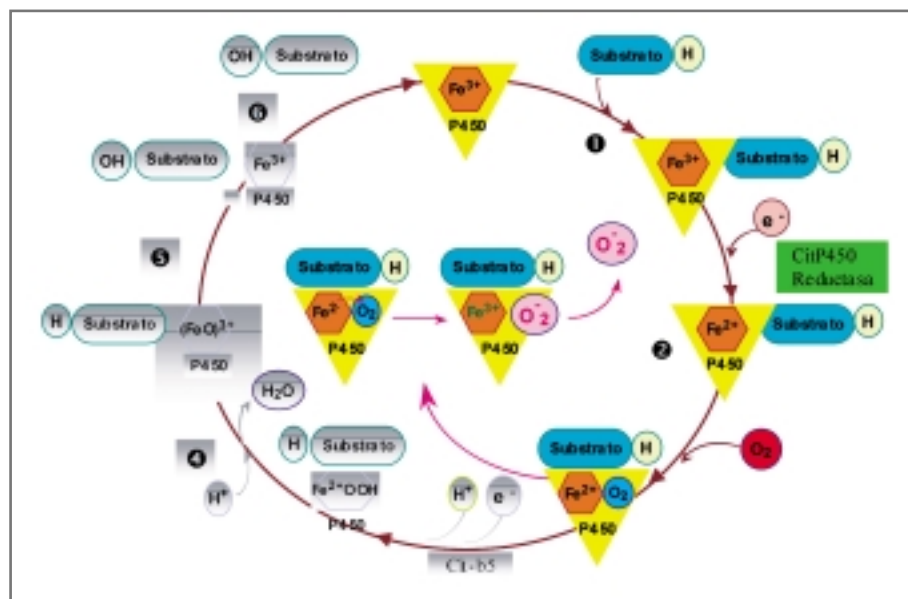


Fig. 6a.

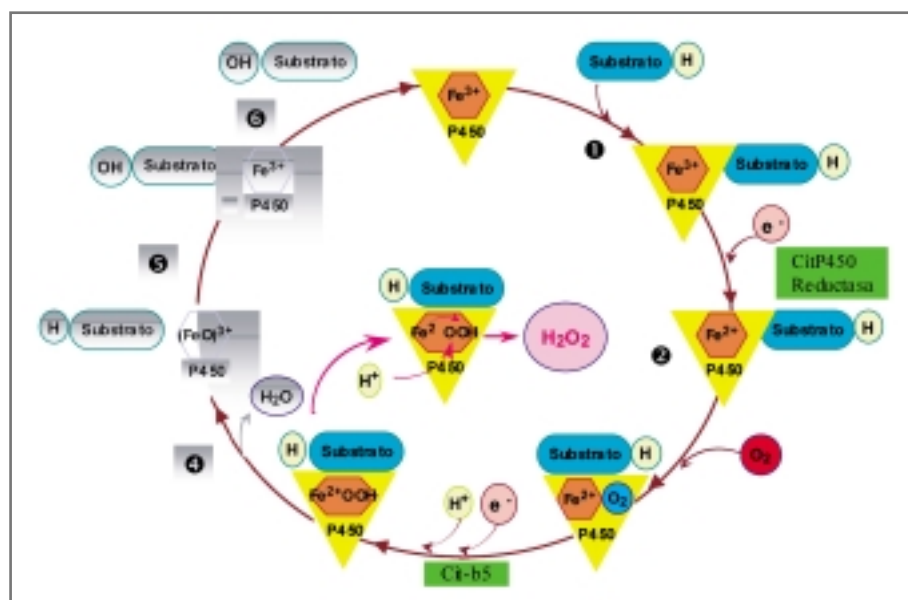


Fig. 6b.

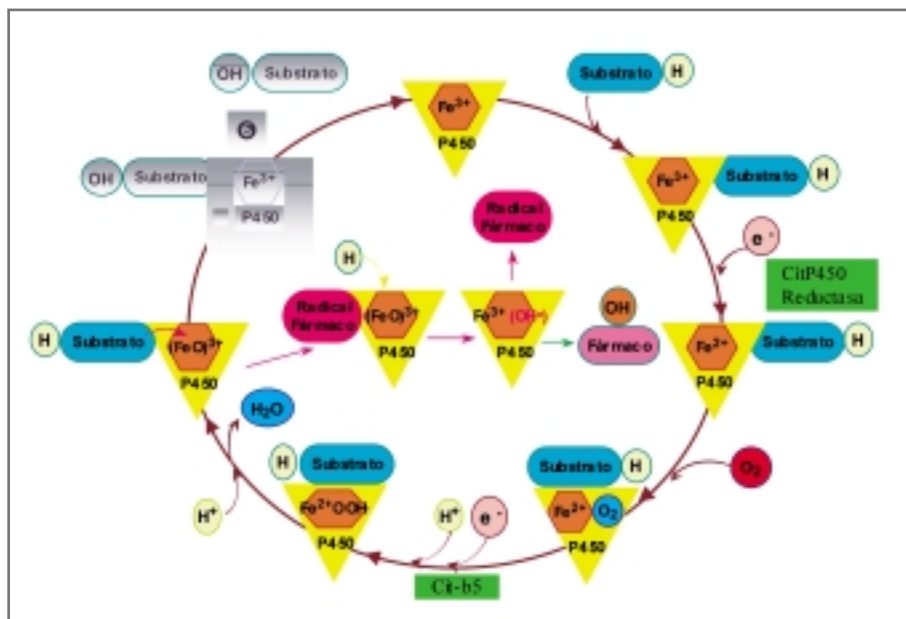
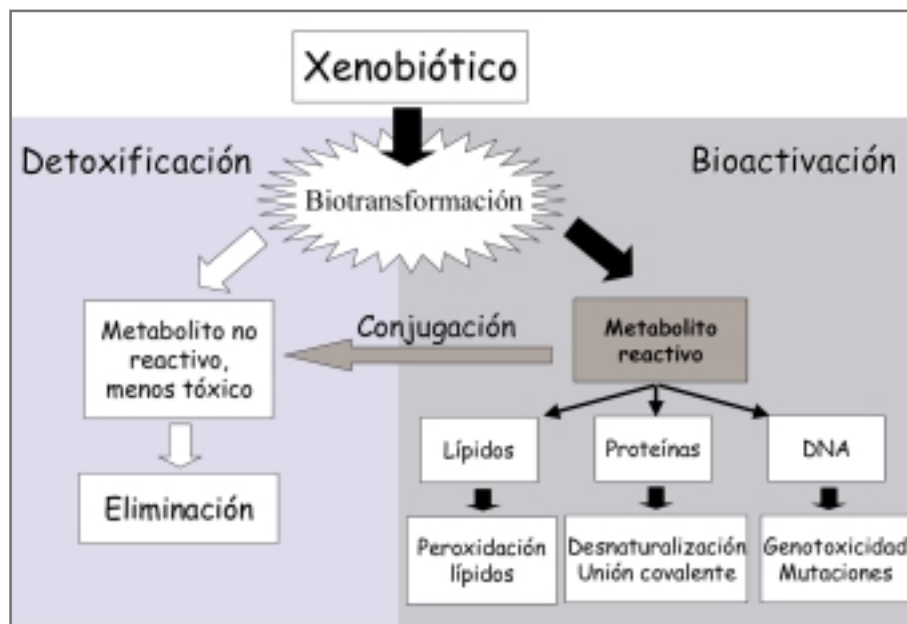


Fig. 6c.

Fig. 6. Generación de metabolitos reactivos en el transcurso de las reacciones catalizadas por el citocromo P450. La reacción catalizada por el P450 implica una reducción parcial de la molécula de  $O_2$  que conlleva un considerable aumento de su reactividad. Si la activación del oxígeno queda confinada en el centro catalítico de la enzima, la reacción transcurre hasta la oxidación del fármaco sin mayores incidencias. Sin embargo, en ocasiones las reacciones pueden no completarse totalmente, bien por impedimentos estéricos del propio sustrato, bien porque alguna de las isoformas del P450, son enzimas que dejan escapar con relativa facilidad intermedios reactivos, generando anión superóxido  $O_2^{-1}$  (Panel A), peróxido  $O_2^{-2}$  (Panel B), e incluso radicales derivados del propio fármaco (Panel C).

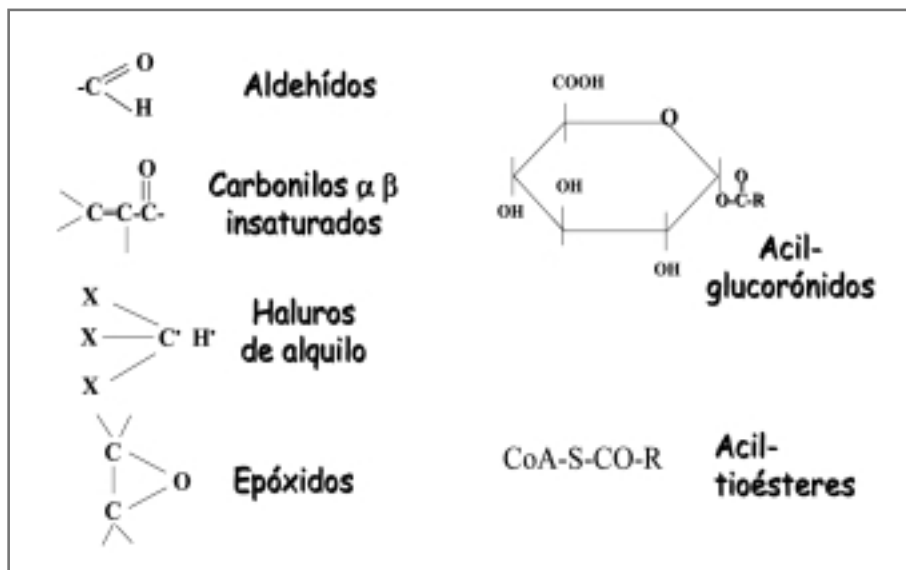
otros tejidos, en los que, junto a una pequeña pero significativa actividad enzimática de metabolización de fármacos, no existe una eficaz protección frente a los posibles intermedios reactivos que se originen. Es, en última instancia, el balance entre la bioactivación y los mecanismos de defensa, lo que determina si la biotransformación de un fármaco resultará en un proceso de detoxificación, o por el contrario en daño celular en una localización tisular determinada (Fig. 7).



**Fig. 7.** Biotransformación, bioactivación y detoxificación. Aunque en la mayoría de los casos la biotransformación de un compuesto va ligado a una disminución de su potencial tóxico, como consecuencia del metabolismo, se pueden originar especies más reactivas capaces de interactuar con la biomoléculas celulares, unirse covalentemente a macromoléculas o iniciar en la célula reacciones radicalarias en cadena, todo ello con el resultado de daño celular (bioactivación). Las células poseen mecanismos de defensa para contrarrestar dichos metabolitos reactivos. En última instancia, es el balance entre la bioactivación, y los mecanismos de defensa, lo que determina si la biotransformación de un fármaco resultará en un proceso de detoxificación, o en un daño celular.

## FORMACIÓN DE ADUCTOS COVALENTES, COMO CONSECUENCIA DEL METABOLISMO Y LA BIOACTIVACIÓN DE FÁRMACOS

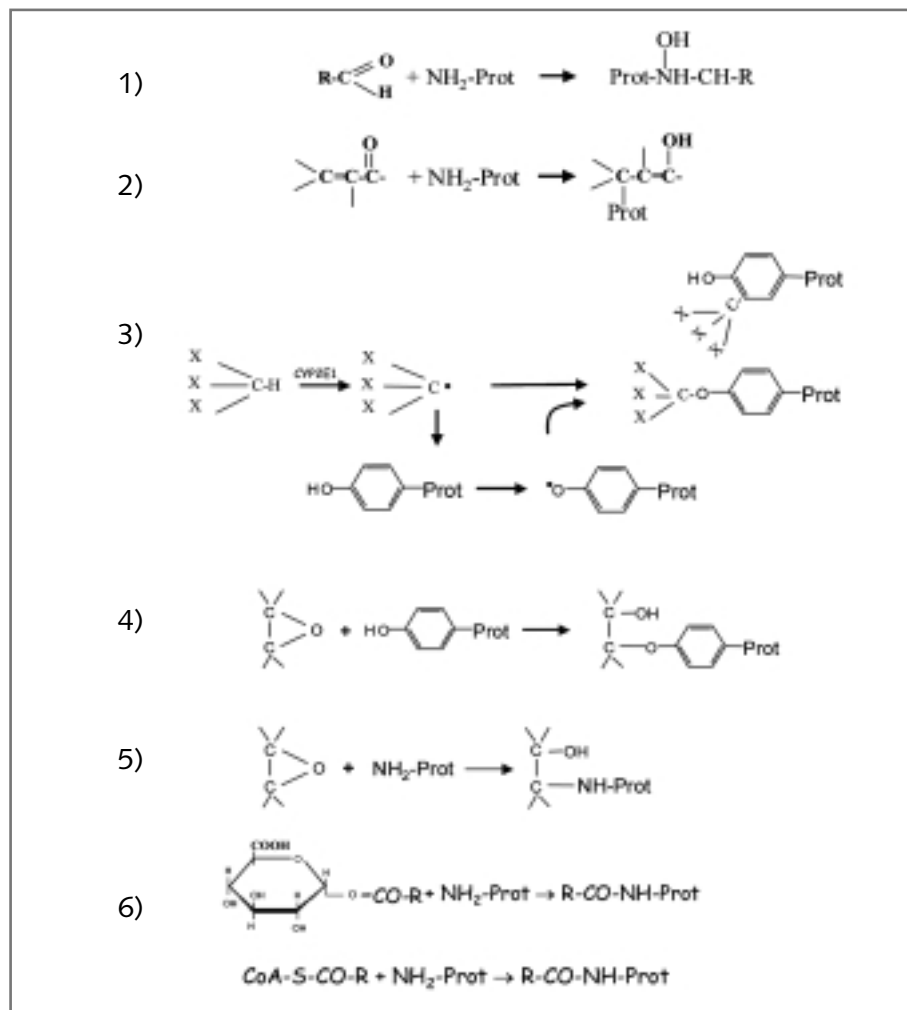
En el curso de la biotransformación de los fármacos, tanto en reacciones de fase I como de fase II, pueden generarse nuevos grupos funcionales que confieran al metabolito generado la suficiente capacidad para reaccionar con macromoléculas celulares formando aductos estables. Entre las subestructuras más frecuentemente implicadas cabe destacar: carbonilos  $\alpha,\beta$  insaturados, aldehídos, epóxidos, y algunos ésteres activos como son los conjugados con ácido glucorónico, o con sulfato (Fig. 8a).



**Fig. 8a.** Intermedios reactivos y unión covalente de fármacos a biomoléculas. En el curso de la biotransformación de xenobióticos pueden formarse especies químicas más reactivas que el propio fármaco (electrófilos, radicales, conjugados inestables), capaces de reaccionar con macromoléculas celulares (proteínas y ácidos nucleicos) formando aductos estables.

Las proteínas, en primera instancia, y en menor medida los ácidos nucleicos, son las dianas celulares más habituales de la unión covalente de los fármacos. El grado de formación de aductos covalentes fármaco-macromolécula depende por lo general de: a) la proporción del fármaco transformado en metabolito reactivo; b) su vida media, y con ello su mayor o menor difusión desde su lugar de formación; y c) la capacidad para reaccionar con grupos funcionales habitualmente presentes en las macromoléculas diana (proteínas). Se trata, generalmente, de grupos amino ( $\epsilon\text{-NH}_2$  de lisina), grupos fenólicos (tirosina) e imidazol (histidina) (Fig. 8b).

La mayor parte de los aductos fármaco-proteína se forman con metabolitos reactivos generados en el transcurso de reacciones de fase I. Sin embargo, pueden también formarse aductos con conjugados inestables, resultado de reacciones de fase II. Así, algunos derivados de ácidos carboxílicos, al conjugarse con ácido glucurónico, dan origen a derivados acil-glucoronidos capaces de reaccionar con grupos amino presentes en las proteínas. De la misma manera, la formación de acil-CoA tioésteres catalizados por la acil-CoA sintetasa, puede



**Fig. 8b.** Reactividad de intermedios reactivos con las proteínas. Grupos funcionales implicados. Los grupos funcionales generados en el transcurso de las reacciones de biotransformación pueden dar origen a aductos covalentes fármaco-proteína. Aldehídos (1), carbonilos  $\alpha,\beta$  insaturados (2), radicales derivados de haluros del alquilo (3), epóxidos (4), glucuronatos (5) y acil tioésteres (6), reaccionan fácilmente con las proteínas a través de grupos nucleófilos presentes en ellas, principalmente grupos amino ( $\epsilon\text{-NH}_2$  de lisina), grupos fenólicos (tirosina) e imidazol (histidina).

dar origen a tioésteres inestables capaces de reaccionar con grupos amino de las proteínas (Fig. 8b).



La localización subcelular de los aductos formados depende tanto del lugar de formación (enzimas implicadas en la bioactivación y su localización) como del mecanismo de generación, y de la naturaleza y reactividad intrínseca del intermedio reactivo formado. Así, en el retículo endoplásmico, lugar de la ubicación del complejo enzimático P450, es donde en primera instancia se localizan muchos de los aductos fármaco-proteína. Las propias isoformas del P450, ancladas en la membrana del retículo endoplásmico, son con frecuencia las proteínas diana. Ello parece ser la consecuencia lógica de la proximidad al lugar de formación de las especies reactivas.

Cuando el metabolito reactivo generado posee una vida media más larga y una reactividad más moderada que le permite difundir del lugar de su formación, otras proteínas del citosol, e incluso de la membrana pueden verse involucradas. De esta manera, proteínas celulares, aparentemente no relacionadas con el fenómeno de la biotransformación han sido identificadas como dianas en la formación de aductos de ciertos fármacos. No cabe interpretarlo sino como que dichas proteínas presentan regiones o dominios particularmente accesibles o capaces de reaccionar de manera preferente con dichos metabolitos activos.

Aunque, con frecuencia, la unión covalente es un fenómeno concomitante con el fenómeno tóxico, solo en algunas ocasiones ha podido establecerse una clara relación entre unión covalente y lesión celular específica. Tal es el caso de la toxicidad hepática por bromobenceno y paracetamol, en las que parece existir una clara y directa correlación entre el grado de unión covalente y la magnitud del daño celular, consecuencia de las alteraciones sufridas por proteínas clave de la célula. Sin embargo, con los análogos bromofenol y N-acetilaminofenol, la situación es la contraria: la unión covalente observada no guarda relación con el efecto tóxico.

Localización tisular de las enzimas implicadas en fenómenos de bioactivación.

La importancia de la formación de los aductos fármaco proteína viene más bien dada por el hecho de que la haptización de una proteína es el primer paso necesario para la estimulación del sistema inmune y la puesta en marcha de una reacción de hipersensibilidad dirigida contra el fármaco. Las células o tejidos capaces implicados en la formación de dichos aductos tienen importancia para entender tanto la fase de sensibilización como la de desencadenamiento, así como la manifestación más o menos localizada de la respuesta alérgica.

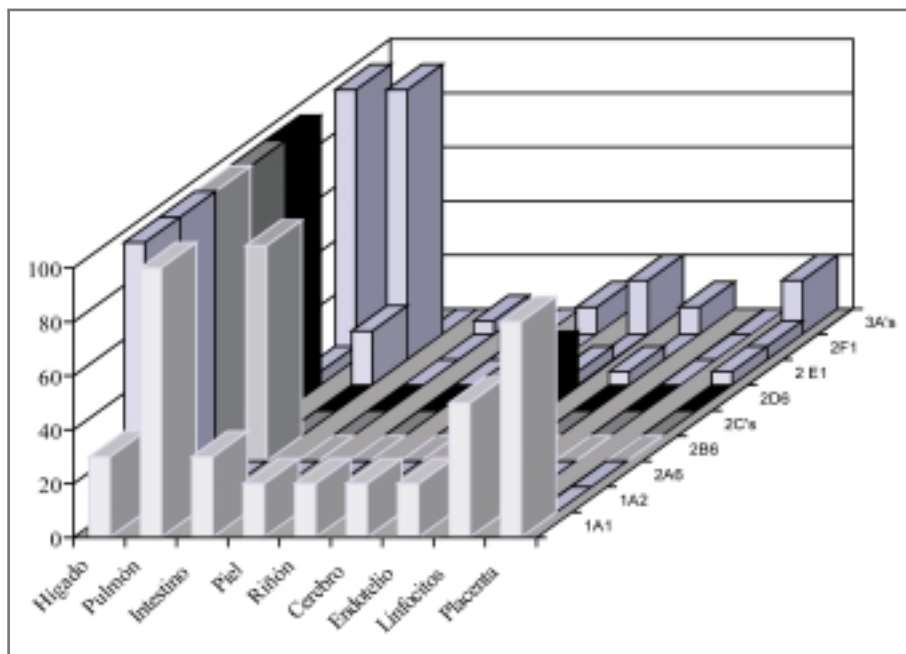
La capacidad metabólica de un determinado tejido, y la posibilidad de que se formen intermedios reactivos está ligada a la expresión de las enzimas responsables de su bioactivación en las células que lo constituyen. Si bien las enzimas de metabolización de fármacos se expresan predominantemente en el hígado, también lo hacen parcialmente en otros tejidos extrahepáticos tales como pulmón, riñón, piel, intestino y placenta (Tabla I). En términos absolutos, el hígado concentra en sí más del 90% de la capacidad metabólica global del organismo, expresando asimismo casi todas las isoformas del CYP450 y una considerable actividad de las enzimas de conjugación.

La expresión de las enzimas de metabolismo de fármacos en los diferentes tejidos humanos es sensiblemente menor que en el hígado y solo algunas isoformas se encuentran presentes (Fig. 9). Indirectamente, ello indica que solo se pueden formar metabolitos reactivos en el tejido/célula donde la enzima que los cataliza se exprese en un nivel suficiente. Indica asimismo que, solo aquellos tejidos/células que, por expresar una enzima determinada, dan origen a un metabolito reactivo y aductos fármaco-proteína, pueden posteriormente ser objeto de ataque por el sistema inmune. En un individuo que ya está sensibilizado, la formación de aductos en un determinado tejido/célula desencadenará una respuesta de hipersensibilidad localizada.

**TABLA I. Expresión de genes CYP en tejido extrahepático.**

<b>CYP</b>	<b>Tejido</b>
1A1	Pulmón, riñón intestino, piel, placenta...
1B1	Piel, riñón, próstata, glándula mamaria...
2A6	Pulmón, epitelio nasal
2B6	Intestino, pulmón
2C	Intestino delgado, laringe, pulmón
2D6	Intestino
2E1	Pulmón, placenta...
3A	Intestino, pulmón, placenta, feto, útero, riñón

**Referencia:** S. Rendic & F.J. DiCarlo, *Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their cations, substrates, inducers and inhibitors. Drug Metab Rev 29:413-80, 1997.*



**Figura 9.** Expresión de las diferentes isoformas del CYP450 en tejidos humanos. La actividad enzimática medible de las varias isoformas del CYP450 es diferente en los distintos tejidos humanos. Sobresale el hígado en donde se expresan casi todas las isoformas en su nivel más elevado (100%). No obstante, hay en los distintos tejidos actividades significativas.

(Adaptado de Pelkonen and Raunio; Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Env Health Perspective*, Supp 4. 105:767-774; 1997).

## VARIABILIDAD EN LA EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN Y SUS POSIBLES CONSECUENCIAS

Hay un segundo aspecto inherente a las reacciones idiosincrásicas a fármacos que es la diferente susceptibilidad y magnitud de la respuesta alérgica. Parte de las diferencias en la susceptibilidad individual pueden ser debidas a distinta capacidad en la formación de aductos. En el ser humano existe una variabilidad interindividual muy significativa en la actividad y/o la cantidad de las enzimas de metabolismo de fármacos. Parte de dicha variabilidad es debida a la existencia de genes polimórficos, es decir, genes para los que existen distintas variantes que codifican por isoformas de la enzima con especificidades y efica-

cias metabólicas diferentes. En otras ocasiones se trata de diferencias fenotípicas de la expresión de dichos genes. Las diferencias en la actividad de enzimas en los distintos seres humanos condicionan la mayor o menor formación de un determinado metabolito reactivo y consecuentemente la formación de aductos, la sensibilización y la respuesta de hipersensibilidad frente a ese fármaco.

Se conoce un cierto número de genes CYP polimórficos con una frecuencia, y distribución entre razas y subtipos humanos característica (Tabla II). Las isoformas CYP2C19, CYP2D6, y la N-acetil-transferasa (NAT) constituyen tres ejemplos clásicos de polimorfismo genético. Se trata de genes que existen bajo distintas variantes genéticas en la población humana, que pueden tener una muy diferente actividad enzimática, y que se heredan mendelianamente (Tabla II). Generalmente las variantes polimórficas son menos eficaces en cuanto al metabolismo de fármacos que la isoforma original. Dependiendo de que un individuo haya adquirido uno o los dos alelos de una variante polimórfica, poseerá una capacidad metabólica menor o simplemente residual, manifestándose como un metabolizador lento para un fármaco determinado. En el caso concreto del CYP2D6, han sido descritos casos de duplicación del gen, con lo que quienes heredan dichos alelos se convierten en metabolizadores ultrarrápidos.

**TABLA II. Polimorfismos humanos de los CYP.**

<b>Enzima</b>	<b>Variantes alélicas</b>	<b>Variante mayoritaria</b>	<b>Frecuencia de los alelos</b>	<b>Fenotipo</b>
CYP1A2	13	CYP1A2*1B	12% (Japoneses)	Actividad disminuida
CYP2A6	22	CYP2A6*2	1-3% (Caucásicos)	Enzima inactiva
CYP2C9	6	CYP2C9*3	7-9% (Caucásicos)	Especificidad de sustrato alterada
CYP2C19	11	CYP2C19*2	13% (Caucásicos)	Enzima inactiva
CYP2D6	75	CYP2D6*4	12-21% (Caucásicos)	Enzima inactiva
CYP2E1	13	CYP2E1*3	<1% (Caucásicos)	Sin efectos
CYP3A4	25	CYP3A4*2	4% (Caucásicos)	Afinidad por sustrato disminuida

**Referencia:** Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP). Allele Nomenclature Committee. ([www.imm.ki.se/CYPalleles](http://www.imm.ki.se/CYPalleles)).

Una parte muy importante de las diferencias interindividuales en la capacidad metabólica de fármacos es debida a variabilidad fenotípica, esto es, diferencias en los niveles de expresión de genes normales. Las isoformas CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A3, CYP3A4 y CYP3A5, son las que muestran un mayor grado de variabilidad fenotípica en los seres humanos (Tabla III). A esa variabilidad fenotípica pueden contribuir factores fisiopatológicos, medioambientales, hábitos alimenticios y sociales, y los propios fármacos. Hormonas sexuales (más evidente en roedores que en el hombre), estados de desnutrición y procesos inflamatorios (a través de citocinas inflamatorias) influyen de manera clara sobre la expresión de los genes CYP.

Genes como el CYP3A4, del que no se conocen polimorfismos en la región codificante, presentan una considerable variabilidad en la actividad enzimática, resultado de diferencias en la expresión de un gen *normal*. La incidencia del polimorfismo en el CYP2C9 es muy reducida, y sin embargo la variabilidad fenotípica en el ser humano es considerable. También algunas enzimas de fase II, tales como la glucoronil transferasa y la glutation-S-transferasa, muestran variaciones interindividuales fundamentalmente de tipo fenotípico.

---

**Tabla III. Abundancia relativa y variabilidad de los CYPs implicados en el metabolismo humanos de fármacos y xenobióticos.**

<b>CYP</b>	<b>Abundancia (% total)</b>	<b>Grado de variabilidad</b>
1A2	~13	~40 x
1B1	<1	
2A6	~4	~30 – 100 x
2B6	<1	~50 x
2C	~18	25 – 100 x
2D6	Hasta 2.5	>1000 x
2E1	Hasta 7	~20 x
2A4	Hasta 28	~20 x

**Referencia:** S. Rendic & F.J. DiCarlo, *Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their cations, substrates, inducers and inhibitors. Drug Metab Rev 29:413-80, 1997.*

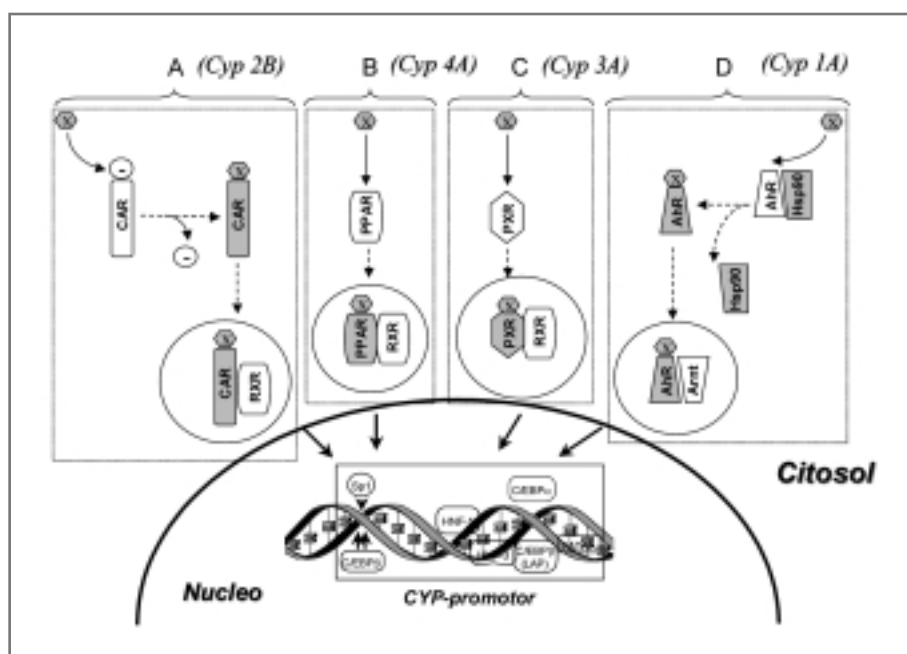
El análisis detallado de los mecanismos de la regulación de genes típicamente hepáticos permitió identificar en su momento, una serie de factores activadores de la transcripción que se caracterizan por poseer un dominio de unión a la región del ADN situada en la región 5' anterior al inicio de la transcripción del gen. Estos factores son los actores principales en el control de la expresión de los genes en un determinado tejido. La expresión de los genes CYP en el hígado depende de un reducido número de dichos factores de transcripción, C/EBP $\alpha$ , HNF3 $\gamma$ , HNF1 y HNF4. Su papel determinante en el control de la expresión basal de los CYP en el hígado, viene demostrado por el hecho de que las secuencias consenso de unión de dichos factores al ADN, están presentes en la región 5' de casi todos los genes CYP. Estos factores pueden formar homo- u heterodímeros con otros miembros de su familia; así como interaccionar (fenómenos de cooperatividad y sinergismo) con factores de otras familias, lo que en última instancia les permite modular su especificidad y potencia transactivadora. Estos factores de transcripción actúan a modo de llaves de combinación que facilitan el que un determinado gen (por ejemplo CYPs), se expresen en uno u otro tejido, en función de que exista una adecuada combinación de dichos factores.

No existe, una explicación molecular razonable que explique las importantes diferencias fenotípicas en la expresión basal de algunos CYPs, que se observan en el ser humano. Cabe, no obstante, imaginar diferentes alternativas. Una primera posibilidad sería la existencia de diferencias interindividuales en los niveles de esos factores reguladores clave, lo que condicionaría la diferente expresión de los genes CYP. Aunque ésta es la explicación más fácil de entender, es poco verosímil, porque de ser cierta, otros muchos genes regulados por estos mismos factores de transcripción se verían afectados y éste no es el caso. La variabilidad interindividual que se observa en la expresión de los genes CYP no se da en otros genes también regulados por los mismos factores de transcripción. Una segunda posibilidad, es que existan polimorfismos en la región reguladora de los genes CYP. No se tiene hasta el momento constancia de su existencia en la región 5' proxima al inicio de la transcripción, pero no cabe excluir que realmente existan a distancias mayores en la estructura del gen, o que existan polimorfismos en otras proteínas reguladoras de la expresión de dichos genes.

La otra causa de variabilidad fenotípica es la derivada del efecto que otros xenobióticos, incluidos los propios fármacos, tienen sobre la regulación de los genes CYP. Es conocido que la administración repetida de ciertos compuestos es capaz de inducir la expresión de enzimas de biotransformación.

El fenobarbital y la rifampicina constituyen dos ejemplos clásicos de fármacos inductores de las enzimas de metabolismo.

Se conocen cuatro posibles vías por las que un xenobiótico (fármaco) puede inducir los genes CYP. Todas ellas comparten un mismo principio: existen en la célula proteínas reguladoras de la expresión génica capaces de unirse a regiones del ADN: receptores nucleares. Dichos receptores nucleares que forman heterodímeros con otras proteínas reguladoras, suelen tener un ligando natural, unión que viene alterada por la presencia del xenobiótico. El resultado inmediato es la translocación al núcleo y la puesta en marcha de una cascada de acontecimientos que culmina con la unión de dicho receptor a una secuencia de ADN situado junto al promotor de los genes CYP, con la consiguiente activación de la transcripción (Fig. 10).



**Fig. 10.** Mecanismos generales de la inducción de enzimas de biotransformación por los xenobióticos (fármacos). Se conocen cuatro posibles vías por las que un xenobiótico (fármaco) puede inducir los genes CYP. Existen proteínas con capacidad de unirse a regiones del ADN que regulan la expresión de genes CYP (receptores nucleares). Dichas proteínas suelen tener un ligando natural que es desplazado por el fármaco. Tras la translocación al núcleo del complejo, se produce la activación de la transcripción de dichos genes.

AhR: aryl hydrocarbon receptor; CAR: constitutive androstane receptor; PXR: pregnane nuclear receptor; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; Hsp90: heat-shock protein 90.

En la inducción de los genes de la familia CYP1 interviene el aryl hydrocarbon receptor (AhR), presente en el citosol celular que está heterodimerizado con la proteína Hsp-90. Cuando el compuesto se asocia a AhR, se escinde el heterodímero, y el complejo formado por el xenobiótico y AhR se transloca al núcleo. La inducción del resto de genes CYP se realiza a través de mecanismos que implican a tres receptores huérfanos: CAR (*constitutive androstane receptor*) que participa en la inducción del CYP2B6; PXR (*pregnane nuclear receptor*) que activa los genes de la subfamilia CYP3A en respuesta a diversos compuestos químicos incluyendo ciertos esteroides naturales y sintéticos y PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) que media la inducción de los genes CYP de la subfamilia CYP4A. Otros receptores nucleares como el receptor de glucocorticoides o el receptor de vitamina D también pueden afectar o modular de un modo relevante la inducción de los CYPs por xenobióticos.

En resumen, la variabilidad fenotípica de la expresión de las enzimas de biotransformación de fármacos en el ser humano influye no solo en el metabolismo/aclaramiento del compuesto, sino también en las posibles reacciones de bioactivación que puedan ocurrir con él o con otros medicamentos coadministrados.

## **¿CUÁN RELEVANTE ES EL HECHO DE QUE UN FÁRMACO FORME ADUCTOS COVALENTES?**

Conscientes de que el metabolismo de un fármaco puede dar origen a la formación de metabolitos reactivos y con ello a la formación de aductos y posibles reacciones adversas, la industria farmacéutica ha puesto énfasis creciente en la investigación de este fenómeno en los compuestos candidatos a medicamento. Compuestos que como consecuencia de su biotransformación, dan origen a metabolitos electrófilos muy reactivos (capaces incluso de alquilar a ácidos nucleicos) es difícil que lleguen a la fase clínica, porque son fáciles de detectar. Excepción a esto lo constituyen aquellos fármacos antitumorales alquilantes, cuyo mecanismo de acción se basa precisamente en la modificación del ADN. El interés de la investigación se dirige, mas bien, hacia aquellos compuestos de reactividad más moderada pero capaces de unirse a proteínas, y por consiguiente con una mayor trascendencia de cara a instaurar reacciones de sensibilización.



Con la utilización de técnicas cada vez más sensibles (fármacos radiactivos, espectrometría de masas), es posible, hoy día, la identificación y cuantificación de aductos covalentes fármaco/proteína. Resulta relativamente sencillo constatar si un fármaco se ha unido o no a proteínas celulares, y si ello es consecuencia de una reacción de metabolismo/bioactivación. En el caso de disponer del fármaco radiactivo, la medida de la radiactividad unida a proteínas (no extraíble disolventes orgánicos de distinta polaridad), proporciona una medida real de la magnitud de formación de aductos. No es posible determinar, sin embargo, si la entidad molecular unida a proteínas es el propio fármaco o un metabolito derivado de aquel. Más información estructural puede obtenerse a través del estudio por espectrometría de masas de los péptidos conteniendo el aducto fármaco-proteína.

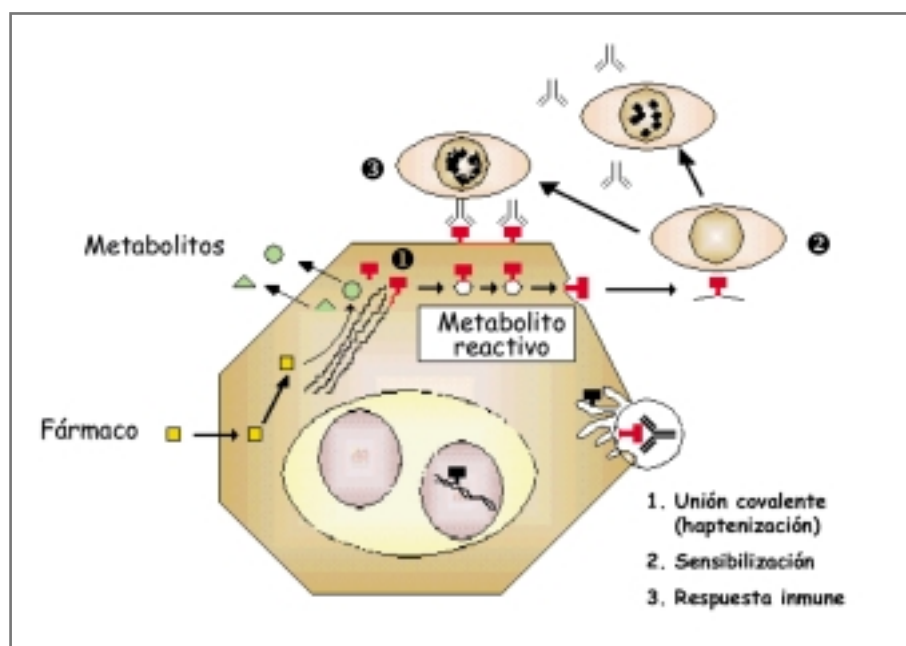
El lugar donde se forman dichos aductos es determinante de cara a una posterior respuesta alérgica. Los hepatocitos, pese a su notable capacidad de metabolismo, y en consecuencia la inevitable formación de aductos, participan de manera muy esporádica en el desencadenamiento de respuestas alérgicas a fármacos. Por el contrario, otras células/tejidos (piel, pulmón) con una capacidad metabólica considerablemente inferior, pueden generar aductos que resultan determinantes para la puesta en marcha de una respuesta alérgica. Influye en ello no solo la formación de aductos, sino cómo lleguen a ser accesibles a la vigilancia del sistema inmune.

Existen ejemplos que demuestran cómo fármacos que son causantes de reacciones alérgicas localizadas en un tejido específico, fueron inicialmente bioactivados en dicho tejido. Así por ejemplo, el sulfametoxazol, agente que causa reacciones cutáneas específicas de hipersensibilidad retardada, es metabolizado por queratinocitos de la piel los cuales, a través de la enzima NAT-1, dan lugar a intermedios reactivos derivados de la N-4-hidroxilamina. Ello hace presuponer que estas células estén implicadas en la iniciación y en el desencadenamiento de la hipersensibilidad cutánea a dicho compuesto.

El mecanismo aceptado acerca de cómo el sistema inmunológico reconoce a los fármacos para desencadenar una respuesta inmune, se asienta en la hipótesis de los haptenos formulada por Landsteiner que establece que por debajo de un cierto peso molecular, un compuesto debe unirse de forma covalente a proteínas endógenas para poder ser reconocido por el sistema inmune, tras lo que será procesada y presentada por células presentadoras de antígeno (APCs) a los linfocitos específicos (Fig. 11). Es por tanto una condición *sine qua non* para el inicio de la respuesta inmunológica. Algunos agentes (tal es el caso de penicilinas, cefalosporinas, sulfamidas y algunos agentes alquilantes) pueden re-

accionar directamente con las proteínas. Sin embargo, la mayor parte de los medicamentos implicados en las reacciones de hipersensibilidad son químicamente inertes frente a proteínas, y son los metabolitos generados durante los procesos de bioactivación, asociados al metabolismo del fármaco, quienes poseen la reactividad suficiente para unirse covalentemente a los grupos nucleofílicos de las proteínas, poniendo así en marcha la respuesta inmunológica.

La formación de aductos es una etapa necesaria pero no suficiente para el desencadenamiento de una respuesta alérgica, en la que hay un componente idiosincrásico que determina el umbral de tolerancia que un determinado individuo puede tener frente a los aductos formados; es decir el umbral a partir del cual habría respuesta inmunológica. Una vez formados los aductos fármaco-proteína, el paso sub-



**Fig. 11.** Mecanismo general de la sensibilización alérgica a fármacos. La generación de especies químicas reactivas derivadas del fármaco, como consecuencia de las reacciones de biotransformación, pueden dar origen a aductos fármaco-proteína (1). La exposición de dichos aductos a la vigilancia del sistema inmune puede sensibilizar a linfocitos  $T_H$  (2), que se traducirá en un tipo de respuesta  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$ , y finalmente una sensibilización que hará que, cuando de nuevo se produzcan aductos (como consecuencia de seguir administrando el fármaco), se produzca una respuesta dirigida contra el fármaco, en la célula que genere dichos aductos (3).

secuente es su accesibilidad a las células del sistema inmune. Su captación, procesamiento por las células presentadoras de antígeno (quién y cómo presentan los antígenos, el estadio de inmadurez o madurez de las células implicadas), y el reconocimiento del hapteno por los linfocitos, son determinantes para regular la tolerancia versus no tolerancia inmunológica. Las células dendríticas inmaduras de los tejidos contribuyen a la tolerancia periférica frente a las moléculas propias y a moléculas exógenas inocuas gracias a encontrarse en un estadio caracterizado por una alta capacidad de endocitosis pero de baja expresión de moléculas de HLA y de coestimulación (CD40, CD80, CD86) en superficie. Ante ciertas situaciones (por ejemplo, daño tisular) la célula dendrítica inmadura evoluciona hacia la madurez, estadio en el que pierde capacidad de endocitosis pero aumenta la de procesamiento de antígenos favoreciendo su asociación al complejo HLA y su exposición en la superficie celular donde permanecen estables. Se produce de manera concomitante una regulación positiva de la expresión de moléculas de coestimulación y de moléculas que facilitan la migración a los ganglios. La maduración induce también un cambio en el patrón de citocinas secretadas por las células dendríticas que contribuye a generar una respuesta de tipo Th1 o Th2 en los linfocitos, determinada fundamentalmente por la producción de IL-12 o IL-4. Estas señales inducen la activación y proliferación de los clones linfocitarios específicos que interactúan con las células dendríticas maduras, y con ellos el tipo de respuesta inmunoalérgica que se produce.

La variabilidad interindividual en la capacidad metabólica de biotransformación de fármacos puede contribuir a la generación anormal de metabolitos reactivos que a su vez formen un mayor número de aductos y/o induzcan daño en células adyacentes favoreciendo que dichos aductos sean presentado en un entorno que favorezca la activación y proliferación linfocitaria. El metabolito, en ese caso, sería, no sólo el antígeno, sino también el desencadenante de la activación del sistema.

Para la gran mayoría de los fármacos existe un nivel pequeño, pero medible, de formación de aductos, de manera que la mayor dificultad a la que hay que hacer frente a la hora de tomar decisiones en el desarrollo farmacéutico es la interpretación y relevancia de los resultados de cara a determinar el riesgo de una posible reacción adversa de naturaleza alérgica. El reto científico frente al que nos enfrentamos es poder contestar adecuadamente a estas cuestiones: ¿cuál es el nivel máximo aceptable de formación de aductos?; ¿qué dianas proteicas son relevantes desde el punto de vista alérgico?; en definitiva, ¿cómo poder anticipar el riesgo de una posible reacción alérgica en un nuevo compuesto, basados en los datos analíticos del metabolismo?

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Aduetos fármaco/proteína:** Entidades químicas resultantes de la unión covalente de un fármaco a una proteína. No se trata de una asociación del fármaco a proteínas (como ocurre durante el transporte de fármacos en la sangre), sino de una verdadera reacción entre el fármaco o un metabolito derivado de él con la proteína.

**Bioactivación:** Reacción de biotransformación en la que un fármaco da origen a metabolitos más reactivos, y al tiempo más tóxicos.

**Biotransformación:** Conjunto de procesos celulares por los que los xenobióticos son modificados químicamente para facilitar su eliminación. Término equivalente a metabolismo de xenobióticos.

**Detoxificación:** Cuando el resultado de la biotransformación de un xenobiótico resulta en un metabolito menos tóxico (y menos reactivo).

**CYP450:** Superfamilia de genes, que codifican por enzimas denominados genéricamente citocromo P450 o más simplemente P450.

**P450:** Familia de enzimas codificada por los genes CYP. Denominadas también citocromo P450. Se trata de un conjunto de hemoproteínas asociadas al citocromo P450, con actividad catalítica capaz de modificar químicamente a los xenobióticos.

**Xenobiótico:** Del término griego ξενος, extraño, extranjero. Se denomina a aquellos compuestos que son ajenos, extraños, al metabolismo celular. Compuestos que, en definitiva, interaccionan con los seres vivos pero no forman parte de su metabolismo. Bajo esta denominación se incluyen productos químicos, fármacos, y productos naturales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Baron JM, Merk HF. Drug metabolism in the skin. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4:287-291 (2001).
2. Baron JM, Holler D, Schiffer R et al. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2001;116(4):541-8.
3. Cashman J.R. Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenases. *Chem Res Toxicol* 8:165-181 (1995).
4. Donato M.T. and Castell J.V. Strategies and molecular probes to investigate the role of Cytochrome CYP450 in drug metabolism: Focus on in vitro studies. *Clin Pharmacokinetics*, 42:153-178 (2003).
5. Gruchalla R. Drug allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:5548-59.
6. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999;5:1249-55.

7. Hess DA, Rieder MJ. The role of reactive drug metabolites in immune-mediated adverse drug reactions. *Ann Pharmacother.* 11:1378-1387 (1997).
8. Ingelman-Sundberg M. Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology.* 181-182:447-452 (2002).
9. Krishna DR, Klotz U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet.* 2:144-160 (1994).
10. Lewis DF. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics.* 3:305-318. (2004).
11. Naisbitt DJ, Williams DP, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Park BK. Reactive metabolites and their role in drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 4:317-25 (2001).
12. Naisbitt DJ, Pirmohamed M, Park BK. Immunopharmacology of hypersensitivity reactions to drugs. *Curr Allergy Asthma Rep.* 1:22-9 (2003).
13. Park BK, Naisbitt DJ, Gordon SF, Kitteringham NR, Pirmohamed M. Metabolic activation in drug allergies. *Toxicology.*;158(1-2):11-23 (2001).
14. Ritter JK. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact.* 129(1-2):171-193 (2000).
15. Rodríguez-Antona C., Bort R., Jover R., Tindberg N., Ingelman-Sundberg M., Gómez-Lechón M.J., Castell J.V.. Transcriptional regulation of human CYP3A4 expression by C/EBP $\alpha$  and HNF-3 $\gamma$ . *Molecular Pharmacol* 63:1180-1189 (2003).
16. Sheweita SA. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr Drug Metab.* 2:107-132 (2000).
17. Tanaka E. Update: genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes in humans. *J Clin Pharm Ther.* 5:323-329 (1999).
18. Van Bladeren PJ. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact.*;129(1-2):61-76 (2000).
19. Yengi LG, Xiang Q, Pan J et al. Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal Biochem.* 2003;316:103-10.
20. Ziegler DM., Recent studies on the structure and function of multi-substrate flavin-containing monooxygenases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 33:179-199 (1993).