



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario

**Tesis de Doctorado**

***MODULACIÓN DE SISTEMAS DE  
BIOTRANSFORMACIÓN Y PROTEÍNAS ABC POR  
EL ANTICHAGÁSICO BENZNIDAZOL.***

Presentada por: **Virginia G. Perdomo**

Rosario, Argentina

2013

**MODULACIÓN DE SISTEMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN  
Y PROTEÍNAS ABC POR EL ANTICHAGÁSICO  
BENZNIDAZOL.**

.....

**Virginia G. Perdomo**

Lic. en Biotecnología

Universidad Nacional del Litoral

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01/04/10 y el 13/12/13 bajo la dirección de Dra. Viviana A. Catania y la co-dirección de la Dra. Claudia G. Echenique.

Directora: Viviana A. Catania

Co-Directora: Claudia G. Echenique

Jurados:

Dra. Ana Rosa Perez

Dra. Carolina Ghanem

Dr. Oscar Bottasso

Defendida: (25-02-2014)



*Esta Tesis está dedicada a la Dra. Claudia Gabriela Echenique (1963-2013), un Ser de Luz maravilloso que supo llenar de amor los corazones de todos los seres que pasaron por su vida, y dejar la más hermosa de las enseñanzas. Somos tus semillas.*

Parte de los resultados de esta tesis han sido dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

#### **A- PUBLICACIONES:**

1- "Modulation of Biotransformation Systems and ABC Transporters by Benznidazole in Rats". **Perdomo VG**, Rigalli JP, Villanueva SS, Ruiz ML, Luquita MG, Echenique CG, Catania VA. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:4894-902, 2013.

#### **B- PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS:**

1. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. "***El pretratamiento con Benznidazol (BZL) altera su farmacocinética***". Perdomo VG, Villanueva SSM, Rigalli JP, Ruiz ML, Luquita MG, Echenique CG, Catania VA. Mendoza, Argentina. Publicado en: Libro de Resúmenes – SAFE 2012, Página 40. **ISSN 2250-4079**
2. XXIX Congreso Nacional de Cardiología. "***Benznidazol (BZL) modifica la expresión de proteínas transportadoras de drogas en hígado e intestino de rata***". Perdomo VG; Rigalli, JP; Luquita, MG; Villanueva, SSM; Ruiz, ML; Mottino, AD; Echenique, CG; Catania, VA. Córdoba, Argentina, 2011. Publicado en: Revista de la Federación Argentina de Cardiología, Página 18, Vol. 40, Supl. I, 2011. **I.S.B.N. ó I.S.S.N.: 0326-646X.**
3. LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología y XLII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. "***Benznidazol (BZL) modula la expresión de las proteínas transportadoras de drogas en hígado de rata y en la línea celular HepG2***". Perdomo V, Rigalli J, Luquita M, Villanueva S, Ruíz M, Mottino A, Echenique C, Catania V. Mar del Plata, Argentina, 2010. Publicado en: Medicina, Página 219, Vol. 70, Supl. II, 2010. **I.S.B.N. ó I.S.S.N.: 0025.7680.**

## Índice:

Abreviaturas	IV
1. RESUMEN:	1
2. INTRODUCCIÓN:	7
2.1. Tejidos con relevancia fármaco-toxicológica.	7
2.1.1. Hígado.	7
2.1.2. Intestino.	10
2.1.3. Riñón.	12
2.1.4. Determinantes de la biodisponibilidad de un fármaco.	14
2.2. XENOBIÓTICOS: generalidades.	16
2.3. Reacciones de biotransformación.	17
2.3.1. Reacciones de fase I: Citocromo P450.	18
2.3.2. Reacciones de fase II.	21
2.3.2.1. UDP-Glucuronosiltransferasas (UGTs).	21
2.3.2.2. Glutation-S-transferasas (GSTs).	23
2.3.2.3. Reacciones de “fase III”. Generalidades.	25
2.3.2.3.1. MDR1/Mdr1a/b/P-gp.	27
2.3.2.3.2. MRP2/Mrp2.	29
2.4. Enfermedad de Chagas.	30
2.4.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .	31
2.4.2. Fases de infección por <i>T. cruzi</i> .	34
2.4.2.1. Fase aguda.	34
2.4.2.2. Fase crónica.	34
2.4.3. Terapéutica de la enfermedad de Chagas.	35
2.4.3.1. Benznidazol.	36
2.4.3.2. Efectividad del tratamiento con BZL.	38
2.4.3.3. Efectos del BZL sobre sistemas enzimáticos de biotransformación y transportadores ABC.	40
3. OBJETIVO GENERAL:	43
3.1. Objetivos específicos.	43

4. MATERIALES Y MÉTODOS:	44
4.1. Reactivos químicos.	44
4.2. Animales.	44
4.2.1 Estudios preliminares.	44
4.2.2. Tratamiento con BZL.	45
4.2.3. Recolección y análisis de muestras.	45
4.2.3.1. Recolección de bilis para determinación del flujo biliar.	45
4.2.3.2. Recolección de tejidos.	45
4.2.3.3. Cuantificación de GSH y GSSG en hígado y bilis.	46
4.2.3.4. Determinación del contenido biliar de bilirrubina total.	47
4.2.3.5. Actividad de enzimas hepáticas en suero.	48
4.2.3.5.1. Lactato Deshidrogenasa.	48
4.2.3.5.2. Fosfatasa alcalina.	48
4.2.3.5.3. Aspartato amino transferasa.	49
4.2.3.5.4. Alanina amino transferasa.	49
4.2.4. Procesamiento de muestras para los ensayos de <i>western blot</i> .	50
4.2.4.1. Preparación de membranas plasmáticas.	50
4.2.4.2. Obtención de citosol y microsomas por centrifugación diferencial.	52
4.2.4.3. Obtención de hepatocitos aislados.	52
4.2.4.4. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.	53
4.2.4.5. Inmunocuantificación por <i>western blot</i> .	54
4.2.4.6. Inmunomarcación seguida de microscopía confocal.	56
4.2.4.7. Actividad de CYP3A4.	57
4.2.4.8. Actividad de GST.	57

4.2.4.9. Actividad <i>in situ</i> de P-gp y Mrp2.	58
4.2.4.9.1. Actividad <i>in vitro</i> de Mrp2.	60
4.3. Farmacocinética de BZL.	61
4.4. Absorción intestinal de BZL.	62
4.5. Estudios estadísticos.	63
5. RESULTADOS.	64
5.1. Resultados preliminares.	64
5.2. Efecto de BZL sobre la función secretora biliar, relación peso de hígado/peso corporal y marcadores séricos de daño hepático.	66
5.3. Efecto del tratamiento con BZL sobre la expresión de enzimas de biotransformación de Fase I (CYP3A) y Fase II (UGTs y GSTs).	68
5.4. Efecto del tratamiento con BZL sobre la expresión y actividad de P-gp y Mrp2 en tejidos secretores.	72
5.5. Efecto del pre-tratamiento con BZL sobre su propia biodisponibilidad.	78
5.5.1. Efectos del pre-tratamiento con BZL sobre su propia absorción intestinal.	79
6. DISCUSIÓN:	81
7. CONCLUSIONES:	92
8. BIBLIOGRAFÍA:	94

## **ABREVIATURAS**

(en orden alfabético)

**ABC**, transportadores con cassette de unión al ATP.

**ADN**, ácido desoxirribonucleico.

**ANOVA**, análisis de la variancia.

**ARNm**, ácido ribonucleico mensajero.

**AUC**, área bajo la curva.

**BBM**, membrana intestinal de ribete en cepillo.

**BCRP/Bcrp**, proteína de resistencia al cáncer de mama.

**BSA**, albúmina sérica bobina.

**BZL**, Benznidazol.

**C**, controles.

**CAR**, Receptor Constitutivo de Androstanos

**CDNB**, 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno.

**C<sub>máx</sub>**, concentración plasmática máxima.

**CYP**, citocromo P-450.

**DMSO**, dimetilsulfóxido.

**DNP-SG**, dinitrofenil-S-glutation.

**DNP-CG**, dinitrofenil-cisteinilglicina.

**DTNB**, ácido 5, 5'-ditiobis-2-benzoico.

**DTT**, ditionitrosol.

**EDTA**, ácido etilendiamino tetraacético.

**EGTA**, ácido etilenglicol bis (aminoetil éter) tetraacético.

**FA**, Fosfatasa alcalina.

**FXR**, Receptor Farnesoides X

**GOT**, Aspartato amino transferasa.

**GPT**, Alanina amino transferasa.

**GSH**, glutation reducido.

**GSSG**, glutation oxidado.

**GST**, Glutation-S-transferasa

**HEPES**, ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfónico.

**HPLC**, cromatografía líquida de alta presión.

**i.p.**, intraperitoneal.

**i.v.**, intravenoso.

**k**, velocidad de decaimiento plasmático.

**LDH**, Lactato deshidrogenada.

**MAPEG**, proteínas de membrana asociadas al metabolismo de glutatión e icosanoides.

**MDR1/Mdr1/P-gp**, proteína de resistencia a multidrogas 1.

**MPM**, membranas plasmáticas mixtas.

**MRP/Mrp**, proteínas asociadas a la resistencia a multidrogas.

**MRP2/Mrp2**, proteína asociada a la resistencia a multidrogas 2.

**NADPH**, nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (reducido).

**PBS**, solución salina de fosfatos.

**p.c.**, peso corporal.

**PMSF**, fluoruro de fenilsulfonio.

**p/v**, peso en volumen.

**PVDF**, fluoruro de polivinilo.

**PXR**, Receptor de Pregnanos X.

**RXR $\alpha$** , Receptor  $\alpha$  de Retinoides X.

**SD**, desviación estándar.

**SDS**, dodecil sulfato de sodio.

**Rho-123**, Rodamina 123.

**SSA**, ácido sulfosalicílico.

**t<sub>1/2</sub>**, tiempo de vida media.

**T. cruzi**, *Trypanosoma cruzi*.

**TcPGP**, proteína análoga de P-gp de *Trypanosoma cruzi*.

**UDP-GA**, ácido uridín difosfo-glucurónico.

**UGT**, UDP-glucuronosiltransferasa.

**v/v**, volumen en volumen.

## ***I. Resumen***

## 1. RESUMEN:

Los xenobióticos, son compuestos de naturaleza química muy variada, que se encuentran en el medio ambiente de forma natural o surgen como resultado de la actividad humana. Los organismos vivos se encuentran constantemente expuestos a una gran variedad de estos compuestos, que al ingresar al organismo, se distribuyen en los distintos compartimentos pudiendo ser metabolizados y/o acumulados (Kovacic y Somanathan, 2009; Bhattacharya y Keating, 2011; Lima y col., 2011).

Estos compuestos son generalmente apolares y lipofílicos, característica que les permite atravesar con facilidad las membranas biológicas, imposibilitando su excreción por orina o heces y acumulándose en tejidos grasos. Por esto, suelen sufrir procesos de biotransformación, o metabolización, generando metabolitos más hidrosolubles, que facilitan su eliminación. La biotransformación es definida entonces como la suma de todas las reacciones químicas que alteran la estructura, solubilidad en agua y eventual distribución de endo- y xenobióticos. Los organismos biológicos poseen sistemas enzimáticos que catalizan estos procesos de biotransformación que procuran disminuir la toxicidad global de los xenobióticos, aunque en algunos casos se generan intermediarios aún más tóxicos o activos (Martinez-Cabot y col., 2005; Zhou y col., 2007).

Las reacciones de biotransformación han sido clasificadas en: reacciones de fase I (como aquellas catalizadas por el sistema de citocromo P450 -CYP-); y reacciones de fase II (catalizadas por familias de enzimas denominadas: glutathion-S-transferasas -GST- y uridín-difosfo-glucuronosiltransferasa -UGT-, entre otras).

Por otra parte, la magnitud de acumulación de una droga y/o sus metabolitos, en un determinado tejido, es frecuentemente limitada no tanto por su habilidad para entrar a la célula sino como su tendencia a dejarla. Esto está relacionado con los mecanismos de eflujo presentes en la membrana celular que juegan un rol crítico en limitar la absorción y acumulación de sustancias potencialmente tóxicas o de uso terapéutico, y que pueden conferir resistencia a esos compuestos. Se define entonces la fase III del metabolismo o la eliminación de endo- o xenobióticos y/o sus metabolitos, que está representada por los

procesos de transporte. Los transportadores involucrados en los mecanismos de excreción de la fase III, son miembros de la familia de transportadores ABC que comprenden aquéllas proteínas denominadas MDR (del inglés: “*multidrug resistance protein*”, como P-glicoproteína, P-gp) y MRP (del inglés: “*multidrug resistance-associated protein*”, como la proteína asociada a resistencia a múltiples drogas 2, Mrp2), entre otros. Estos proveen una importante barrera contra la penetración de drogas y/o un eficiente mecanismo de eliminación (Mottino y col., 2000; Ayrton y Morgan, 2001; Chan y col., 2004).

Luego del hígado, la mucosa gastrointestinal y la corteza renal son los tejidos más activos en la biotransformación y eliminación de compuestos tanto endógenos como exógenos (Rowland y Walter, 1983; Chhabra y Eastin, 1984).

Si bien los sistemas de biotransformación y transportadores ABC se expresan diferencialmente en distintos tipos celulares (macrófagos, epitelios absortivos o secretores, etc.), esta expresión no es estática ya que las células tienen una remarcable capacidad para regular la cantidad de estas proteínas tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. El tratamiento con determinados compuestos es capaz de alterar la expresión y actividad de los mismos en distintos tejidos y con ello modificar su farmacocinética y biodisponibilidad, como así también la de drogas co-administradas que son también sus sustratos (Ibrahim y col., 2001).

Por otra parte, la enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica en América Latina, que afecta a 15 millones de personas (OMS, 2007, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>). En la Argentina y otros países endémicos, la única droga disponible para el tratamiento de la fase aguda de esta enfermedad es el benznidazol (BZL). Sin embargo, sus efectos tóxicos pueden llevar a suspender el tratamiento, con la consiguiente progresión de la enfermedad a la fase crónica. Además, uno de los mayores obstáculos en el éxito del tratamiento de enfermedades neoplásicas e infecciones por microorganismos o parásitos es el desarrollo de resistencia a multidrogas. Entre los mecanismos propuestos caben destacar la sobre-expresión y mayor actividad de sistemas enzimáticos de biotransformación de dichas drogas así como de proteínas

transportadoras capaces de facilitar su excreción (o de sus metabolitos) (Catania y col., 2004). La resistencia a drogas tiene también un alto impacto en la quimioterapia de la enfermedad de Chagas, limitando las opciones al tratamiento e incrementando el número de tratamientos fallidos.

Como antecedentes de nuestro grupo de trabajo, observamos que BZL induce la expresión y actividad de CYP3A4, GST $\pi$ , P-gp y MRP2 de manera dependiente de la concentración, en células HepG2 utilizadas como modelo de célula hepática (Rigalli y col., 2012). Sin embargo, hasta el presente no existe información concerniente a la expresión y actividad de sistemas de biotransformación y transportadores en un modelo *in vivo* y sus potenciales consecuencias en la farmacocinética de BZL o de drogas co-administradas. Por todo esto, en este trabajo de Tesis nos propusimos evaluar el impacto del pre-tratamiento con BZL (25; 50 y 100 mg/kg/día i.p., por 3 días consecutivos) sobre la expresión y actividad de proteínas involucradas en el metabolismo de Fase I (CYP3A), de Fase II (UGT1A, GSTs), eliminación (P-gp y Mrp2) y sobre la biodisponibilidad del propio BZL (evaluando la farmacocinética de una dosis testigo de BZL: 5 mg/kg, intraduodenal, pos-tratamiento).

Observamos que el tratamiento con BZL incrementa el flujo biliar, sin alterar la velocidad de excreción biliar de glutatión total ni GSSG, determinantes mayoritarios del flujo biliar independiente de sales biliares; permitiéndonos sugerir que el incremento observado en el flujo biliar podría deberse a la excreción biliar de metabolitos de BZL vía Mrp2 y/o P-gp. Además, las ratas tratadas con BZL presentan un leve aumento en los niveles de GPT sin alteraciones en la excreción biliar de bilirrubina, ni de niveles séricos de otras enzimas utilizadas como marcadores de daño hepático (LDH, FA, GOT).

Al presente, poco es conocido sobre los efectos de BZL sobre los sistemas de biotransformación. En nuestro trabajo, el tratamiento con BZL produjo un aumento en la expresión de la familia de CYP3A (responsable de la primera etapa de biotransformación en hígado del 50 % de las drogas de uso clínico, Köhle y Bock, 2009), con un concomitante aumento en la actividad de CYP3A4. Por otro lado, mientras que la expresión de UGT1A no se vio alterada por BZL en ninguno

de los tejidos analizados, observamos inducción de la expresión de GST $\mu$  en hígado y GST $\alpha$  en intestino, y de la actividad global, pudiendo ser un mecanismo compensatorio pre-sistémico contra derivados electrofílicos resultantes del metabolismo de BZL.

Además de los sistemas de biotransformación, el incremento en la depuración de endo- y xenobióticos puede asociarse frecuentemente a altos niveles de expresión de proteínas transportadoras de eflujo, como P-gp y/o MRPs (Greiner y col., 1999; Fromm y col., 2000). Al evaluar el efecto de BZL sobre la expresión y actividad de P-gp y Mrp2, en órganos involucrados en la absorción y excreción de distintos fármacos que pudieran administrarse simultáneamente con BZL, observamos que el tratamiento de ratas Wistar macho adultas con BZL indujo un aumento en los niveles de expresión y actividad de ambos transportadores en hígado y yeyuno, no así en íleon ni en riñón. Estos resultados nos sugieren que la inducción de P-gp y Mrp2 en hígado, podría alterar la capacidad de excreción biliar de diversos compuestos y llevar a interacciones droga-droga a nivel hepático. Además, el sustancial incremento en los niveles de expresión y actividad de P-gp y Mrp2 observados en el intestino proximal podría llevar a un incremento en la secreción de sustancias presentes en la sangre o a una reducción de la absorción de drogas que son administradas oralmente, como el propio BZL. Estos resultados sugieren que bajo tratamiento con BZL, podrían ser observadas interacciones droga-droga, especialmente en los niveles de excreción, alterando las vías de depuración de compuestos endógenos y exógenos.

El hecho de que el pre-tratamiento con BZL no haya producido alteraciones en la expresión de CYP3A, GST, P-gp y Mrp2 en riñón es desconocido, poniéndose en evidencia un efecto órgano-específico, mediado posiblemente por el receptor de pregnanos X, un receptor nuclear que regula la expresión tanto de enzimas de biotransformación de Fase I y Fase II como así también de transportadores de xenobióticos (Kliewer y col., 2002; Klaassen y Aleksunes, 2010;) y cuya expresión en riñón es baja en comparación con los otros tejidos (Kliewer y col., 1998).

Adicionalmente, nos propusimos estudiar si las alteraciones en las proteínas transportadoras observadas podrían tener algún efecto sobre la biodisponibilidad de una dosis testigo de BZL (5 mg/kg) en ratas. Los parámetros farmacocinéticos de la dosis testigo de BZL calculados mostraron un aumento en la velocidad de eliminación plasmática ( $k$ ) y una menor AUC plasmática en el grupo pre-tratado con BZL en comparación al grupo control, indicando un aumento en la depuración plasmática. Además, la  $C_{m\acute{a}x}$  de BZL en plasma fue menor en los animales pre-tratados con BZL, sugiriendo una menor absorción intestinal de BZL.

Cuando evaluamos la cantidad de BZL excretada por la vía biliar observamos un aumento significativo en este parámetro en animales pre-tratados con BZL en comparación a los animales controles. La cantidad de BZL excretada en orina fue similar entre ambos grupos experimentales, por lo sugerimos que el aumento en la depuración plasmática podría deberse al menos en parte debido a la vía biliar.

Al observar además una disminución en la  $C_{m\acute{a}x}$  alcanzada durante la administración de la dosis testigo de BZL en animales pre-tratados con BZL en comparación al grupo control, decidimos evaluar si la capacidad de absorción intestinal podría estar afectada estudiando el transporte intestinal seroso-mucoso de BZL mediante el modelo de saquitos intestinales. Los resultados obtenidos confirmaron nuestra hipótesis, dado que la velocidad de transporte de BZL desde el lado mucoso al lado seroso fueron menores en el grupo pre-tratado con BZL, que en el grupo control, a lo largo de todo el experimento. Este efecto fue revertido por el co-tratamiento con PSC833 (inhibidor específico de P-gp, análogo no inmunosupresivo de la ciclosporina A), indicando que P-gp podría estar mediando dicho efecto. Antecedentes previos de nuestro grupo de investigación, confirmaron la participación de P-gp en el eflujo de BZL en células (Rigalli y col., 2012). La información obtenida durante esta tesis sugiere la posibilidad de una disminución progresiva en la absorción de BZL y/o incremento en la metabolización/eliminación después de su administración terapéutica. Desafortunadamente, no encontramos evidencia en la literatura de esta posibilidad, o una conexión con la disminución en la eficacia terapéutica. Al presente, también se desconoce si podría existir una

inducción de sistemas de biotransformación y transportadores en pacientes tratados con BZL.

En conclusión, el incremento de la expresión y actividad de P-gp y Mrp2 en hígado y yeyuno proximal junto con el aumento en la expresión y actividad de CYP3A4 en hígado, y GST hepática e intestinal, debidas al pretratamiento con BZL, podrían dar lugar a la aparición de interacciones droga-droga con otros fármacos que pudieran ser co-administrados durante el tratamiento, pudiendo implicar principalmente sistemas involucrados en la depuración de compuestos endógenos y exógenos; así como modificar la farmacocinética del propio BZL, en pacientes tratados con BZL.

## ***II. Introducción***

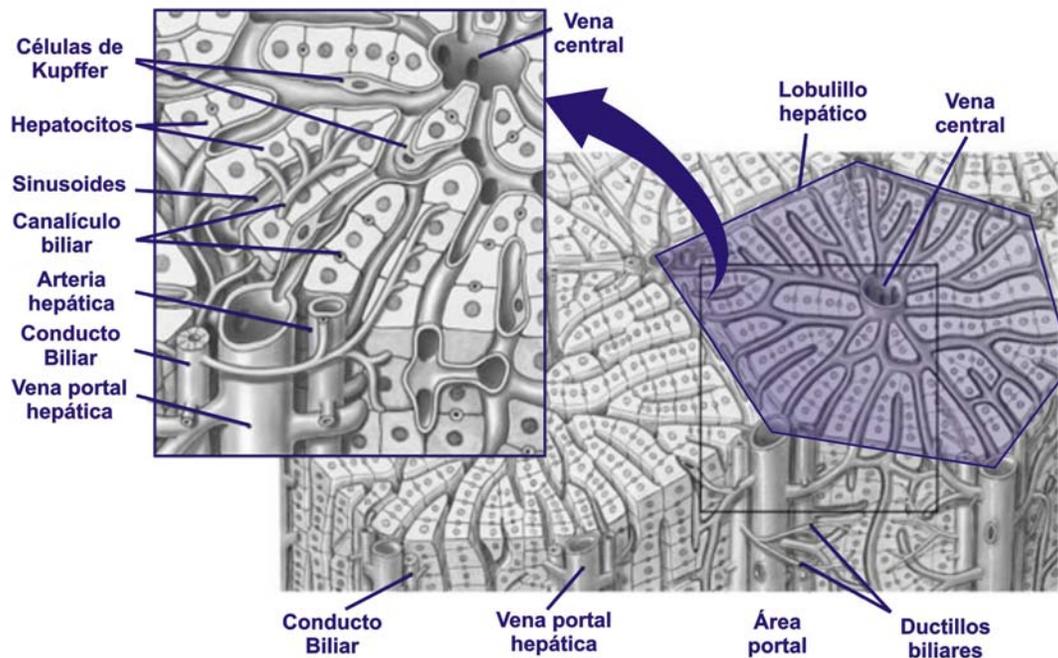
## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. Tejidos con relevancia fármaco-toxicológica.

#### 2.1.1. Hígado.

El hígado es el órgano sólido de mayor tamaño del organismo. Ocupa una posición estratégica, pues se halla interpuesto entre la irrigación sanguínea que proviene del intestino y el resto del organismo (Pfeifer y col., 2013). Así, la principal función de este órgano es la captación de numerosos sustratos que son absorbidos a nivel intestinal, y su ulterior depósito, metabolización y/o -distribución en la sangre y en la bilis. Además, el hígado regula el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas y participa activamente de la biotransformación y secreción de hormonas, fármacos y toxinas. Si bien el hígado puede exportar estos compuestos al plasma con destino a distintos tejidos del organismo o ser finalmente eliminados en orina, la bilis constituye una de las vías esenciales de excreción de los mismos (Desmet, 1994).

En cuanto a su histología, está formado por hepatocitos que adoptan una disposición en láminas formando los lobulillos hepáticos. En el centro del lobulillo se sitúa la vena central; en los vértices o áreas portales se sitúan ramas de la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar. El 80 % del hígado está formado por hepatocitos, que poseen dos superficies laterales en contacto con el espacio de Disse y un tercer lado que contacta los hepatocitos entre sí donde se origina el canalículo biliar. Las uniones intercelulares dan lugar a la sectorización de la membrana plasmática en diferentes dominios: el **polo sinusoidal o basolateral**, que representa una región de intercambio de sustancias que vienen o van desde y hacia la circulación sanguínea (en contacto con el espacio de Disse); el **dominio intercelular**, que es el área de contacto entre hepatocitos, que representa una región especializada en comunicación intercelular y adhesión, y el **polo apical o canalicular**, que presenta su propia morfología y especializaciones, lo que le permite encargarse primariamente del movimiento de sustancias hacia la bilis (Fig. 1), (Desmet, 1994).



**Figura 1: Estructura del lobulillo hepático.** El hígado está formado por hepatocitos que adoptan una disposición en láminas formando los lobulillos hepáticos (derecha). En el centro del lobulillo se sitúa la vena central; en los vértices o áreas portales se sitúan la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar. El 80 % del hígado está formado por hepatocitos, que poseen dos superficies laterales en contacto con el espacio de Disse y un tercer lado que contacta los hepatocitos entre sí donde se origina el canaliculo biliar. Las células de Kupffer, son macrófagos específicos del hígado que se encuentran presentes en los sinusoides hepáticos (izquierda).

La función exócrina del hígado se basa en la producción de bilis, la cual es simultáneamente una secreción digestiva debido a su contenido de sales biliares y un medio de excreción de endo- y xenobióticos, entre ellos fármacos. La bilis es una solución acuosa (90-95 % de agua) que contiene solutos orgánicos (sales biliares, fosfolípidos, colesterol, pigmentos biliares, glutatión y proteínas, así como múltiples metabolitos de sustancias endógenas y exógenas) e inorgánicos (fundamentalmente bicarbonato, cloruro, sodio, potasio y calcio) (Erlinger, 1994). La mayor parte de los componentes de la secreción biliar son sintetizados y secretados por el hepatocito a los canaliculos biliares, que drenan al conducto hepático común. A partir de aquí, la secreción puede ser vertida directamente al intestino a través del conducto colédoco, o en los animales que poseen vesícula

biliar, puede ser desviada a través del conducto cístico al interior de la misma, donde permanecerá almacenada hasta su posterior liberación.

La formación de la bilis resulta de la secreción de compuestos osmóticamente activos desde los hepatocitos hacia el espacio canalicular, seguido del flujo pasivo de agua y electrolitos por la vía paracelular (a través de las uniones estrechas) o transcelular (facilitado por canales de agua, localizados en la membrana apical y basolateral) a favor del gradiente osmótico (Erlinger y Dhumeaux, 1974). Las sales biliares son los principales solutos en la bilis y su secreción es considerada la fuerza impulsora más importante en la generación del flujo biliar. La fracción del flujo biliar generado por la secreción de sales biliares se denomina **flujo biliar dependiente de sales biliares**, mientras que los procesos independientes de las sales biliares que también contribuyen a la producción de bilis dan lugar al **flujo biliar independiente de sales biliares**, el cual está determinado fundamentalmente por el transporte de glutatión (Ballatori y Truong, 1989; 1992) y bicarbonato (Hardison y Word, 1978; Myers y col., 1996) desde el hepatocito hacia el canalículo biliar.

Por otra parte, el hígado es el órgano con mayor capacidad de síntesis y excreción de glutatión. El glutatión es un tripéptido (L-GluCysGly) que cumple un gran número de funciones fisiológicas celulares, incluyendo: el mantenimiento y regulación del estado redox celular, protección contra el daño por estrés oxidativo, detoxificación de compuestos endógenos y exógenos, almacenaje y transporte de cisteína, regulación del ciclo celular y formación de bilis, entre otros. Este compuesto se encuentra en altas concentraciones en el interior celular, encontrándose mayoritariamente en su forma tiol reducida (GSH). El resto del glutatión se encuentra en forma oxidada (GSSG) o conjugada a otros compuestos facilitando la eliminación de los mismos. La alta proporción de GSH es mantenida por la glutatión reductasa dependiente de NADPH, que reduce una molécula de GSSG a 2 moléculas de GSH. Cuando la capacidad celular de reducir GSSG se ve sobrepasada o impedida, GSSG puede ser activamente transportado fuera de la célula a través de proteínas ABC (Ballatori y col., 2009).

GSH juega un papel fundamental en la protección celular contra la injuria oxidativa. El GSH disminuye con el envejecimiento, el ejercicio violento y también en ciertas patologías como diabetes, SIDA, cirrosis, infecciones, malnutrición proteica, entre otros. Así, la relación entre el nivel de GSSG y el nivel de glutathion total es utilizada como una medida de estrés oxidativo (Kaplowitz, 1990; Lee y col., 1997). Bajo condiciones normales, los niveles intracelulares de GSH son regulados por su velocidad de síntesis y su eflujo. Sin embargo, los niveles de GSH también son influenciados por agentes que generan radicales libres como paracetamol, quimioterápicos, etc.

Si bien el hígado es el órgano cuantitativamente más importante en la metabolización y excreción de compuestos, otros tejidos extrahepáticos están dotados de los mismos sistemas enzimáticos. Luego del hígado, la mucosa gastrointestinal y la corteza renal son los tejidos más activos en la biotransformación de compuestos (Rowland y Walter, 1983; Chhabra y Eastin, 1984).

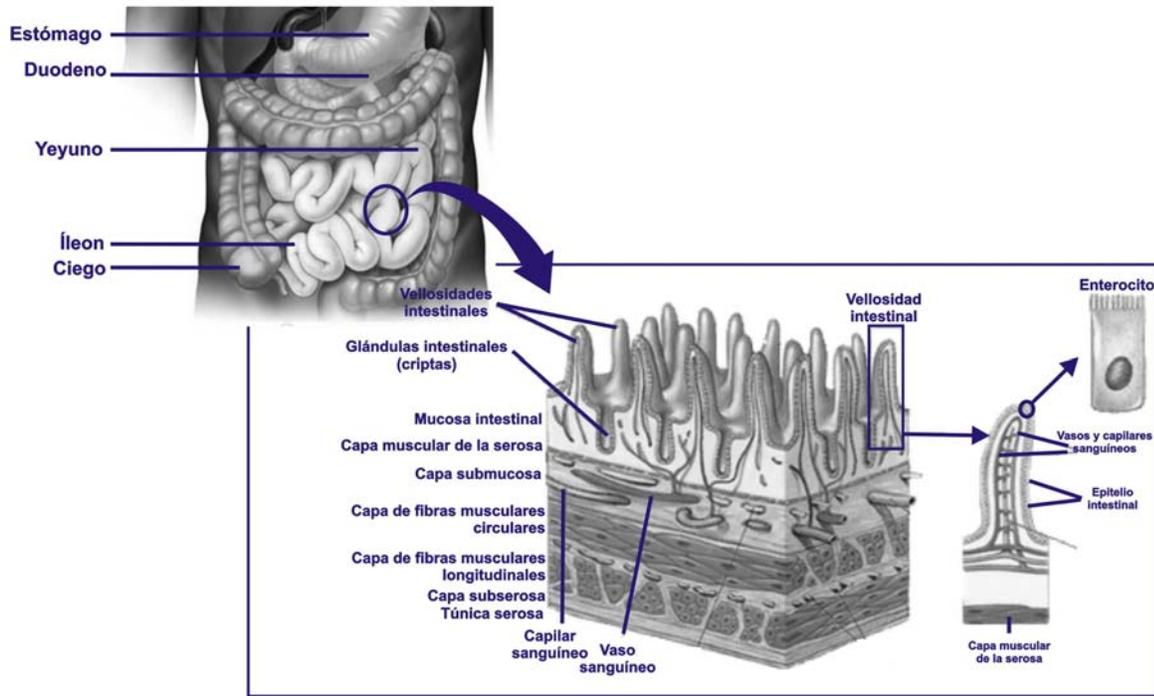
### **2.1.2. Intestino.**

El intestino maduro se divide longitudinalmente en duodeno, yeyuno e íleon (que conforman el intestino delgado) y ciego, colon y recto (que conforman el intestino grueso) (Fig. 2). Internamente, está cubierto por un epitelio de una sola capa de células que se encuentran en contacto a través de uniones estrechas y que actúan como barrera restringiendo el movimiento de moléculas entre el dominio apical y basolateral (DeSesso y Jacobson, 2001).

En cuanto a la histología intestinal (Fig. 2), la pared del intestino delgado se compone de varias capas: mucosa, submucosa, muscular interna, muscular externa y serosa (desde la luz intestinal hacia la capa más externa, respectivamente).

La mucosa consta del **epitelio**, la **lámina propia** y la ***muscularis mucosae***. El **epitelio** es una capa sencilla de células especializadas que limita la luz del intestino. La **lámina propia** está compuesta principalmente por tejido conjuntivo laxo que contiene colágeno y fibrillas de elastina. La lámina propia es

rica en diferentes tipos de glándulas, y contiene nódulos linfáticos y capilares. La ***muscularis mucosae*** es la capa delgada más interna del músculo liso intestinal. Las contracciones de la ***muscularis mucosae*** conforman los pliegues y las crestas



**Figura 2: Estructura del intestino delgado.** El intestino delgado se divide longitudinalmente en duodeno, yeyuno e íleon (margen superior izquierdo). La pared del intestino delgado se compone de cuatro capas: capa mucosa, capa muscular interna, capa muscular externa y capa serosa. La mucosa forma una serie de vellosidades digitiformes recubiertas por células epiteliales (enterocitos). La membrana apical de los enterocitos tiene microvellosidades que en conjunto constituyen el borde en cepillo, que se extiende hacia la luz del intestino delgado. Los nutrientes absorbidos cruzan la pared del capilar sanguíneo o el vaso quilífero para llegar a la sangre o linfa, respectivamente. La capa serosa, rodea por completo el intestino delgado (margen inferior derecho).

de la mucosa (o vellosidades digitiformes, las cuales son proyecciones que incrementan considerablemente el área de superficie epitelial disponible para la absorción y digestión. Los nutrientes, que absorben las células epiteliales que recubren las vellosidades, cruzan la pared del capilar sanguíneo o el vaso quilífero central para llegar a la sangre o linfa, respectivamente. A su vez, la membrana apical de las células de absorción tiene microvellosidades, que incrementan considerablemente el área de superficie de la membrana plasmática, facilitando

que grandes cantidades de nutrientes digeridos puedan difundir rápidamente al interior celular (DeSesso y Jacobson, 2001).

La **submucosa** está compuesta de una gran cantidad de tejido conjuntivo laxo con fibrillas de elastina y colágeno.

La **muscular externa** consta característicamente de dos capas bien definidas de células de músculo liso: una capa **circular interna** y una **longitudinal externa**. Las contracciones de la **muscular externa** mezclan y ponen en circulación el contenido de la luz intestinal y lo propulsan a lo largo del trato GI.

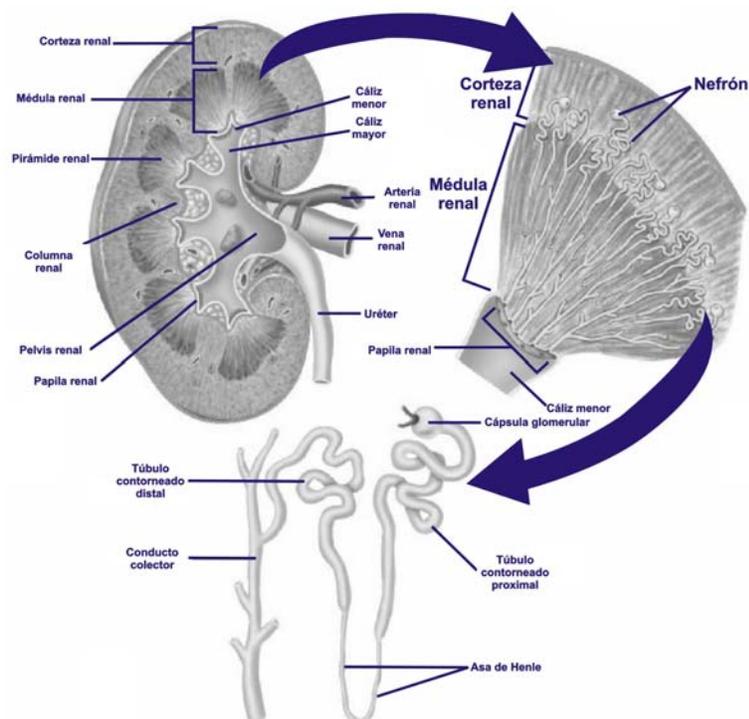
La **serosa** o adventicia es la capa más externa, y se compone principalmente de tejido conjuntivo cubierto por una capa de células mesoteliales escamosas.

Una de las principales funciones del intestino es la absorción de agua, nutrientes y demás compuestos, entre los que pueden mencionarse los fármacos. La absorción de muchos de estos compuestos tiene lugar fundamentalmente a nivel del intestino delgado. La célula más importante para el desempeño de la función absorbente es el enterocito. Al igual que el hepatocito, el enterocito es una célula polarizada con una membrana apical en contacto con el lumen intestinal y una membrana basolateral apoyada sucesivamente sobre la lámina propia y la submucosa (Fig. 2). Los enterocitos además de absorber nutrientes y solutos del lumen intestinal, forman una barrera de permeabilidad selectiva contra el ingreso de xenobióticos. Esta barrera depende de enzimas y transportadores que llevan a cabo las distintas fases de la biotransformación y/o eliminación de los xenobióticos ingresados por vía oral. La absorción intestinal de un compuesto será un factor crítico para determinar la biodisponibilidad del mismo (Geneser, 1984).

### **2.1.3. Riñón.**

Los riñones son órganos pares ubicados retroperitonealmente sobre la pared abdominal. Cada riñón es irrigado por la arterial renal que deriva directamente de la aorta y transporta todos aquellos compuestos presentes en la circulación sistémica. Luego de ingresar al riñón, la arteria renal se ramifica en arterias de menor calibre y finalmente en arteriolas aferentes que irrigan los corpúsculos

renales formando los capilares glomerulares. El nefrón es la unidad funcional del riñón, que se ubica principalmente en la corteza renal. La primera sección tubular de nefrón se denomina túbulo proximal que se continúa con una porción contorneada, el asa de Henle y el túbulo contorneado distal para desembocar en el tubo colector. El glomérulo está rodeado de la cápsula de Bowman delimitando el espacio de Bowman que se comunica con la luz del túbulo proximal. La sangre de la arteriola aferente filtra al espacio de Bowman a través de la barrera de filtración glomerular. La sangre que no llega a filtrar a nivel glomerular desemboca en la arteriola eferente que se vuelve a capilarizar confluyendo luego en venas de cada vez mayor calibre que finalmente desembocan en la vena renal y ésta en la vena cava inferior (Fig. 3; Geneser, 1984).



**Figura 3: Estructura del riñón.** La porción externa del riñón se denomina corteza renal, y descansa directamente debajo de la cápsula de tejido conectivo blando del riñón. La parte interna del riñón se denomina médula renal. La médula renal está compuesta de 8 a 18 subdivisiones cónicas denominadas pirámides renales. La extremidad de cada pirámide (llamada papila) se vacía en un cáliz, y los cálices se vacían en la pelvis renal. La pelvis transmite la orina a la vejiga urinaria vía el uréter. Las pirámides parecen rayadas porque están formadas por segmentos paralelos rectos de túbulos renales. El nefrón es la unidad funcional del riñón, comienza con los capilares glomerulares y se continúa en una porción tubular. La primera sección tubular se denomina túbulo proximal y presenta una parte contorneada o túbulo contorneado proximal y una

parte recta que se comunica mediante un segmento delgado con la parte recta del túbulo distal que es seguido por el túbulo contorneado distal para desembocar en el tubo colector.

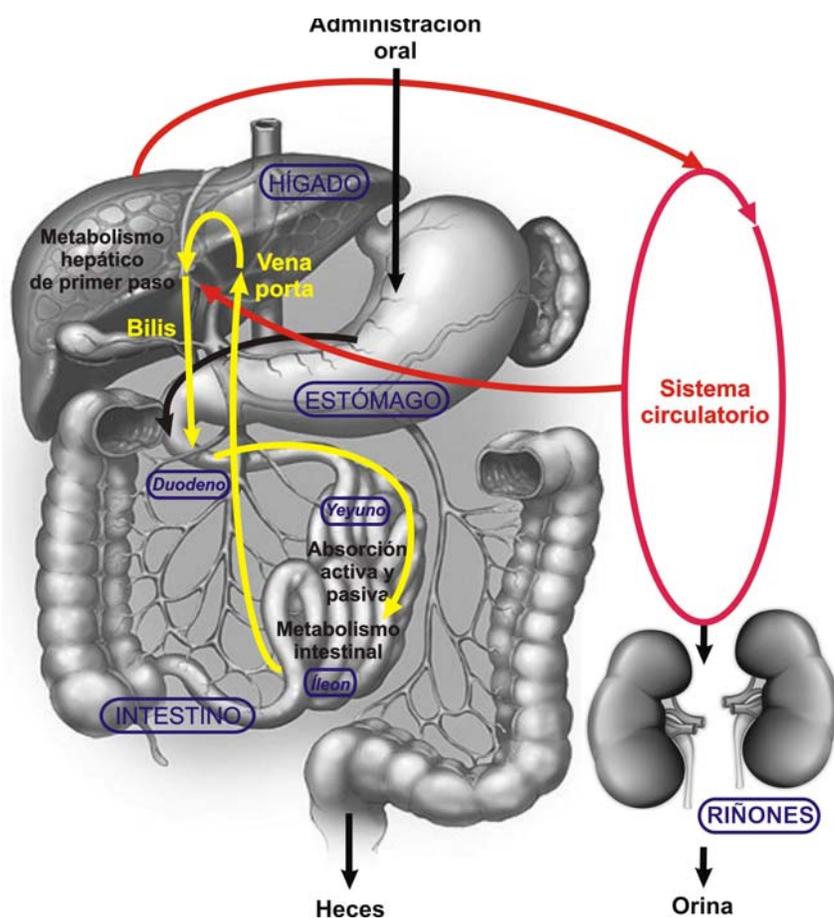
Las células de los túbulos renales son también células polarizadas con un dominio apical o luminal y un dominio basolateral. Diversos compuestos ingresan a la célula a nivel de la membrana basolateral provenientes de la sangre y son luego secretados a través de la membrana apical. Ambos procesos dependen de proteínas transportadoras ya que los compuestos que llegan a esta instancia de eliminación son por lo general de naturaleza hidrosoluble. La orina resultante es dirigida por los tubos colectores a la pelvis renal, los uréteres y finalmente a la vejiga para ser excretada del organismo y junto con ella un gran número de xenobióticos presentes en el organismo (Koeppen, 2009).

#### **2.1.4. Determinantes de la biodisponibilidad de un fármaco.**

Luego de su administración oral, un fármaco llega al intestino donde será absorbido. El mecanismo de absorción varía en función de la naturaleza química del fármaco pudiendo existir un mecanismo de difusión pasiva (en especial para los compuestos predominantemente hidrofóbicos), o mecanismos de difusión facilitada y transporte activo (para compuestos de naturaleza predominantemente hidrofílica). Una vez en el interior del enterocito, el fármaco puede experimentar distintas reacciones de biotransformación dando lugar a un fármaco modificado. Tanto el fármaco sin modificar como sus metabolitos pueden ser transportados nuevamente al lumen intestinal mediante proteínas transportadoras especializadas, ubicadas en la membrana apical, disminuyendo así la absorción neta de los mismos. Por otro lado, y continuando con el proceso de absorción propiamente dicho, el fármaco presente en el interior del enterocito (o sus metabolitos) pueden ser transportados a través de la membrana basolateral mediante proteínas transportadoras llegando al espacio intersticial y de ahí a los vasos sanguíneos (Fig. 4).

La fracción de xenobiótico que eventualmente escapa a la primera línea de defensa intestinal y pasa a la sangre, luego llega al hígado a través del sistema porta, donde podrá ser nuevamente metabolizado y excretado en bilis, por acción

de sistemas enzimáticos y transportadores ABC, respectivamente, similares a aquéllos presentes en el intestino, dando lugar al **efecto del primer paso**. Los xenobióticos que ingresan al hígado pueden sufrir al menos un ciclo de **circulación entero-hepática**. Este proceso tiene lugar cuando los compuestos exógenos que ingresan al tracto digestivo son absorbidos, luego son removidos de la sangre hacia los hepatocitos, secretados en la bilis y depositados al lumen intestinal donde pueden ser nuevamente absorbidos por las células intestinales y ser capaces de recircular. Tanto para los xenobióticos como para sus metabolitos, la circulación entero-hepática puede concluir en su eliminación en las heces o, si el compuesto ha entrado en circulación sistémica, en la orina (Roberts y col., 2002).



**Figura 4: Biodisponibilidad de un fármaco.** Luego de su administración oral, un fármaco llega al intestino donde será absorbido. Dentro del enterocito, el fármaco puede ser metabolizado. El fármaco y sus metabolitos pueden ser transportados a través de la membrana basolateral mediante proteínas transportadoras llegando a los vasos sanguíneos, y posteriormente al hígado, pudiendo ser nuevamente metabolizados, por sistemas

enzimáticos y transportadores ABC. Posteriormente, los xenobióticos que ingresan al hígado pueden sufrir al menos un ciclo de circulación entero-hepática. Tanto para los xenobióticos como para sus metabolitos, la circulación entero-hepática puede concluir en su eliminación en las heces o, si el compuesto ha entrado en circulación sistémica, en la orina.

El proceso de recirculación entero-hepática es asociado normalmente con la aparición de múltiples picos y largos tiempos de vida media en el perfil tiempo-concentración plasmática. La biodisponibilidad se ve afectada entonces, tanto por la absorción intestinal y la presencia de proteínas de eflujo y metabolismos en la pared intestinal, como por la capacidad de un fármaco de ser excretado por la vía biliar. Los factores que afectan la excreción biliar son característicos de cada droga (estructura química, polaridad y tamaño de la molécula), del transporte a través de la membrana plasmática sinusoidal y la membrana canalicular, biotransformación y posible reabsorción en los ductos biliares intrahepáticos. En general, la recirculación entero-hepática puede prolongar el efecto farmacológico de ciertas drogas y sus metabolitos, particularmente modificando su biodisponibilidad, volumen aparente de distribución y el *clearance* de un dado compuesto. Anormalidades genéticas, enfermedades, administración de adsorbentes y ciertas drogas co-administradas afectan la circulación entero-hepática (Roberts y col., 2002).

Alternativamente, aquellos compuestos que ya accedieron a la circulación sistémica, ya sea aquellos que sobrepasaron el efecto de primer paso o incluso aquellos administrados parenteralmente, pueden sufrir también excreción a nivel intestinal. Los mismos son captados basolateralmente por el enterocito y luego secretados al lumen intestinal mediante proteínas transportadoras especializadas. No obstante, la proporción que esto representa de la excreción total del fármaco suele ser ínfima en comparación con la excreción hepática o renal (Villanueva y col., 2012).

## **2.2. XENOBIÓTICOS: generalidades.**

Los xenobióticos son compuestos de naturaleza química muy variada, que se encuentran en el medio ambiente de forma natural o surgen como resultado de

la actividad humana. Los organismos vivos se encuentran constantemente expuestos a una gran variedad de estos compuestos a los que metabolizan y/o acumulan. Muchos xenobióticos son utilizados en la industria de plásticos, pinturas, alimentos, medicamentos, combustibles, cosméticos, cigarrillos, etc. Las principales rutas de exposición a estas sustancias son: inhalación, absorción dérmica y absorción a través del tracto gastrointestinal. Una vez en el organismo, los xenobióticos se distribuyen en varios compartimentos del cuerpo de acuerdo a sus características fisicoquímicas (Kovacic y Somanathan, 2009; Bhattacharya y Keating, 2011; Lima y col., 2011).

Estos compuestos son generalmente compuestos apolares y lipofílicos, característica que les permite atravesar con facilidad las membranas biológicas, imposibilitando su excreción por orina o heces y acumulándose en tejidos grasos. Pero generalmente, suelen sufrir procesos de biotransformación, o metabolización, generando metabolitos más hidrosolubles, que facilitan su eliminación (Pfeifer y col., 2013). La biotransformación es definida entonces como la suma de todas las reacciones químicas que alteran la estructura, solubilidad en agua y eventual distribución de endo- y xenobióticos. Los organismos biológicos poseen sistemas enzimáticos que catalizan estos procesos de biotransformación que procuran disminuir la toxicidad global de los xenobióticos, aunque en algunos casos se generan intermediarios aún más tóxicos o activos (Martinez-Cabot y col., 2005; Zhou y col., 2007).

### **2.3. Reacciones de biotransformación.**

Las reacciones de biotransformación han sido clasificadas en:

1. **Reacciones de fase I:** (catalizadas por el sistema de citocromo P450, CYPs, entre otras enzimas) que generalmente son el primer paso en el metabolismo de sustancias e involucran modificaciones de la estructura molecular de los químicos a través de reacciones oxidativas, reductivas o de hidrólisis, generando grupos funcionales hidroxilos, carboxilos y epóxidos en el compuesto original (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

2. **Reacciones de fase II:** típicamente involucran la adición (conjugación) de un sustrato endógeno pequeño (glucuronato, sulfato, acetato o glutatión, entre otros), para acrecentar la solubilidad en agua de los químicos, a través de la formación de un derivado más polar y facilitar con ello la rápida excreción fecal o urinaria. Son catalizadas por familias de enzimas denominadas: GSTs (glutathione-S-transferasas) y UGTs (uridín-difosfo-glucuronosiltransferasa), entre otras (Dietrich y col., 2003).

3. **Fase III del metabolismo** o la eliminación de tales metabolitos: representada por los procesos de transporte. Los transportadores involucrados en los mecanismos de excreción de la fase III, pueden ser miembros de la familia de transportadores ABC (del inglés: “*ATP Binding Cassete*”) que comprenden aquellas proteínas denominadas MDR (del inglés: “*multidrug resistance protein*”, como MDR1 o P-glicoproteína, P-gp) y MRP (del inglés: “*multidrug resistance-associated protein*”, como la proteína asociada a resistencia a múltiples drogas 2, MRP2). Estos proveen una importante barrera contra la penetración de drogas y/o un eficiente mecanismo de eliminación (Mottino y col., 2000; Ayrton y Morgan, 2001; Chan y col., 2004).

### 2.3.1. Reacciones de fase I: Citocromo P450.

El citocromo P450 (CYP) es una superfamilia de hemoproteínas que generalmente forman parte de cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes, que juegan un rol clave en el metabolismo oxidativo de numerosos compuestos endógenos y exógenos (Nelson y col., 1996).

Estas enzimas se encuentran presentes en numerosas especies (bacterias, hongos, plantas, insectos, nematodos, peces, aves, mamíferos), (Lewis, 2001). En mamíferos, este sistema se expresa en diferentes órganos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos y placenta entre otros, pero es particularmente activo en el hígado (Ding y Kaminsky, 2003). Además, el CYP se encuentra presente en la mitocondria y en diversos tipos de membranas celulares, siendo particularmente abundante en el retículo endoplasmático liso,

constituyendo entre el 12 y 15 % del retículo endoplasmático (Orellana y Guajardo, 2004).

Los CYPs catalizan el primer paso en reacciones de biotransformación (principalmente en hígado como se dijo anteriormente) de un sin número de xenobióticos como ser: fármacos, pesticidas, pro-carcinógenos, solventes orgánicos, y de sustratos endógenos de importancia biológica como: colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroideas y ácidos grasos (Lewis, 2001). Sus reacciones involucran modificaciones de la estructura molecular de sus metabolitos a través de reacciones oxidativas, reductivas o de hidrólisis, generando grupos funcionales hidroxilos, carboxilos y epóxidos en el compuesto original (Goeptar y col., 1995). Estas hemoproteínas se encuentran relacionadas con una segunda proteína de membrana, la NADPH-citocromo P450 reductasa que posee el complejo FAD/FMN capaz de transferir los electrones necesarios para la reacción oxidativa producida en el citocromo P450.

En general, las CYPs de eucariotas tiene un peso molecular de unos 50 a 60 kDa, y se identifican con las siglas CYP seguido de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que se corresponde con el gen (por ejemplo, CYP1A1). En humanos y ratas, han sido clasificadas en cuatro familias (1, 2, 3 y 4), donde muchas de sus isoformas se encuentran implicadas es el metabolismo de diversos fármacos (Lewis, 2001).

La familia 3 metaboliza la mayoría las drogas de uso terapéutico a través de su miembro más representativo, la isoforma CYP3A4, que en el hígado humano representa el 30 % del contenido total de citocromos, y es responsable del metabolismo hepático del 60 % de las drogas de uso terapéutico (Li y col, 1995). En humanos, se expresan cuatro isoformas de la familia de proteínas CYP3A: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43. CYP3A4 y CYP3A5 son las isoformas más abundantes en hígado, y están involucradas en la biotransformación de la mayoría de las drogas. Ambas proteínas se expresan en hígado, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y riñón. En intestino, la expresión y actividad de CYP3A disminuye longitudinalmente hacia la región más distal del intestino delgado, que junto con su localización estratégica

en la punta de las vellosidades hacen que CYP3A posea un rol crucial en el metabolismo y biodisposición de drogas. En ratas, se ha observado la presencia de las isoformas de CYP3A: CYP3A1, CYP3A2, CYP3A4, CYP3A9, CYP3A18, CYP3A23 y CYP3A62 (Dresser y col., 2000).

Su expresión y actividad son influenciadas por diversos factores como la edad, sexo, dieta, especie, tejido y estado hormonal (Warrington y col., 2004). Además, la actividad de las enzimas de la familia CYP3A presenta una alta variabilidad interindividual entre la población debido a que esta enzima es altamente modulable, ya sea por otros fármacos (inductores o inhibidores), enfermedades, la dieta o factores ambientales (Lewis, 2001).

Estas enzimas se encuentran relacionadas con el metabolismo de gran número de xenobióticos como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre otros, así como de algunas sustancias endógenas como colesterol, ácidos biliares, esteroides, vitaminas liposolubles y ácidos grasos (Ding y Kaminsky, 2003). CYP3A también tiene importancia en el metabolismo de muchas sustancias psicoactivas, como cocaína, metadona, ansiolíticos, hipnóticos, antipsicóticos, antiepilépticos o los inhibidores de la recaptación de serotonina. Dentro de sus sustratos encontramos: diazepam, midazolam, flunitrazepam y testosterona. Además, esta proteína puede ser inhibida por ketoconazol y ciproflozaina, entre otros (Lewis, 2001). Debido a la gran cantidad de fármacos metabolizados por esta enzima, la importancia clínica de este citocromo es obvia. Por ejemplo, en la terapia farmacológica post-transplante, muchos de los inmunosupresores utilizados (como ser la ciclosporina), son sustratos de CYP3A y también de P-gp en el tracto gastrointestinal, de forma que el uso de otros fármacos en dicha terapia, como los esteroides, que alteren la actividad de CYP3A y/o P-gp, pueden afectar a los niveles del inmunosupresor necesitando un ajuste de su dosis para alcanzar el efecto terapéutico o evitar efectos adversos (Ufer y col., 2008).

### **2.3.2. Reacciones de fase II.**

El metabolismo de fase I generalmente, aunque no siempre, precede a diversos pasos de conjugación denominados metabolismo de fase II. Los sistemas enzimáticos de fase II conjugan compuestos con ácido uridindifosfoglucurónico (mediado por UDP-glucuronosiltransferasas, UGTs), con glutatión (Glutatión-S-transferasas, GSTs), con sulfato (sulfotransferasas) o con grupos acetilos (acetiltransferasas) generando así, compuestos más hidrofílicos y por lo tanto más fácilmente excretables (Dietrich y col., 2003).

#### **2.3.2.1. UDP-Glucuronosiltransferasas (UGTs).**

La superfamilia de enzimas UGTs comprende a un grupo de proteínas que catalizan la transferencia de ácido glucurónico desde UDP-ácido glucurónico (UDP-GA, molécula dadora) a una pequeña molécula hidrofóbica (sustrato aceptor). Los sustratos de UGT comprenden compuestos exógenos (como ser paracetamol, nicotina, morfina, S-oxazepam) (Dutton, 1980) y endógenos (esteroides, bilirrubina y catecolaminas), entre los que se cuentan numerosos esteroides, bilirrubina, serotonina, ácidos biliares y catecolaminas, entre otros (Tephly y col., 1988; Wells y col., 2004; Bock, 2010).

En base a su diversidad evolutiva, estas enzimas han sido clasificadas dentro de dos grandes familias: UGT1 y UGT2. La familia UGT1 comprende nueve isoenzimas con diferentes dominios amino terminal e idéntico dominio carboxilo terminal, y la familia UGT2 se encuentra constituida por once isoenzimas diferentes (Bock, 2012). Las UGTs presentes en humanos se dividen en 3 subfamilias (UGT1A, UGT2A y UGT2B) (Ishii y col., 2010). En base a las similitudes de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables, las enzimas de rata han sido tentativamente divididas en tres subfamilias (UGT1A, UGT1B y UGT2B), (Yokota y col., 1999).

Muchas de las formas individuales de UGT1A se expresan no sólo en hígado sino también en tejidos extrahepáticos, donde la magnitud de la glucuronización puede ser sustancial. La expresión constitutiva de las isoenzimas

de UGT en los distintos órganos depende de la presencia de elementos regulatorios específicos en cada tipo de tejido (Kiang y col., 2005).

Estas enzimas se expresan en el retículo endoplasmático de hepatocitos, enterocitos y células de los túbulos renales, entre otros tipos celulares, lo que le confiere una ventaja al tener acceso inmediato a los sustratos que se generan *in situ* como producto de las reacciones de fase I (Catania y col., 2004). En la rata, las UGTs se expresan a lo largo de todo el intestino mostrando poca diferencia entre el duodeno y el íleon distal; sin embargo, existen controversias sobre si es mayor su expresión y actividad en las vellosidades o en las criptas intestinales (Mulder, 1990). El extremo carboxilo terminal de estas proteínas se encuentra anclado a la membrana del retículo endoplasmático, mientras el resto de la proteína, incluido su sitio catalítico, se encuentra ubicado hacia el lumen. Debido a la localización intra-retículo endoplasmático de las UGTs, el co-sustrato UDP-GA, debe ingresar desde el citosol a la luz mediado por un transportador específico (isoenzima 7 relacionada con el transportador de galactosa). Posteriormente, los glucurónidos formados en el lumen del retículo endoplasmático son rápidamente traslocados al citosol, aunque los transportadores involucrados en este paso aún no han sido identificados. Finalmente, los glucurónidos son transportados desde el citosol a la bilis o la sangre, a través de distintos miembros de la familia de proteínas asociadas a multidroga (MRPs) y transportadores de aniones orgánicos (OATPs) (Ishii y col., 2010).

Por otra parte, la potencia de muchos compuestos biológicamente activos depende del balance entre su formación y su remoción, esta última facilitada por las reacciones de conjugación de fase II. La glucuronización es una de las mayores rutas de biotransformación y tiene profundos efectos sobre la disposición, metabolismo y excreción de muchas sustancias endógenas (tales como bilirrubina, esteroides y catecolaminas), drogas y diversos compuestos exógenos. En la mayoría de los casos conduce a la detoxificación e inactivación de los compuestos. Los glucurónidos son más polares y más solubles en agua que sus agliconas y así, su formación contribuye a la eliminación del compuesto original del organismo. Sin embargo, en algunas circunstancias la toxicidad del sustrato en

cuestión puede aumentar luego de ser conjugado, o bien, puede tener una mayor actividad biológica como en el caso de la morfina y el ácido retinoico, los cuales son convertidos a glucurónidos farmacológicamente más activos que el compuesto original (Ishii y col., 2010).

El sistema de las UGTs cataliza el 35 % de las reacciones de Fase II, y su expresión y actividad son moduladas por regulación génica, fosforilación, glicosilación, homo-hetero-oligomerización, y asociación proteína-proteína con citocromo P450 (Ishii y col., 2010). La regulación diferencial de la expresión genética de las diferentes UGTs es controlada por factores endógenos y exógenos tales como: desarrollo post-natal (Strassburg y col., 2002), hormonas sexuales (Strasser y col., 1997; Hum y col., 1999), hormonas tiroideas (Masmoudi y col., 1997; Haberkorn y col., 2003), inductores enzimáticos (Luquita y col., 1996; Catania y col., 2003) y antioxidantes presentes en los alimentos (Kashfi y col., 1994; Bock-Hennig y col., 2002) entre otros.

#### **2.3.2.2. Glutation-S-transferasas (GSTs).**

Las proteínas GSTs catalizan la conjugación de compuestos no polares incluyendo xenobióticos, drogas y en pesticidas con glutatión, formando conjugados solubles en agua que son excretados de la célula vía proteínas transportadoras de la membrana celular. Además, las GSTs contribuyen a la detoxificación de radicales libres producidos endógenamente (como especies reactivas del oxígeno), catalizan un gran rango de otras reacciones dependientes de glutatión y regulan un gran número de procesos celulares vía interacciones proteína-proteína (Borrad y Menon, 2013).

Al menos cuatro familias de proteínas, ampliamente distribuidas en la naturaleza, exhiben actividad GST. Dos de estas familias, de localización citosólica y la de localización mitocondrial (GSTs clase Kappa), comprenden enzimas solubles poco relacionadas. La tercer familia comprende a las GSTs microsomales y se trata de proteínas de membrana asociadas al metabolismo de glutatión e icosanoides (MAPEG). Por último, se encuentran las proteínas de resistencia a fosfomicina. Las GSTs citosólicas han sido extensamente estudiadas

en humanos, ratones y ratas, así como en algunas plantas, insectos y algunas especies microbianas, y representan la familia más abundante de las transferasas (Borrad y Menon, 2013).

Las principales isoenzimas citosólicas de GSTs de rata comparten propiedades estructurales y catalíticas con las de ratón y humano. Esto llevó a una clasificación general independiente de la especie (Hayes y Pulford, 1995), basándose en la secuencia amino terminal, la especificidad de sustrato, la sensibilidad a ciertos inhibidores y las reactividades inmunológicas cruzadas. Así, se pudieron clasificar a las GSTs citosólicas de mamíferos en siete clases: Alfa ( $\alpha$ ), Mu ( $\mu$ ) y Pi ( $\pi$ ) (las tres más abundantes), Sigma, Theta, Omega y Zeta (Meyer y col., 1991; Hayes y Pulford, 1995; Armstrong, 1997) donde las proteínas de cada clase son denominadas por la letra inicial del nombre de clase; por ejemplo: GSTA1-1 es el producto homodimérico del gen de GSTA1 de la clase alfa.

Se ha descrito la presencia de GST en hígado, riñón y el tracto gastrointestinal entre otras localizaciones (Jancova y col., 2010). En el hígado normal, el órgano más activo en conjugación con GSH, las clases de GST $\alpha$  y GST $\mu$  se encuentran ampliamente expresadas, mientras que se observa una muy baja expresión de GST $\pi$ . En el caso de GST $\pi$ , ha sido observado un patrón de expresión diferencial en hígado donde su expresión es mayor en las células del ductos biliares y en hepatocitos perivenosos, y disminuye al acercarse a la región de hepatocitos periportales. En muchos otros tejidos GST $\pi$  es usualmente abundante y muchas veces predominante, como ser: eritrocitos, plaquetas, tiroides, placentas, bazo, corazón, pulmón, riñón y páncreas. En riñón humano, como en riñón de rata, se expresan cantidades considerables de estas tres familias. GST $\alpha$  también se expresa en glándulas mamarias lactantes y glándulas adrenales (Mulder, 1990). Además, estas proteínas presentan un gradiente de expresión a lo largo del intestino y del eje vellosidad-cripta encontrándose mayores niveles en el intestino proximal y en la punta de las vellosidades estando ausentes en las criptas (Hayes y col., 1989; Chan y col., 2004).

Estas proteínas pueden incrementar sus niveles de expresión por exposición a compuestos exógenos, representando de este modo, un punto de gran interés para farmacólogos y toxicólogos (Jakobsson y col., 1999). En diferentes organismos se observó que la actividad de las GSTs aumenta luego de su exposición a compuestos del medio ambiente. Este fenómeno de inducción forma parte de una respuesta adaptativa al estrés químico (Smith, 1991; Pushparajah y col., 2008; Richert y col., 2009). La exposición de animales o células a sustancias tóxicas o varios pro-oxidantes inducen GST y otras enzimas de fase II (Kim y Cho, 1996). La inducción de GST puede actuar como un mecanismo de desintoxicación celular y supervivencia. La inducción de GST en respuesta a la exposición a sustancias tóxicas y agentes quimioprotectores (Thimmulappa y col., 2002) puede ser mediada por una regulación transcripcional o pos-transcripcional.

#### **2.3.2.3. Reacciones de “fase III”. Generalidades.**

La magnitud de acumulación de una droga en un determinado tejido es frecuentemente limitada no tanto por su habilidad para entrar a las células sino por su tendencia a dejarla. Esto está relacionado con los mecanismos de eflujo presentes en la membrana celular que juegan un rol crítico en limitar la absorción y acumulación de sustancias potencialmente tóxicas o de uso terapéutico, y que pueden conferir resistencia a esos compuestos. El eflujo de ciertas sustancias se encuentra mediado por las bombas exportadoras (transportadores del tipo ABC), que reducen la carga celular local de estos compuestos, protegiendo a las células de sus efectos tóxicos (Chan y col., 2004). Todos los transportadores involucrados en el metabolismo de “fase III” median el eflujo celular contra gradiente de forma activa, funcionando como bombas exportadoras unidireccionales dependientes de ATP. Así, los transportadores actúan por un lado, reduciendo el ingreso de sustancias nocivas y por otro lado, eliminando sus productos de detoxificación.

Si bien los transportadores ABC se expresan diferencialmente en distintos tipos celulares (macrófagos, epitelios absortivos o secretores, etc.), tanto su expresión como su localización no son estáticas ya que las células tienen una

remarcable capacidad para regular la cantidad de transportadores de membrana a nivel transcripcional, post-transcripcional o por regulación del tráfico intracelular y localización (Pfeifer y col., 2013). El tratamiento con determinados compuestos es capaz de alterar la expresión y actividad de los mismos en distintos tejidos y con ello modificar su farmacocinética y biodisponibilidad como así también la de drogas co-administradas que son también sustratos de dichos transportadores (Ibrahim y col., 2001).

Los cambios a corto plazo en la actividad de transporte y en la expresión se generan a nivel pos-traducciona. Una regulación rápida mediada por segundos mensajeros y quinasas modula el reclutamiento de los transportadores de los reservorios intracelulares a la membrana plasmática o altera el grado de fosforilación de los transportadores y/o las interacciones entre proteínas asociadas. Otros mecanismos de regulación son los pos-transcripcionales que incluyen cambios en el procesamiento y estabilidad del ARNm. Todos estos factores actúan en asociación para regular el estado funcional de los transportadores ABC.

A nivel transcripcional, una amplia variedad de receptores nucleares activados por ligandos, co-activadores y co-represores, median los requerimientos de estos transportadores. Los sistemas de biotransformación (reacciones de fase I y II) que actúan en coordinación con las proteínas de eflujo, también están regulados por la misma red de receptores nucleares (Catania y col., 2004; Eloranta y col., 2005). La regulación transcripcional de los transportadores mediada por receptores nucleares es un proceso complejo que implica: la unión del ligando, el reclutamiento de co-reguladores, la asociación de los complejos a los sitios de regulación en los promotores de los genes y la atenuación o finalización de la respuesta dependiente de receptores nucleares (Glass y Rosenfeld, 2000; Acevedo y Kraus, 2004; Metivier y col., 2006).

De acuerdo con sus propiedades de dimerización y unión al ADN, los receptores nucleares pueden clasificarse en cuatro grupos. Los de clase I comprenden los receptores clásicos de hormonas esteroideas como estradiol, testosterona, progesterona y cortisol. Estos forman homodímeros antes de unirse

a los elementos de respuesta en las regiones promotoras de los genes diana. A la clase II, pertenecen el receptor de pregnanos X (PXR), el receptor constitutivo de androstanos (CAR), y el receptor de farnesoides X (FXR), que forman heterodímeros con el receptor X de retinoides  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ), antes de interactuar con los genes diana. Los receptores que pertenecen a la clase III, como el factor nuclear hepático 4, son receptores sin ligando que se unen al ADN como homodímeros o los de clase IV (menos conocidos) como monómeros (Mangelsdorf y col., 1995).

Por otra parte, la regulación de la actividad de las proteínas transportadoras depende de la relación entre la reserva intracelular y que transportadores de membrana pueden ser reclutados e insertados en la membrana, así como de la reinternalización de transportadores de la membrana como resultado de la presencia de un xenobiótico, de una enfermedad o simplemente por demanda fisiológica (Pfeifer y col., 2013).

#### **2.3.2.3.1. MDR1/Mdr1a/b/P-gp.**

En el gen MDR1/Mdr1a/b se encuentra codificada la secuencia que expresa la proteína conocida como Abcb1 o P-gp. Esta proteína transportadora no sólo se expresa en tumores sino también en una amplia gama de tejidos normales como ser: hígado, intestino delgado, colon, riñones, glándulas suprarrenales, pulmón y en capilares de la barrera hemato-encefálica, y en niveles bajos en próstata, piel, bazo, corazón, músculo esquelético, estómago y ovario (Gatmaitan y Arias, 1993; Leslie y col., 2005; Tucker y col., 2012) entre otros. La localización polarizada de P-gp en la membrana apical de intestino, hígado y riñón sugiere un rol de barrera en el control del flujo de xenobióticos y toxinas hacia el lumen intestinal, bilis y orina, respectivamente (Thiebaut y col., 1987; Gatmaitan y Arias, 1993; Terao y col., 1996; Tsuji y Tamai, 1996).

En particular, P-gp intestinal se localiza en la membrana apical de los enterocitos de todo el intestino desde el duodeno hasta el recto, mostrando mayores niveles de expresión en el intestino delgado distal (íleon) y en la punta de las vellosidades (Hunter y col., 1993a; Hunter y col., 1993b; Terao y col., 1996;

Thorn y col., 2005; Canaparo y col., 2007). P-gp se encuentra entonces en una posición ideal para limitar la absorción de sus sustratos, bombeándolos de nuevo hacia la luz (Chan y col., 2004). Curiosamente, otros sistemas se co-expresan con P-gp en este tejido. Se trata de CYP3A, y UGTs, que representan un mecanismo de defensa adicional contra el ingreso de xenobióticos dietarios. Una fuerte correlación entre la expresión de una enzima metabolizadora de drogas y un transportador de drogas se puede atribuir a una co-regulación mediada por un receptor nuclear común (Geick y col., 2001; Tirona y col., 2003).

A diferencia de los humanos, donde sólo encontramos un gen *MDR1*, en roedores existen tres genes: *mdr1a*, *mdr1b* y *mdr2*, donde las proteínas codificadas por los dos primeros corresponden funcionalmente a MDR1 en humanos. Así, las proteínas derivadas de estos genes tienen una distribución y especificidad de sustrato superpuesta, y en conjunto parecen llevar a cabo la misma función que MDR1 humano (Ishikawa y col., 2004).

P-gp muestra una amplia especificidad de sustratos, con mayor afinidad por compuestos hidrofóbicos, cationes orgánicos de alto peso molecular y compuestos anfifílicos. La lista de sustratos/inhibidores identificados crece continuamente e incluye tanto compuesto endógenos (como hormonas esteroideas y sales biliares), como exógenos: agentes anticancerígenos (vinblastina, vincristina, daunorubicina, doxorubicina, etopósido, paclitaxel, etc.), drogas para tratar afecciones cardíacas (digoxina, celiprolol, quinidina, amiodarona, verapamilo), diuréticos (hidroclorotiazida), antibióticos (levofloxacin, eritromicina, etc.), antivirales (indinavir, saquinavir, etc.), inmunosupresores (ciclosporina A, tacrolimus), antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> (cimetidina, ranitidina), entre otros (Chan y col., 2004; Estudante y col., 2013). Sin embargo, otros transportadores de tipo ABC, como BCRP (del inglés: "*breast cancer resistance protein*"), comparten la capacidad de transportar alguno de los sustratos que son excretados vía P-gp, como Rodamina 123 (Rho-123), sustrato fluorescente que es utilizado rutinariamente como modelo para la evaluación de la actividad de P-gp (Chan y col., 2004). BCRP se expresa en altas cantidades en sistema nervioso central, glándulas adrenales, placenta, próstata, testículos y útero, y en menores niveles

en hígado, intestino delgado, colon, estómago, riñón y páncreas, entre otros, expresándose en la membrana apical de los hepatocitos y enterocitos de yeyuno (Doyle y col., 1998; Maliepaard y col., 2001; Fetsch y col., 2005).

En cuanto a su función farmaco-toxicológica, P-gp juega un rol clínico en la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral, donde la expresión polarizada en membrana apical de este transportador se acompañaba de la secreción (basolateral a apical; desde la sangre hacia la luz del intestino) de diversos sustratos, funcionando además como una barrera contra el ingreso de xenobióticos en el intestino (Tanigawara, 2000). Esta función es beneficiosa cuando se trata de toxinas y carcinógenos, pero en contrapartida, limita la biodisponibilidad oral de las drogas de aplicación terapéutica, como agentes antimicrobianos contra microorganismos intracelulares, reduciendo la concentración intracelular de la droga y disminuyendo la accesibilidad de la droga a su sitio de acción (Amin, 2013).

Por otra parte, el gen que codifica para este transportador presenta un gran polimorfismo y estas variaciones individuales en la actividad y/o en la expresión de P-gp pueden afectar la biodisponibilidad de drogas y toxinas (Lown y col., 1997; Kim y col., 2001; Schwab y col., 2003).

#### **2.3.2.3.2. MRP2/Mrp2.**

El transportador MRP2/Mrp2, se encuentra distribuido no sólo en la membrana canalicular de hepatocitos sino también en la membrana del ribete en cepillo (BBM, de inglés: "*brush border membrane*") de los enterocitos (Fromm y col., 2000; Mottino y col., 2000b), y en la membrana apical de células epiteliales renales, así como en otros tejidos como el cerebro y la placenta (Leslie y col., 2005). En intestino de rata, Mrp2 concentra su expresión en la punta de las vellosidades, con un gradiente de expresión a lo largo de los diferentes segmentos del intestino delgado, donde la mayor expresión del transportador ocurre en el yeyuno proximal y la menor expresión se observa hacia el íleon distal (Mottino y col., 2001).

Las proteínas MRP2 humana y Mrp2 murina poseen una homología de un 78% en su secuencia de aminoácidos, con un peso molecular que ronda los 200 kDa (Fritz y col., 2000).

El rol fisiológico de MRP2/Mrp2 consiste en la excreción de numerosos aniones orgánicos especialmente compuestos conjugados con ácido glucurónico, glutatión y sulfato, incluyendo el glucurónido de bilirrubina, hacia la bilis, el lumen intestinal y la orina (Oude-Elferink y col., 1995). Además de aniones conjugados, Mrp2 transporta GSH y con mayor afinidad GSSG, teniendo un importante rol en la detoxificación y defensa contra el estrés oxidativo (Suzuki y Sugiyama, 1998; Evers y col., 2000; Dietrich y col., 2001a; Dietrich y col., 2001b; Ballatori y Rebbeor, 2005). Mrp2 media además, el transporte de sales biliares glucuronizadas y sulfatadas (Kullak-Ublick y col., 2000; Akita y col., 2001) constituyendo de esta forma una vía importante de eliminación de compuestos potencialmente tóxicos para el organismo. Debido a esto, es que MRP2/Mrp2 es uno de los principales contribuyentes de la eliminación de numerosos endobióticos, xenobióticos incluyendo drogas así como también de sus conjugados (Akita y col., 2001; Dietrich y col., 2001b; Gerk y Vore, 2002).

La expresión de MRP2 es modulada por procesos colestásicos y carcinogénicos, y en respuesta a diversas hormonas y compuestos químicos no relacionados (rifampicina, espironolactona, etc.), (Fromm y col., 2000; Dietrich y col., 2001b; Ruiz y col., 2009).

Además, la expresión de este transportador se encuentra relacionada con los niveles de expresión de enzimas de fase I como CYP3A4 y de fase II como GSTs y UGTs, las cuales presentan un gradiente de expresión similar a lo largo del intestino y del eje vellosidad-cripta, encontrándose mayores niveles en el intestino proximal y en la punta de las vellosidades (Mottino y col., 2001; Chan y col., 2004).

#### **2.4. Enfermedad de Chagas.**

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria, sistémica, transmitida por vectores y causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*

(*T. cruzi*), con una firme vinculación con aspectos socio-económico-culturales deficitarios, y es considerada una enfermedad desatendida. Esta patología es endémica en 21 países de las Américas, aunque las migraciones de personas infectadas pueden llevarla a países no endémicos de América y el mundo.

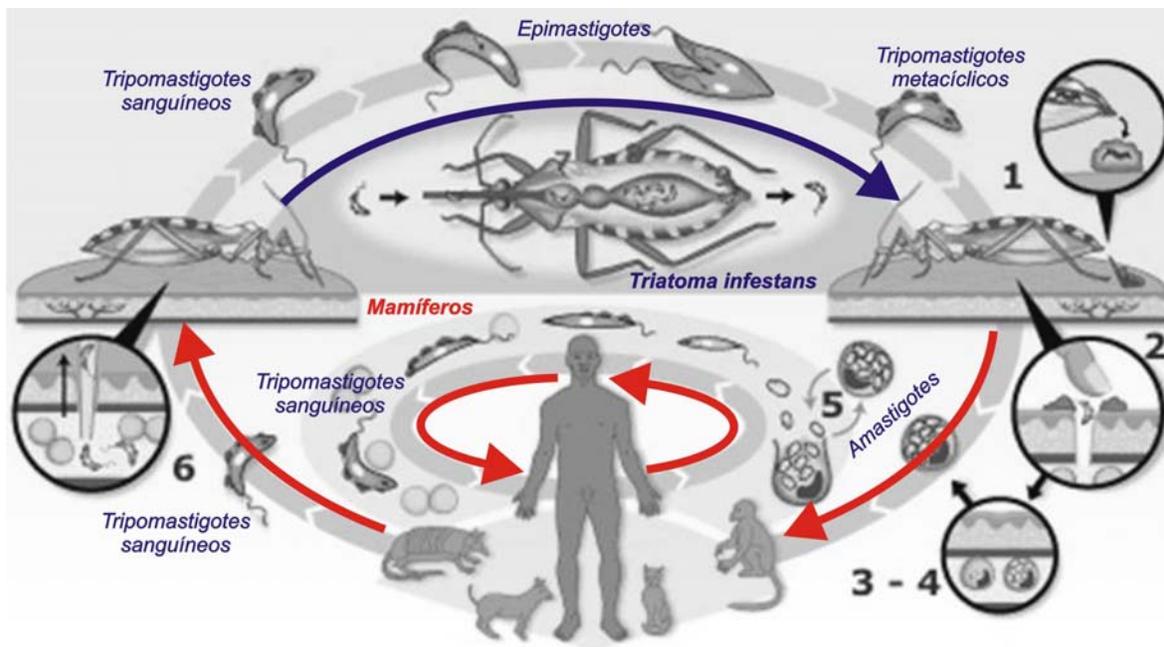
Se estima existen al menos 8 millones de personas infectadas en el mundo y cerca de 100 millones de personas están en riesgo de infección, con una tasa de aparición de nuevos casos alrededor de 56.000 personas por año, resultando en 12.000 muertes anuales por esta enfermedad (OPS, 2013, [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921)).

#### **2.4.1. *Trypanosoma cruzi*.**

El protozooario *T. cruzi* es un endoparásito obligado que cumple su ciclo biológico en huéspedes vertebrados (mamíferos placentarios y marsupiales) y un hospedero intermediario o insecto vector. Con respecto a este último, en nuestra región, el más común es: *Triatoma infestans* (vinchuca), sin embargo, a lo largo del continente americano existen otras especies de insectos hematófagos capaces de actuar como vectores de este parásito.

Durante su ciclo evolutivo, el parásito adopta distintas formas (tripomastigote y amastigote en el mamífero; tripomastigote metacíclico y epimastigote en el vector, Fig. 6) definidas por la presencia o ausencia del flagelo y la posición del cinetoplasto (ADN extranuclear rodeado por una doble membrana que forma parte de la única mitocondria) respecto al núcleo (Hoare, 1972; González Cappa y Durante de Isola, 1994).

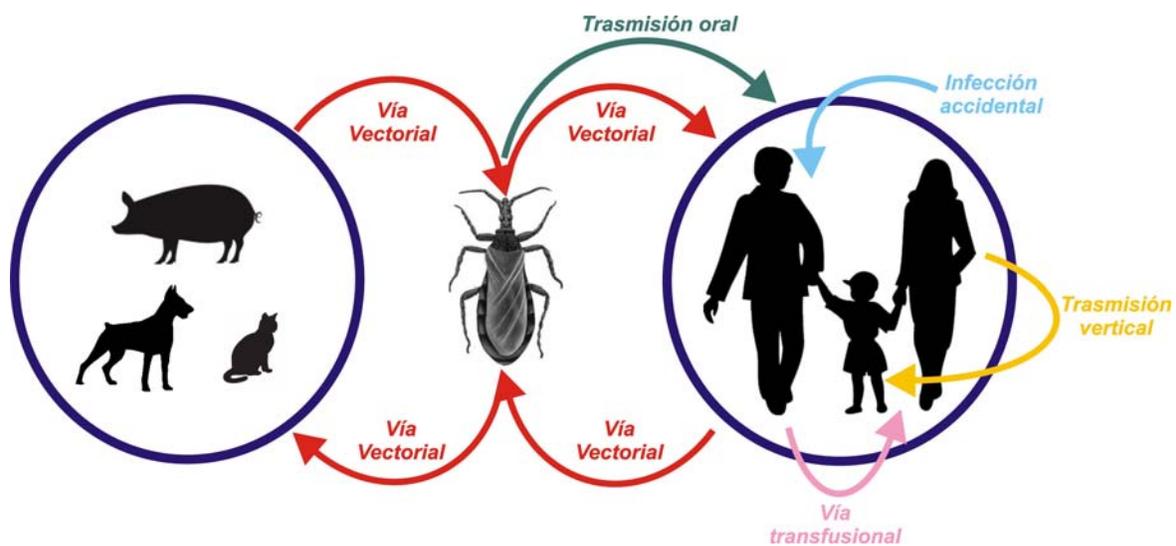
En condiciones naturales, un triatomino infectado se alimenta de sangre y defeca simultáneamente, depositando con las heces formas infectantes (tripomastigotes metacíclicos) del parásito. Los insectos vectores se infectan al ingerir sangre con tripomastigotes de individuos parasitados. En el lumen del intestino medio del insecto los parásitos se multiplican activamente como epimastigotes, por fisión binaria. Al cabo de 15-30 días se desarrollan tripomastigotes en el intestino posterior del triatoma (Fig. 6).



**Figura 6: Ciclo de vida de *T. cruzi*.** A lo largo de su ciclo de vida, éste parásito presenta cuatro estadios de desarrollo principales, con aspectos morfológicos diferentes: **tripomastigotes** (forma flagelada que circula por la sangre de los mamíferos –**tripomastigotes sanguíneos**–, o se halla en el intestino posterior de los triatomínicos –**tripomastigotes metacíclicos**–), **amastigotes** (es la forma aflagelada, se halla en los tejidos de los mamíferos y allí se reproduce) y **epimastigotes** (es el modo de multiplicación en el intestino del vector y es eliminado con las deyecciones del triatomino, junto con el tripomastigote, pero es destruido en la sangre).

El ciclo evolutivo del *T. cruzi* (Fig. 6), en el hospedero vertebrado, comienza cuando las formas tripomastigotes metacíclicos son eliminadas en las heces del insecto vector e inoculadas en la piel o mucosas del vertebrado. Las formas tripomastigotes, penetran en fagocitos mononucleares y en cualquier tipo de célula nucleada que se encuentre en contacto con la circulación sistémica. Luego, se transforman a amastigotes (que se encuentran libres en el citoplasma de la célula hospedera) y comienzan su reproducción por fisión binaria. Después de 5 días aproximadamente, y tras la replicación activa de los amastigotes, se produce la ruptura de la célula hospedera, con la liberación subsiguiente de cientos de tripomastigotes al espacio intercelular. Los tripomastigotes son capaces de invadir nuevas células en el mismo sitio donde fueron liberados o salir al torrente sanguíneo y distribuirse por todo el organismo (Coto y col., 1982). *T. cruzi* invade y se multiplica en distintos tipos celulares, incluyendo macrófagos, células de

músculo liso y estriado, fibroblastos y neuronas (Andrade, 1999). La primera reacción al *T. cruzi* es una inflamación mononuclear focal debido a la ruptura de las células parasitadas. Los parásitos liberados entran luego al torrente sanguíneo e infectan nuevas células, produciendo lesiones inflamatorias en distintos órganos. Luego de la infección aguda, en la cual se desarrolla una fuerte inmunidad adaptativa (serología positiva), los parásitos comienzan a ser controlados y desaparecen paulatinamente de la sangre. Si la infección persiste en el tiempo, en ausencia de tratamiento específico, da lugar a la aparición de la fase crónica sin patología demostrada que posteriormente puede transformarse en fase crónica con patología demostrada.



**Figura 7: Vías de transmisión de Chagas.** La infección en el ser humano ocurre por: penetración del *T. cruzi* en el torrente sanguíneo, vehiculizado por las heces del vector (**vía vectorial**), transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo (**transmisión vertical**), transfusión de sangre infectada y no controlada (**vía transfusional**), trasplante de órganos, ingesta de parásitos (**vía oral**), accidente de laboratorio (**infección accidental**), o durante la práctica de compartir jeringas entre usuarios de drogas inyectables. Tomado de: Guías para la atención al paciente infectado con *T. cruzi*.

Existen además otras vías de transmisión parasitaria (no vectoriales): a) transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo (transmisión vertical), b) transfusión de sangre infectada y no controlada, c) trasplante de órganos, d) ingesta de parásitos, principalmente por consumo de alimentos contaminados con heces del vector (aún no se han observado estos casos en

nuestro país), e) accidente de laboratorio, y f) durante la práctica de compartir jeringas entre usuarios de drogas inyectables (Fig. 7) (Dias, 2000).

#### **2.4.2. Fases de infección por *T. cruzi*.**

La infección por *T. cruzi* evoluciona en dos fases: aguda y crónica. Cada una de ellas presenta características clínicas y criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes (Ministerio de Salud de la Nación, 2012).

##### **2.4.2.1. Fase aguda.**

La fase aguda se caracteriza por la presencia de parásitos en sangre en concentración elevada, y se inicia en el momento de adquirir la infección por cualquiera de sus vías. También puede presentarse como la reactivación de una infección crónica en un paciente inmunodeficiente, teniendo algunas similitudes con la fase aguda de la primoinfección. La duración y la presentación clínica de la fase aguda pueden ser variables, dependiendo de la edad del paciente, del estado inmunológico, la presencia de co-morbilidades y la vía de transmisión. En cuanto a la presentación clínica, la misma puede ser sintomática, oligosintomática o asintomática, siendo esta última la forma clínica más frecuente.

En la enfermedad aguda por transmisión vectorial, si bien puede presentarse a cualquier edad, el mayor riesgo se encuentra en los niños menores de diez años. La fase aguda de la infección adquirida por ésta vía cursa en la mayoría de los casos en forma asintomática.

La enfermedad de Chagas congénita es la forma aguda de infección más frecuente en Argentina.

##### **2.4.2.2. Fase crónica.**

Corresponde a la etapa que sigue a la fase aguda y comienza cuando la parasitemia se vuelve indetectable por los métodos parasitológicos directos. En esta fase, la infección es detectable principalmente por métodos serológicos (que demuestran la respuesta inmunológica del huésped frente al parásito) y también por métodos de biología molecular.

Debido a que la mayoría de las infecciones agudas por *T. cruzi* ocurren en forma asintomática, una gran proporción de las personas infectadas son diagnosticadas en la fase crónica. Aproximadamente el 30 % de estas personas desarrollarán lesión de órganos (principalmente a nivel cardíaco y/o digestivo), en un plazo de 10 a 20 años, con signos y síntomas de expresión variada. De acuerdo a ello, esta fase se clasifica en dos formas clínicas: con patología demostrada y sin patología demostrada (anteriormente llamada *forma indeterminada*).

### **2.4.3. Terapéutica de la enfermedad de Chagas.**

Desde su introducción hace aproximadamente 45 años, el nitrofurano Nifurtimox (Bayer 2502, Lampit, Bayer) y el 2-nitroimidazol Benznidazol (BZL, Ro 07-1051, Radanil, Rochagan) son las únicas drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Estas drogas, que fueron desarrolladas contra *T. cruzi*, afectan tanto el estado de tripomastigote en la sangre como las formas de amastigote en los tejidos del huésped (Raether y Hänel, 2003). Sin embargo, desde fines de los años ochentas, la comercialización de nifurtimox ha sido discontinuada en Brasil, Argentina, Chile y Uruguay, por lo que la terapia con BZL es la única disponible en nuestra región.

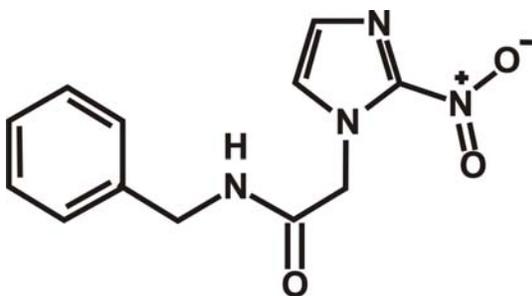
La administración de BZL se encuentra indicada en todos los casos de enfermedad aguda, congénita, donante vivo reactivo en trasplante de órganos, pacientes con reactivación de la enfermedad, accidentes de laboratorio y niños con la forma crónica temprana de la enfermedad (Rassi y col., 2010). En el caso de pacientes trasplantados e inmunosuprimidos que cursan reactivación o infección primaria transmitida por el órgano recibido y evidencia clínico-histológica de rechazo, se recomienda continuar con el tratamiento parasiticida y no suspender el tratamiento inmunosupresor. En el caso de pacientes con infección por VIH con reactivación debe iniciarse el tratamiento antiviral, adicionalmente a la implementación del tratamiento tripanocida (Ministerio de Salud de la Nación, 2012). La dosificación empleada en pediatría (hasta 12 años de edad) llega a 10 mg/kg de peso por día, administrada por vía oral en dos tomas diarias, durante 60

días. En el caso de adultos, la dosis empleada es de 5 a 7 mg/kg de peso por día durante 60 días, también por vía oral en dos tomas diarias. Se sugiere que la dosis máxima no supere los 400 mg/día, con una duración de tratamiento recomendada de 60 días. La cura parasitológica (demostrable por negativización de la parasitemia y de la serología) es superior al 80 % en fase aguda vectorial y más del 90 % en los casos congénitos tratados durante el primer año de vida. En el caso de reactivaciones en pacientes con infección por VIH, que conlleva una alta mortalidad, el tratamiento tripanocida administrado en forma temprana mejora el pronóstico. En pacientes trasplantados con reactivación, la terapia tripanocida anticipada y el tratamiento precoz de la reactivación con síntomas reduce la morbilidad y mortalidad asociadas. Ante el caso de intolerancia al medicamento que impida completar los dos meses, se puede considerar aceptable si cumplió al menos 30 días (Ministerio de Salud de la Nación, 2012).

Sin embargo, las opciones para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son limitadas, debido a la toxicidad de las drogas disponibles y en muchos casos por la resistencia natural o adquirida de distintas cepas de parásitos. La quimioterapia contra el *T. cruzi* en la etapa aguda conduce a la regresión de los síntomas clínicos y a la cura parasitológica, pero su efectividad durante la fase crónica sin patología demostrada o crónicas con patología demostrada es todavía objeto de controversia (Coura y De Castro, 2002; Viotti y col., 2006).

#### **2.4.3.1. Benznidazol.**

BZL (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida (INN)-C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>), (Fig. 8), antiguamente comercializado por Hoffman-La Roche como Rochagan y Radanil, es un agente antiparasitario empleado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Las propiedades fisicoquímicas de este compuesto de síntesis son: polvo fino y cristalino, de color blanco amarillento, inodoro, insoluble en agua y parcialmente soluble en etanol absoluto.



**Figura 8: Estructura química de BZL** (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida(INN)-C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>), es el único agente antiparasitario empleado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas disponible en nuestro país.

Con un peso molecular de 260,25 es un derivado nitroimidazólico tripanocida que se absorbe rápidamente por el tracto digestivo, se metaboliza parcialmente en el organismo (hígado), y tanto la droga intacta como sus metabolitos son excretados por orina y heces. En el hombre, el 59,7 a 67,4 % de la droga es excretada en orina y el 22,1 a 28,1 % en heces, al tercer día de administración. Transcurrido entre 5 y 7 días se elimina entre 88 y 92,6 % de la dosis administrada. Tanto en humanos como en rata la fracción recobrada en orina contiene la droga no modificada (19 %), prevaleciendo los metabolitos libres sobre los conjugados. El coeficiente de distribución de BZL indica que la droga se introduce rápidamente en la célula y en el caso de los hematíes esta propiedad ha sido corroborada en forma experimental, observándose una distribución rápida e igualitaria entre plasma y hematíes de sangre humana estudiada *in vitro* (Raaflaub y Ziegler, 1979; Roche, 1983).

La farmacocinética del BZL se estudió en humanos luego de la administración de una única dosis y de múltiples dosis. En el estudio de una única dosis (100 mg, vía oral), la concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) en plasma se alcanzó luego de 3 a 4 h de la toma y resultó en promedio 2,54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La cinética se ajusta a un modelo de un compartimiento y el tiempo de vida media de la droga ( $t_{1/2}$ ) resultó en promedio 12 h. Benznidazol ha mostrado tener una buena biodisponibilidad oral, con un porcentaje de unión a proteínas es en promedio 44,1% y un volumen de distribución relativo promedio de 0,56 L/kg (Raaflaub y Ziegler, 1979; Raaflaub, 1980).

Se cree que el BZL y sus posibles metabolitos alteran el metabolismo del *T. cruzi*, y que distintos radicales libres producidos conducen a daño celular. BZL es capaz de producir daño al ADN y la inhibición de la síntesis tanto de ARN como

de proteínas, en células de mamíferos y en el parásito (Toranzo y col., 1998; Mehlhorn, 2001; Paulino y col., 2005).

Estudios metabólicos del BZL, llevados a cabo en ratas, perros, monos y humanos, identificaron en orina dos metabolitos: 1-amino-imidazol (reducción metabólica del grupo nitro) y 2-hidroxi-imidazol (sustitución hidrolítica del grupo nitro), (Schwartz y Hofheinz, 1982). El grupo nitro del BZL es reducido por isoformas del citocromo P450 (nitroreductasas) a un grupo amino, con la formación de varios radicales libres intermediarios y metabolitos electrofílicos. En tripanosomátidos, la participación de una nitroreductasa I ha sido confirmada como responsable del primer paso en el metabolismo de esta pro-droga, dando lugar mediante dos reacciones sucesivas a la formación de hidroxilamina que se reordena para formar dihidro-dihidroxiimidazol que luego libera glioxal. El glioxal es un dialdehído de alta reactividad que forma aductos con proteínas, ADN y otras moléculas pudiendo dar lugar a los efectos tóxicos del BZL (Hall y Wilkinson, 2012). Se desconoce si el derivado amino de BZL o los metabolitos electrofílicos sufren posteriores conjugaciones, y cuáles serían las vías de excreción de dichos compuestos.

#### **2.4.3.2. Efectividad del tratamiento con BZL.**

Uno de los mayores obstáculos en el éxito del tratamiento de enfermedades neoplásicas e infecciones por microorganismos o parásitos es el desarrollo de resistencia a multidroga. La resistencia a drogas tiene un alto impacto en la quimioterapia contra la enfermedad de Chagas aguda ya que produce fallas en el tratamiento y limita las opciones al mismo. Esta ocurre por la existencia de cepas naturalmente resistentes a los fármacos utilizados (cepa Colombiana, por ej.) o la inducción de resistencia durante el tratamiento. Entre los mecanismos propuestos caben destacar la sobre-expresión y mayor actividad, en el parásito, de sistemas enzimáticos de biotransformación de dichas drogas así como de bombas exportadoras capaces de excretarlas y/o a sus metabolitos. Oliveira-Campos y col. (2013) observaron que la resistencia de epimastigotes de *T. cruzi* a BZL, podría ser asociada a la actividad de eflujo de P-gp, actividad ATPasa de P-gp y la

sobreexpresión de los genes de las proteínas homologas a P-gp en *T. cruzi* (TcPGP1 y TcPGP2). Dado que la unión e hidrólisis de ATP y la estimulación de la actividad de P-gp fueron observadas, se propone además que BZL podría ser sustrato de P-gp. Por otra parte, el gen TcPGP2 fue identificado no sólo en la forma epimasigote de *T. cruzi* sino también en amastigotes intracelulares (Dallagiovanna y col., 1996); mientras que la expresión de TcPGP1 fue reportada sólo en epimastigotes de *T. cruzi* (Torres y col., 1999). Por otro lado, el aumento en la expresión y actividad de P-gp en la célula del hospedero generadas por el tratamiento con BZL podría no sólo llevar a interacciones droga-droga con fármacos que pudieran ser co-administrados con BZL, y/o disminuir el tiempo de permanencia en el interior celular, reduciendo la efectividad del propio BZL sobre *T. cruzi*, sino también favorecer la resistencia del parásito a la acción del fármaco.

Además, en los casos en que la cepa del parásito es sensible al BZL, la terapia frecuentemente debe suspenderse debido a la aparición de reacciones adversas.

Durante el tratamiento con drogas antichagásicas, los efectos adversos más comúnmente observados son:

- Erupción cutánea.
- Trastornos digestivos: náuseas, vómitos, diarrea, epigastralgia, distensión abdominal.
- Síntomas generales: fiebre, artralgias, mialgias, fatiga, adenopatías.
- Fenómenos neurotóxicos periféricos y/o del sistema nervioso central: cefalea, anorexia, irritabilidad, llanto persistente en lactantes, insomnio, temblores, mareos, trastornos del estado de ánimo, pérdida del equilibrio y la memoria, convulsiones, síntomas de neuropatía periférica como hipo o hiperestésias, parestesias o dolor neuropático.
- Elevación de transaminasas mayor a 3 veces los valores máximos normales con o sin síntomas de hepatitis. Análisis bioquímicos de pacientes tratados con BZL durante 60 días mostraron que BZL es capaz de producir alteraciones moderadas de la función biliar, y en algunos casos, de triplicar

los valores normales de transaminasas séricas en los primeros 15 días de tratamiento (Pinazo y col., 2012).

- Eosinofilia.

Entre los efectos adversos graves (de baja frecuencia de aparición) pueden mencionarse:

- Leucopenia por debajo de  $2500 / \text{mm}^3$  (a expensas de neutropenia)
- Plaquetopenia
- Síndrome de Stevens-Johnson (OMS, 2013, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>).

Así, resulta de interés encontrar nuevas estrategias terapéuticas que permitan reducir los efectos adversos del BZL brindando igual efectividad contra el parásito.

#### **2.4.3.3. Efectos del BZL sobre sistemas enzimáticos de biotransformación y transportadores ABC.**

La interrelación entre sistemas de biotransformación y transportadores y su relevancia en la disposición de drogas es ampliamente reconocida (Benet, 2009). Cambios de expresión y/o actividad en estas proteínas por endo- o xenobióticos pueden tener un impacto clínico sobre las funciones normales de tejidos con relevancia farmaco-toxicológica. Bajo estas circunstancias, la eficacia o toxicidad de un amplio rango de xenobióticos, incluyendo agentes terapéuticos, puede ser modificada (Xu y col., 2005; Klaassen y Aleksunes, 2010).

Algunas drogas antiparasitarias mostraron modular genes involucrados en biotransformación y transporte con un importante impacto en la disposición de distintos compuestos. Por ejemplo, Bapiro y col. (2002) demostraron que la quinina y el albendazol indujeron isoformas de CYP en células HepG2 a concentraciones equivalentes a aquellas alcanzadas en protocolos terapéuticos, advirtiendo acerca del riesgo de combinar quinina o albendazol con otras drogas que sean metabolizadas por estos sistemas. Por otro lado, se comunicó que durante el tratamiento antimalaria con artemisina, la reactivación de la enfermedad se asoció a la disminución de los niveles plasmáticos de la droga. Los autores de

este trabajo postularon que la artemisina induce su propia eliminación, probablemente por inducción del metabolismo de primer paso (Ashton y col., 1998). En sostén de este postulado Burk y col. (2005) demostraron que artemisina fue capaz de inducir algunas isoformas de CYP y los niveles de ARNm de MDR1 en células LS174T y en hepatocitos humanos.

Al presente, es escasa la información acerca de los potenciales efectos del tratamiento con BZL sobre la expresión y/o actividad de sistemas de biotransformación y proteínas transportadoras de drogas y, por ende, acerca de si el BZL podría modificar la farmacocinética de otras drogas o incluso de sí mismo. Al respecto, existen estudios que atribuirían al BZL un rol inhibitorio sobre algunos miembros de la familia del citocromo P450. A principios de la década del ochenta, se describió un efecto potenciador de BZL en la respuesta antitumoral por lomustina (Siemann y col., 1983). Una interacción similar se observó también en un estudio clínico (Roberts y Bleehen, 1985). El mecanismo implicaría la inhibición de la hidroxilación de la lomustina por BZL (Lee y col., 1987). En concordancia con esto, BZL aumenta el tiempo de sueño de ratas anestesiadas con pentobarbital. El efecto se correlaciona con la inhibición de las actividades aminopirina- y etilmorfina N-demetilasa, probablemente por unión covalente de metabolitos del BZL, sin cambios en los contenidos de proteína (Masana y col., 1985). La coadministración de compuestos conteniendo grupos tioles (cisteína, N-acetilcisteína, penicilamina, glutatión) produce una reversión del efecto (Montalto de Mecca y col., 2000).

Por otra parte, en trabajos publicados por nuestro grupo de investigación, observamos que BZL induce la expresión y actividad de CYP3A4, GST $\pi$ , P-gp y MRP2 de manera dependiente de la concentración en células HepG2, usadas como modelo de hepatocitos (Rigalli y col., 2012).

Un estudio llevado a cabo en pacientes que recibieron BZL por 30 días (7 mg/kg de peso corporal/día, en dos tomas diarias) mostró que la concentración plasmática máxima de BZL determinada después de la primera dosis de la mañana mostraba una tendencia a disminuir con el tiempo de tratamiento (- 20 % en promedio después de 25 días de tratamiento) (Raaflaub, 1980). Este hallazgo

sugiere un incremento en el metabolismo de BZL y/o en su velocidad de eliminación.

BZL puede ser co-administrado con otras drogas. Algunas drogas que han sido utilizadas durante el tratamiento de pacientes con BZL fueron: omeprazol, levotirosina, enalapril, benzodiazepinas y acetoaminofeno, domperidona (antipsicótico), entecavir (utilizado en el tratamiento de la hepatitis B), gabapentina (antiepiléptico) y ketoconazol (antifúngico), (Pinazo y col., 2012). Así, puede pensarse en la posibilidad de presentación de interacciones droga-droga, en este caso BZL-droga. El estudio de Pinazo y col., (2012) mostró que los niveles séricos de BZL en pacientes se encontraron dentro del rango terapéutico, sin diferencias entre pacientes que no recibieron otro tratamiento y aquellos que recibieron algún otro fármaco simultáneamente. Sin embargo, los autores realizaron sus estudios utilizando un bajo número de pacientes en cada grupo experimental, lo cual podría no ser indicativo del comportamiento poblacional sobre la interacción entre fármacos. Las interacciones BZL-droga podrían ser particularmente importantes en pacientes bajo tratamiento de inmunosupresión con ciclosporina A, corticoesteroides y azatropinas para trasplantes de corazón o riñón (Bacal y col., 2010; Silva y col., 2010), o en pacientes VIH positivos infectados con *T. cruzi* que reciben retrovirales (Díaz-Granados y col., 2009; Almeida y col., 2011).

Hasta el presente no existe información concerniente los efectos de BZL sobre la expresión y actividad de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas en un modelo *in vivo* y sus potenciales consecuencias en la farmacocinética de BZL o de drogas co-administradas.

### ***III. Objetivos***

### **3. OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar los efectos del tratamiento con BZL sobre enzimas de metabolización y proteínas transportadoras, en tejidos que intervienen en la absorción, metabolización y excreción de drogas, que pudieran afectar su propia farmacocinética y de otras drogas co-administradas.

#### **3.1. Objetivos específicos.**

- 1) Evaluar los efectos de BZL sobre la expresión y actividad de sistemas de biotransformación de Fase I (CYP3A) y Fase II (UGT1A, GST $\alpha$ , GST $\mu$ , GST $\pi$ ), y transportadores de drogas (P-gp y Mrp2), en órganos con relevancia toxicofarmacológica (hígado, intestino y riñón).
- 2) Evaluar parámetros farmacocinéticos y biodisponibilidad de una dosis testigo de BZL (5 mg/kg) en animales pre-tratados con BZL y controles, y establecer la relevancia del pre-tratamiento con BZL sobre su propia farmacocinética.

## ***IV. Materiales y Métodos***

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 4.1. Reactivos químicos.

Benznidazol (*N*-benzyl-2-nitroimidazol acetamida), albúmina sérica bovina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB), dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG), glutation reducido (GSH), rodamina 123 (Rho-123), fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF), pepstatina A, leupeptina y sacarosa se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Dimetilsulfóxido (DMSO) fue obtenido de Merck (Darmstadt, HE, Alemania). Todos los demás reactivos fueron del máximo grado analítico disponible comercialmente.

El material descartable empleado para cultivo celular fue adquirido a Boeco (Hamburg, HA, Alemania).

### 4.2. Animales.

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (320-380 g), provenientes de nuestro bioterio (Instituto de Fisiología Experimental, CONICET). Los animales se alimentaron *ad-libitum* con una dieta comercial estándar y agua, se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24 °C) y humedad (45-50 %), y bajo ciclos luz-oscuridad de 12 horas de duración cada uno. Todo tratamiento o manipulación efectuado sobre los animales de laboratorio se realizó de acuerdo a las normas internacionales para el cuidado de animales de laboratorio (*“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”*, 2002).

#### 4.2.1 Estudios preliminares.

Para elegir la dosis apropiada de BZL, se realizó un estudio dosis-respuesta. Los animales fueron divididos al azar en cuatro grupos experimentales e tratados i.p. con BZL (dosis: 25, 50 ó 100 mg/kg peso corporal/día, 3 días, en vehículo, DMSO:propilenglicol, 2:13) o con vehículo (animales controles) siguiendo el mismo esquema de administración. Posteriormente, se recolectaron muestras de tejido de hígado, intestino (yeyuno e íleon) y riñón, que se procesaron para el estudio de la expresión de P-gp, Mrp2 y BCRP por la técnica de *western blot* como se detalla en los apartados 4.2.4.1, 4.2.4.4 y 4.2.4.5.

#### **4.2.2. Tratamiento con BZL.**

Los animales fueron divididos al azar en dos grupos experimentales e tratados i.p. con BZL (dosis: 100 mg/kg peso corporal/día, 3 días, en vehículo: DMSO:propilenglicol, 2:13) o con vehículo (animales controles) siguiendo el mismo esquema de administración. Todos los experimentos fueron realizados al cuarto día de iniciado el tratamiento.

#### **4.2.3. Recolección y análisis de muestras.**

##### **4.2.3.1. Recolección de bilis para determinación del flujo biliar.**

Para la determinación del flujo biliar basal se utilizó el protocolo descrito por Ruiz y col. (2006). El día del experimento, los animales fueron pesados y anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal), se les realizó una incisión abdominal y se canuló el conducto colédoco con un catéter de polietileno PE-10 (Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ, EE.UU.), recolectándose bilis (al abrigo de la luz) en intervalos de 10 min para la determinación del flujo biliar. El flujo biliar fue estimado gravimétricamente, asumiendo una densidad de la bilis de 1 g/ml. La temperatura corporal se mantuvo en todo momento entre 37 °C y 38 °C, con una lámpara infrarroja de calentamiento.

La bilis recogida fue debidamente colectada a 4 °C al abrigo de la luz para la posterior determinación de bilirubina; o durante 10 min en tubos pre-cargados con 100 µl de ácido sulfosalicílico (SSA) al 10 % p/v, centrifugadas a 10.000 g durante 5 min para su desproteinización y se recolectó el sobrenadante para la posterior determinación de GSH/GSSG (este procedimiento garantiza la preservación de los metabolitos a determinar).

##### **4.2.3.2. Recolección de tejidos.**

Finalizada la recolección de bilis se sacrificaron los animales por punción cardíaca y la sangre fue utilizada para la determinación de enzimas plasmáticas. El hígado entero fue extraído, lavado con solución fisiológica fría y pesado para la determinación de la relación peso del órgano/peso corporal. Posteriormente, se procedió a la recolección de muestras de tejido intestinal (específicamente el íleon

que es donde mayoritariamente se expresa P-gp, y el yeyuno que tiene una alta expresión de Mrp2) y renal, para su posterior procesamiento. Luego, una alícuota de hígado fue procesada inmediatamente para la detección de GSH y GSSG, y otra alícuota congelada en nitrógeno líquido y mantenida a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la obtención de citosol, microsomas y membranas plasmáticas.

Para la recolección del yeyuno proximal, los primeros 10 cm desde la válvula pilórica (correspondientes al duodeno) fueron descartados, y los siguientes 30 cm fueron considerados yeyuno proximal. Los últimos 30 cm de intestino delgado, próximos a la válvula íleo-cecal, fueron considerados íleon distal. Los segmentos fueron cuidadosamente lavados con solución salina helada. Las muestras de tejidos se alicuotaron y se preservaron adecuadamente para ser utilizadas en la preparación de citosol, microsomas y membranas plasmáticas.

Las muestras de tejido renal fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenida a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la obtención de citosol, microsomas y membranas plasmáticas.

#### **4.2.3.3. Cuantificación de GSH y GSSG en hígado y bilis.**

Para la determinación del contenido de glutatión total (GSH+GSSG) en bilis y en los distintos tejidos se utilizó el método de Tietze (1969), con las modificaciones introducidas por Griffith (1980). Así, el glutatión es sometido a un procedimiento enzimático cíclico por el cual es secuencialmente oxidado por el DTNB (ácido 5, 5'-ditiobis-2-benzoico) y reducido por el NADPH en presencia de la enzima glutatión reductasa. La velocidad de formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico a partir de DTNB es monitoreado a 412 nm, siendo la aparición del mismo una medida proporcional a la cantidad de glutatión total presente en la muestra.

Para ello, alícuotas de tejido hepático fueron homogeneizadas en solución salina (relación tejido:solución salina, 1:3 p/v). Posteriormente, a 600  $\mu\text{l}$  del homogenado se le agregaron 300  $\mu\text{l}$  de SSA al 10 % p/v, a fin de desproteinizar las muestras. Luego de agitación vigorosa, se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 5 min.

Para la determinación de glutathion total, se realizó una dilución 1:100 del sobrenadante de las muestras de bilis colectadas previamente, en una solución de fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,125 M, Na-EDTA 6,3 mM, pH=7,50). Se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de esa dilución de la bilis, o 2  $\mu\text{l}$  del sobrenadante del homogenado, al medio de reacción conteniendo una solución de fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,125 M, Na-EDTA 6,3 mM, pH=7,50), DTNB 6 mM y NADPH 0,3 mM. Luego de termostatar la muestra a 30 °C, se colocó en una cubeta y se inició la reacción con el agregado de la enzima glutathion reductasa (10 U/ml de medio de reacción). Se monitoreó el aumento de la absorbancia espectrofotométricamente a 412 nm durante 90 s.

Para medir selectivamente la especie GSSG, se utilizó la técnica basada en el enmascaramiento químico (derivatización) del GSH por la 2-vinilpiridina, lo que permite que sólo el GSSG entre en el ciclo redox mencionado anteriormente y pueda ser medido. A 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante, obtenido como se describió anteriormente, se le agregaron 3  $\mu\text{l}$  de 2-vinilpiridina. Luego se agregaron 15  $\mu\text{l}$  de trietanolamina por cada 100  $\mu\text{l}$  de SSA al 10 % p/v agregados previamente al sobrenadante o de bilis, para su neutralización. Estas muestras fueron incubadas durante 1 h a 30 °C homogeneizando con vortex durante 1 min al inicio de la incubación y luego durante 15 s cada 10 min. Posteriormente se continuó con el mismo protocolo descrito para el dosaje de glutathion total.

Los datos de las pendientes obtenidas fueron procesados de manera de expresar el contenido de glutathion individualmente para las especies GSH y GSSG como nmoles/g de tejido. Posteriormente se calculó la relación correspondiente entre GSSG y glutathion total.

#### **4.2.3.4. Determinación del contenido biliar de bilirrubina total.**

La bilirrubina, producto de degradación de la hemoglobina, es captada por el hígado para su conjugación y posterior excreción en la bilis. La bilirrubina reacciona directamente con el ácido sulfanílico diazotado produciendo un pigmento de color rojo-violáceo (azobilirrubina) que se mide espectrofotométricamente a 530 nm. Si bien la bilirrubina conjugada (directa) reacciona

directamente con el diazorreactivo, la bilirrubina no conjugada (indirecta) requiere la presencia de un desarrollador acuoso (solución acuosa de cafeína 0,13 M, tamponada y estabilizada) que posibilite su reacción. De forma tal que, para que reaccione la bilirrubina total (conjugada y no conjugada) presente en la muestra, debe agregarse benzoato de cafeína al medio de reacción. Así, la concentración biliar de bilirrubina total de las muestras de bilis (recolectadas a 4 °C y protegidas de la luz), se determinó utilizando un *kit* enzimático comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante (Wiener Lab, Rosario), a 37 °C y con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda2S.

#### **4.2.3.5. Actividad de enzimas hepáticas en suero.**

Las muestras de sangre recolectadas fueron centrifugadas durante 5 min a 3000 rpm y la fracción sérica fue separada para la determinación de enzimas hepáticas. La recolección y procesamiento de las muestras, y las determinaciones serológicas se realizaron en el mismo día.

##### **4.2.3.5.1. Lactato Deshidrogenasa.**

La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se determinó espectrofotométricamente midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup> en la reacción acoplada de reducción de piruvato a lactato catalizada por LDH. Para determinar la actividad de esta enzima se utilizó un *kit* enzimático comercial (Wiener Lab, Rosario), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para esta reacción, 20 µl de suero se mezclaron con 1,2 ml de sustrato reconstituido (a 37 °C). La determinación se realizó utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda2S.

##### **4.2.3.5.2. Fosfatasa alcalina.**

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FA) fue determinada utilizando un *kit* enzimático comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante (Wiener Lab, Rosario). En esta reacción la enzima fosfatasa alcalina desdobra el p-nitrofenilfosfato (inoloro) en medio alcalino (pH = 9,80) produciendo fosfato y p-

nitrofenol. La velocidad de aparición del anión p-nitrofenolato (amarillo) medido a 405 nm es proporcional a la actividad enzimática de la muestra. Para esta reacción, 10 µl de suero, se mezclaron con 1,25 ml de sustrato reconstituido (a 37 °C). La determinación se realizó utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda2S.

#### **4.2.3.5.3. Aspartato amino transferasa.**

La enzima aspartato amino transferasa (AST/GOT) cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino desde L-aspartato al 2-oxoglutarato para producir oxalacetato y L-glutamato. En un paso subsiguiente, el oxalacetato producido es convertido, en presencia de NADH, en L-malato por la enzima malato deshidrogenasa. Así, la velocidad de desaparición de NADH a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de la enzima aspartato amino transferasa de la muestra. Para determinar la actividad de esta enzima se utilizó un *kit* enzimático comercial (Wiener Lab, Rosario), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las unidades de actividad enzimática fueron definidas como mmol de sustrato consumido por hora a 37 °C. Para esta reacción, 100 µl de suero se mezclaron con 1 ml de sustrato reconstituido (a 37 °C). La determinación se realizó utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda2S.

#### **4.2.3.5.4. Alanina amino transferasa.**

La enzima alanina amino transferasa (ALT/GPT) cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino desde L-alanina al 2-oxoglutarato para producir piruvato y L-glutamato. En un paso subsiguiente, el oxalacetato producido es convertido, en presencia de NADH, en L-lactato por la enzima lactato deshidrogenasa. Así, la velocidad de desaparición de NADH a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de la enzima alanina amino transferasa de la muestra. Para determinar la actividad de esta enzima se utilizó un *kit* enzimático comercial (Wiener Lab), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las unidades de actividad enzimática fueron definidas como mmol de sustrato consumido por hora a 37 °C. Para esta reacción, 100 µl de suero se mezclaron

con 1 ml de sustrato reconstituido (a 37 °C). La determinación se realizó utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda2S.

#### **4.2.4. Procesamiento de muestras para los ensayos de *western blot*.**

##### **4.2.4.1. Preparación de membranas plasmáticas.**

A partir de alícuotas de tejido hepático se prepararon membranas plasmáticas mixtas (MPM), es decir incluyendo dominios apical y basolateral simultáneamente, por centrifugación diferencial. A partir de mucosa intestinal y de tejido renal se aislaron membranas apicales (BBM, del inglés: “*Brush Border Membrane*”). Los tejidos se homogeneizaron en el *buffer* correspondiente para cada caso conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mmol/l, leupeptina 25 µg/ml y pepstatina-A 5 µg/ml) (Ruiz y col., 2005; Villanueva y col., 2005) en una relación inhibidor:*buffer* 1:1000. Una relación similar fue utilizada en el resto de las soluciones conteniendo inhibidores de proteasas.

Alícuotas de tejido hepático se homogeneizaron con un émbolo de teflón estándar, utilizando como recipiente una camisa de vidrio (20 golpes a 3.000 rpm) en solución de sacarosa 0,3 M (50 mg de hígado por ml de solución) conteniendo inhibidores de proteasas. Luego, para la obtención de MPMs, se procedió según el protocolo previamente descrito (Meier y col., 1984). Brevemente, a 2 ml de los homogenados obtenidos se los mezcló con 2,8 ml de una solución de sacarosa 2 M conteniendo inhibidores de proteasas y luego de colocar la mezcla en un tubo limpio se agregaron en la parte superior 2 ml de una solución de sacarosa 0,3 M conteniendo también inhibidores de proteasas, de manera de obtener dos capas bien separadas. El gradiente así formado se centrifugó a 155.000 g durante 60 min a 4 °C (sin freno y con baja aceleración). Posteriormente, se aspiró el anillo difuso formado en la interfase, se colocó en un nuevo tubo y luego del agregado de 4 ml de agua destilada conteniendo inhibidores de proteasas, se centrifugó nuevamente a 155.000 g durante 60 min a 4 °C (con freno y con aceleración normal). Por último, se resuspendió el sedimento (enriquecido en membranas plasmáticas totales de hepatocito) en 200 µl de solución de sacarosa 0,3 M.

Después de la recolección del yeyuno proximal e íleon distal, ambos fragmentos fueron lavados cuidadosamente con solución salina fría, abiertos inmediatamente a lo largo de su extensión, se secó cuidadosamente mucosa intestinal con papel de filtro y se extrajo la capa de epitelio por raspado con un portaobjetos, para la preparación de BBM según fuera descrito por Mottino y col. (2001). Una vez obtenida la mucosa intestinal, se homogenizaron 50 mg de la misma en 10 ml del *buffer* A (pH=7,10; Manitol 50 mM; Tris/HCl 2 mM; Leupeptina 25 µg/ml; PMSF 40 µg/ml; Pepstatina A 0,5 µg/ml). La homogenización se realizó con un émbolo de teflón estándar y camisa de vidrio (20 golpes a 3.000 rpm). La obtención de las membranas plasmáticas ricas en BBM se realizó utilizando el método de precipitación por catión divalente (Kessler y col., 1978), con algunas modificaciones (Mottino y col., 2000). Para ello, una vez obtenidos los homogenados, se les adicionaron 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 1 M y se incubaron durante 15 min en hielo, mezclando por inversión cada 5 min. Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 3.000 g durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes se volvieron a centrifugar a 27.000 g durante 40 min a 4 °C. El *pellet* enriquecido en BBM se resuspendió en 200-300 µl de *buffer* B (pH=7,50; Manitol 300 mM; Hepes 10 mM; Tris 10 mM; Leupeptina 25 µg/ml; PMSF 40 µg/ml; Pepstatina A 0,5 µg/ml) y posteriormente se cuantificaron las proteínas. Estas muestras se utilizaron para la detección de P-gp y Mrp2 por ensayos de inmunocuantificación (*western blot*).

Finalmente, se aisló la corteza renal y las membranas de ribete en cepillo se obtuvieron siguiendo el protocolo previamente descrito por Ohoka y col. (1993), con algunas modificaciones (Torres y col., 2003). En forma resumida, se homogeneizaron las cortezas renales en *buffer*, conteniendo Manitol 50 mM, EGTA 5 mM y Tris-HCl 2 mM, pH=7,10. Luego se agregó MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 12 mM e inhibidores de proteasas y los homogenados se incubaron en frío (4 °C) durante 15 min y con agitación constante. La preparación fue centrifugada a 3.000 g durante 15 min y el sobrenadante nuevamente centrifugado a 28.000 g durante 40 min. Por último, se resuspendió el sedimento

(enriquecido en membrana tubular apical) en 200  $\mu$ l de solución de resuspensión (Manitol 300 mM, HEPES-Tris 10 mM, pH=7,40, inhibidores).

En las preparaciones de los tres tejidos se midió la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

#### **4.2.4.2. Obtención de citosol y microsomas por centrifugación diferencial.**

Las muestras de tejido hepático, intestinal y renal (corteza) obtenidas como se describiera anteriormente, se homogenizaron en 3 ml de una solución de sacarosa 0,25 M-EDTA 1 mM, pH=7,40. Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 20.000 g durante 30 min a 4 °C y los sobrenadantes fueron nuevamente centrifugados a 105.000 g durante 1 h a 4 °C, separándose el sobrenadante (fracción citosólica) y el sedimento, que fue por su parte resuspendido en la misma solución tamponada de homogeneización (fracción microsomal) (Siekevitz, 1962). Las fracciones citosólicas y las suspensiones microsomales fueron mantenidas a -70 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó en todas las preparaciones por la técnica de Lowry y col. (1951), usando como estándar albúmina sérica bovina. Las fracciones obtenidas se utilizaron para la detección de la actividad GST y en los ensayos de inmunocuantificación (*western blotting*) de CYP3A, GSTs (GST $\alpha$ , GST $\mu$ , GST $\pi$ ) y UGT (UGT1A).

#### **4.2.4.3. Obtención de hepatocitos aislados.**

Otro grupo de animales fue tratado como se detalló en el apartado 3.2.2. Posteriormente, los hepatocitos de cada animal fueron aislados por perfusión hepática con colagenasa (Gibco, Paisley, Inglaterra), como describieran Selen y col. (1980), y separados de células no parenquimatosas y restos celulares por centrifugación a baja velocidad. Los animales fueron anestesiados i.p. con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal). Se realizó una escisión laparoscópica del abdomen en forma de "T" invertida, con la finalidad de exponer los grandes vasos. Luego, se introdujo un catéter 14G (Abbocath T, Venisystem, Abbocath Ireland Ltd., Sligo, República de Irlanda) en vena porta, iniciándose una

perfusión abierta (no recirculante), durante 2 min, con una solución Ringer libre de calcio (NaCl 137 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 mM, KCl 5,4 mM y Glucosa 5,6 mM), suplementada con Hepes (3 g/l) y con EGTA (0,24 g/l), la cual posibilita la depleción del Ca<sup>2+</sup> endógeno, debilitando las uniones intercelulares. A continuación, con la finalidad de proceder a la digestión del tejido, el hígado fue perfundido durante 5 min en un sistema no recirculante, con la misma solución sin EGTA, pero suplementada en cambio con MgSO<sub>4</sub> (1 mM), colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich; actividad específica: 429 U/mg, concentración final en el medio de perfusión de 4.300 U/l) y CaCl<sub>2</sub> (2,5 mM), ya que la colagenasa requiere Ca<sup>2+</sup> para su actividad. El hígado fue removido y sumergido en la solución restante conteniendo colagenasa, donde fue disgregado mecánicamente. Los hepatocitos liberados fueron filtrados a través de una membrana de *nylon* de 40 µm y posteriormente purificados, separándose por centrifugación a baja velocidad (300 g, 2 min) de las células no parenquimatosas y otros restos celulares, seguido de tres lavados sucesivos del sedimento resultante con la solución sin colagenasa utilizada anteriormente. Todas las soluciones de perfusión fueron burbujeadas con oxígeno durante 15 min y ajustadas a un pH=7,40-7,50 y a una osmolaridad de 295-305 mOsm.

Una vez obtenidos los hepatocitos, se evaluó la viabilidad celular mediante el *test* de exclusión del colorante azul tripán. Los hepatocitos fueron utilizados sólo cuando la viabilidad inicial fue superior al 85 %. El recuento del número de células se realizó en una cámara de Neubauer, promediándose el número de células contadas en los cuatro cuadrantes de recuento de glóbulos rojos y multiplicándose este número por la dilución y por un factor de 10<sup>4</sup> para obtener el número de hepatocitos/ml. Los hepatocitos aislados fueron utilizados para determinar la actividad de CYP3A4 y la actividad *in vitro* de Mrp2.

#### **4.2.4.4. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.**

La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando el método colorimétrico de Lowry y col. (1951) realizando una curva de calibración con distintas concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. En cada

muestra, se midió la absorbancia del complejo generado a 660 nm utilizando un blanco de agua destilada. Para la curva de calibración, se graficó Absorbancia medida a 660 nm (A-660) en función de la masa en  $\mu\text{g}$  de BSA. Los  $\mu\text{g}$  de proteínas de una muestra dada se estimaron por interpolación del valor de A-660 obtenido para la misma. Todas las lecturas fueron realizadas en lector de microplacas Beckman-Coulter (modelo: LD 400).

#### 4.2.4.5. Inmunocuantificación por *western blot*.

Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo según la técnica descrita por Laemmli (1970). Las separaciones electroforéticas se realizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en concentraciones del 8 % o del 12 % (p/v), dependiendo del peso molecular de las proteínas a analizar. Las composiciones de los geles se detallan en la Tabla 1.

	Gel de Separación 8 %	Gel de separación 12 %	Gel de Concentración
Tris/HCl 1,5 M, pH=8,80	1,05 ml	1,05 ml	-
Tris/HCl 1,5 M, pH=6,80	-	-	0,5 ml
SDS 10%	42 $\mu\text{l}$	42 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
Acilamida/Bis-Acrlamida 30 %	1,1 ml	1,7 ml	0,4 ml
H <sub>2</sub> O	1,9 ml	1,3 ml	2,45 ml
TEMED	2,1 $\mu\text{l}$	2,1 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$
Persulfato de Amonio (PSA) 10 %	63 $\mu\text{l}$	63 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$

**Tabla 1:** Composición de los geles de separación y de concentración utilizados.

Las muestras a sembrar se prepararon en un *buffer* de siembra que contiene Tris/HCl 1 M, pH=6,80, SDS 10 % (p/v), azul de bromofenol 0,005 % (p/v), glicerol 10 % (p/v), H<sub>2</sub>O y ditiotreitól (DTT) 10 % (v/v). Los volúmenes de muestra sembrados correspondieron a 15 ó 30  $\mu\text{g}$  de proteína dependiendo de la proteína a analizar.

Los geles se sometieron a electroforesis en un *buffer* Glicina 0,2 M, Tris 25 mM y SDS 0,1% (p/v) utilizando un equipo comercial (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, CAa, EE.UU.) a un voltaje de 110 V durante 15 min, luego de lo cual se

aplicaron 150 V hasta completar la corrida. Una vez finalizada la corrida electroforética, se realizó la transferencia a membranas de fluoruro de polivinilo (PVDF, del inglés: *Polyvinylidene difluoride membranes*), (Hybond™-ECL™, Amersham Biosciences, CA, EE.UU). La transferencia se realizó en un *buffer* de transferencia compuesto por Tris 20 mM, Glicina 150 mM, SDS 0,03 % (p/v), Metanol 20 % (v/v), durante 90 min a una corriente constante de 350 mA y a 4 °C. Para tal fin se utilizó un equipo comercial *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad, CA, EE.UU.).

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon 1 h en solución de lavado (PBS 1X y Tween-20 0,3 % v/v), con 10 % (p/v) de leche en polvo descremada, a 4 °C. Transcurrido el tiempo de bloqueo, se lavaron las membranas con solución de lavado y se incubaron las membranas con anticuerpo primario (en PBS 1X, Tween-20 0,3 % (v/v), azida sódica 0,03 % p/v) durante toda la noche. Luego, se realizaron 4 lavados de 7 min y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado y conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente, y finalmente se realizaron 4 lavados de 7 min. El revelado se realizó usando un reactivo quimioluminiscente (ECL, Thermo Scientific Pierce Inc. Illinois, EE.UU.) y se realizó la cuantificación de las bandas correspondientes por densitometría, utilizando el programa *Gel Pro Analyzer* (Media Cybernetics, Silver Spring, EE.UU.). Como control de carga se detectó la proteína  $\beta$ -Actina y se controló la transferencia por tinción con el colorante rojo Ponceau S para visualizar las proteínas transferidas.

Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la Tabla 2:

Anticuerpo	Generado en	Marca	Proteína sembrada	Dilución	Observación
<b>Anti-<math>\beta</math>-Actina humana</b>	Ratón	Sigma Aldrich Co.	15 ó 30 $\mu$ g	1:5000	
<b>Anti-<math>\beta</math>-Actina de rata</b>	Ratón	Sigma Aldrich Co.	15 ó 30 $\mu$ g	1:5000	
<b>Anti-CYP3A humano (H-300)</b>	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	15 $\mu$ g	1:300	Presenta reacción cruzada con CYP3A de rata.
<b>Anti-UGT 1A de rata</b>	Conejo	Ikushiro et al., 1999	15 $\mu$ g	1:1000	Presenta reacción cruzada con UGT 1A humana.

<b>Anti-GST <math>\alpha</math> de rata</b>	Cabra	Oxfordbiomed	15 $\mu$ g	1:1000	
<b>Anti-GST <math>\pi</math> de rata</b>	Conejo	<i>Enzo life Science</i>	15 $\mu$ g	1:1000	
<b>Anti-GST <math>\mu</math> de rata</b>	Cabra	Oxfordbiomed	15 $\mu$ g	1:1000	
<b>Anti-MDR1 humana</b>	Conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i>	30 $\mu$ g	1:500	Presenta reactividad cruzada con MDR1 de rata.
<b>Anti-MRP2 humana</b>	Ratón	<i>Enzo life Science,</i>	30 $\mu$ g	1:1000	Presenta reactividad cruzada con Mrp2 de rata.
<b>Anti-BCRP ratón</b>	Conejo	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i>	15 $\mu$ g	1:1000	
<b>Anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rabanito</b>	-	<i>Thermo Scientific</i>	-	1:5000	
<b>Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabanito</b>	-	<i>Thermo Scientific</i>	-	1:5000	
<b>Anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rabanito</b>	-	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i>	-	1:5000	

**Tabla 2:** Anticuerpos utilizados durante ensayos de Western blotting.

#### 4.2.4.6. Inmunomarcación seguida de microscopía confocal.

Para detectar la localización celular *in situ* de las proteínas transportadoras en estudio, los segmentos de yeyuno proximal y de hígado se lavaron con solución fisiológica fría y congelaron en isopentano previamente enfriado en nitrógeno líquido y se mantuvieron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Los tejidos congelado se cortaron en láminas de  $5\text{ }\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo criostático (Zeiss Microm HM500), se colocaron en portaobjetos y luego se fijaron por 10 min en metanol frío ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente, las improntas de tejido fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo anti-Pgp (Anti-MDR1 humano, policlonal, Alexis *Biochemicals*, CA, EE.UU., dilución 1:50) o anti-MRP2 (Anti-MRP2 humano, monoclonal, Alexis *Biochemicals*, CA, EE.UU., dilución 1:50). Luego de realizarse los lavados, los portaobjetos se incubaron con anti-IgGs generados en burro y

conjugados con Cy2 o Cy3 según corresponda (*Jackson Immuno Research Laboratory, Inc.*, PA, EE.UU.), durante 2 hs. La tinción de los núcleos se realizó incubando los portaobjetos con 1,5  $\mu$ M de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, del inglés: *4',6-diamidino-2-phenylindole*, Molecular Probes, CA. EE.UU.) durante 5 min justo antes del último lavado. Este último es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN.

Los preparados se observaron en un microscopio confocal Nikon C1 Plus (Tokyo, Japón). Para asegurarse una tinción y captura de imágenes comparables entre controles y tratados, los cortes se realizaron el mismo día, y fueron sujetos a un proceso simultáneo de tinción y análisis microscópico. Todas las imágenes fueron capturadas usando el *software* del microscopio confocal.

#### **4.2.4.7. Actividad de CYP3A4.**

Dentro de la subfamilia de proteínas CYP3A, la isoforma CYP3A4, es una de las enzimas más relevantes en el metabolismo de fase I de xenobióticos en el organismo, representa el 30 % del contenido total de citocromos en el hígado humano y es responsable del metabolismo hepático del 60 % de las drogas de uso terapéutico (Li y col, 1995).

La determinación de la actividad de CYP3A4 fue realizada en hepatocitos aislados utilizando el *kit* comercial P450-Glo™ CYP3A4 Assay Luciferin-IPA (V9001, Promega, Madison, MIUU, EE.UU.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En placas de 96 pocillos se agregaron 80.000 células por pocillo a 40  $\mu$ l de sustrato y se incubaron 60 min a 37 °C con agitación. Posteriormente se agregaron 80  $\mu$ l del reactivo LDR por pocillo. La luminiscencia fue evaluada dentro de los primeros 20 min de reacción, utilizando un lector de microplacas Beckman-Coulter (modelo: LD 400).

#### **4.2.4.8. Actividad de GST.**

La actividad GST fue evaluada utilizando CDNB como sustrato, en muestras de citosol de los tres tejidos de interés y siguiendo protocolos descriptos

previamente (Habig y col., 1974), excepto que la concentración de GSH fue de 5 mM y la concentración de CDNB fue de 1,25 mM, este último disuelto en DMSO.

Teniendo como finalidad determinar la actividad de GST en los diferentes tejidos, los citosoles (10 µg/ml para hígado y 100 µg/ml para intestino) se diluyeron en solución tampón de fosfato de sodio (0,13 M, pH=6,50) y se les agregó el sustrato CDNB. Luego, las mezclas se preincubaron 3 min a 37 °C e inmediatamente se les agregó el co-sustrato GSH. Se registraron los cambios de absorbancia a 340 nm cada 15 seg durante 1 min. Los ensayos se realizaron rutinariamente a 37 °C y en la solución reguladora de fosfato de sodio mencionada, para disminuir la magnitud de la conjugación no enzimática. Bajo estas condiciones experimentales, las actividades enzimáticas fueron una función lineal del tiempo y la concentración de proteína.

#### **4.2.4.9. Actividad *in situ* de P-gp y Mrp2.**

Las actividades de transporte de P-gp y Mrp2 fueron evaluadas utilizando sustratos modelos de cada transportador: en el caso de P-gp se utilizó Rho-123 (fluoróforo que ingresa a la célula por difusión simple y luego es excretado vía P-gp), y para Mrp2 se utilizó CDNB (compuesto exógeno que se convierte intracelularmente en DNP-SG, sustrato de Mrp2, y dinitrofenil-cisteinil glutation (DNP-CG, metabolito mayoritario producto de la acción de la enzima  $\gamma$ -glutamyl-tranpeptidasa sobre DNP-SG, en la cara luminal del epitelio secretor), en bilis, orina y perfusato intestinal.

La formación de DNP-SG es muy eficiente y mayormente catalizada por el sistema enzimático de la GST. Este compuesto, una vez formado, es excretado desde las células a través de Mrp2. La actividad de Mrp2 en hígado, intestino y riñón, se evaluó por lo tanto a través de la presencia en bilis, perfusato intestinal y orina de DNP-SG y su derivado DNP-CG, resultante de la acción de la enzima gamma glutamil transpeptidasa sobre DNP-SG en la luz canalicular, intestinal o del túbulo renal.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg peso corporal) y mantenidos en esta condición durante todo el experimento. La vena

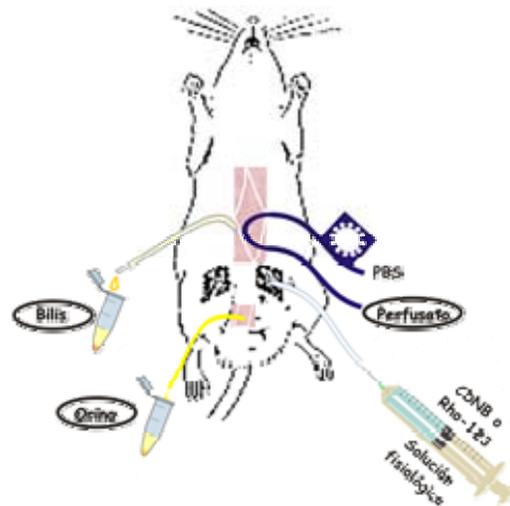
femoral, el conducto biliar común y la vejiga fueron canalizados utilizando catéteres de polietileno PC-50, PC-10 y PC-70, respectivamente (ver Figura 9). Los estudios de excreción intestinal se realizaron utilizando la técnica de perfusión *in situ* de simple paso (Gotoh y col., 2000; Kageyama y col., 2006), en la cual el intestino es perfundido con PBS (solución salina de fosfatos), pH=7,35 desde el yeyuno proximal hasta el inicio del yeyuno distal (aproximadamente 50 cm de longitud comenzando a los 10 cm a partir del píloro) con una bomba peristáltica y a una velocidad de 0,4 ml/min. Luego de un período de 30 min de estabilización, se administró por vena femoral, una inyección en bolo de Rho-123 (0,52  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal en 1:19 DMSO/solución salina i.v) o CDNB (30  $\mu\text{moles/kg}$  de peso corporal en DMSO:solución salina, 1:19 v/v) intravenosa (i.v.). Durante 90 min, se recolectaron muestras de bilis, perfusato intestinal y orina en períodos de 10, 15 y 30 min, respectivamente. Para reponer los fluidos corporales, se administró la cantidad apropiada de solución salina i.v. durante todo el experimento. La temperatura corporal fue mantenida en todo momento en  $37,0 \pm 0,5$  °C con una lámpara infrarroja de calentamiento. Al finalizar cada experimento, los animales se sacrificaron por exsanguinación y los tres órganos (hígado, intestino y riñón) fueron removidos y pesados. Las muestras de bilis, perfusato intestinal y orina fueron tratadas con metanol (relación muestra:metanol 1:1) para la detección de Rho-123 o con  $\text{HClO}_4$  al 5 % (v/v, 50  $\mu\text{l}$  por ml de muestra) para la detección de DNP-SG y centrifugadas a 3.500 g durante 5 min.

Se determinó la cantidad de Rho-123 extraída por espectrofluorometría ( $\lambda_{\text{exc}} = 485$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 535$  nm), (Kageyama y col., 2003).

El contenido de DNP-SG y DNP-CG en los sobrenadantes fue determinado según se describió en Mottino y col. (2001) utilizando un HPLC marca Waters, modelo M-600 (Waters, MA, EE.UU.), equipado con una columna Luna 5  $\mu$  C18(2) 100 Å250 x 4.60 nm (Phenomenex, CA, EE.UU.). La elusión fue llevada a cabo de modo isocrático usando una fase móvil de acetonitrilo: $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.01 % (1:3 v/v) y a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Los compuestos DNP-SG y DNP-CG fueron detectados a 365 nm y cuantificados por la altura del pico, previa identificación con ayuda de testigos externos.

**Figura 9: Esquema de cateterización de animales en ensayos de evaluación de la actividad de P-gp y Mrp-2**

**in vivo:** Técnica de perfusión *in situ* de simple paso. Los animales fueron anestesiados, la vena femoral, el conducto biliar común y la vejiga fueron canalizados utilizando catéteres de polietileno PC-50, PC-10 y PC-70, respectivamente. Posteriormente, el intestino fue perfundido con PBS desde el yeyuno proximal hasta el inicio del yeyuno distal con bomba peristáltica. Luego de un período de 30 min de se administró una dosis única del sustrato modelo correspondiente (Rho-123 para la determinación de la actividad de P-gp y CDNB en la determinación de la actividad de Mrp-2) en bolo intravenosamente. Se recolectaron muestras de bilis, orina y perfusato intestinal a intervalos designados por 90 min. Para reponer los fluidos corporales, se administró (i.v., por la vena femoral) la cantidad apropiada de solución salina durante todo el experimento.



**4.2.4.9.1. Actividad *in vitro* de Mrp2.**

Para estimar la actividad de transporte de Mrp2 *in vitro*, se procedió de igual forma que en el modelo *in vivo*, determinándose la excreción del sustrato exógeno DNP-SG, desde hepatocitos aislados hacia el medio de incubación. Los hepatocitos fueron aislados de hígados de animales pre-tratados por perfusión con colagenasa (Gibco, Paisley, Inglaterra), como se describió en el apartado 3.2.4.3. Luego, las células se preincubaron con CDNB en exceso (100  $\mu\text{M}$  en solución tamponada Ringer Krebs-Henseleit-Hepes, pH=7,40) a 10 °C como se describió (Oude-Elferink y col., 1989). En este caso, como la conjugación de CDNB transcurre a baja temperatura se asume que es independiente de la reacción enzimática catalizada por GST. Luego se tomaron alícuotas de la suspensión celular ( $7 \times 10^4$  células) y se incubaron en tubos de polietileno de 0,4 ml conteniendo una solución de lisis (NaCl 3 M, Tritón X-100 0,1 % v/v) y una capa de silicona (Wacker Chemie GmbH, Munich, BY, Alemania) e incubados a 37 °C durante 0, 30, 60 y 90 seg en solución tamponada libre de CDNB. Al final del período de incubación, las suspensiones fueron centrifugadas a 9.000 g durante 20 seg. El CDNB, convertido intracelularmente en DNP-SG y liberado al medio

como tal, finalmente se determinó en el interior celular y en los sobrenadantes por HPLC según se describió anteriormente (apartado 3.2.4.9). La tasa de excreción inicial al medio fue estimada como la pendiente de la curva de regresión de la cantidad de DNP-SG presente en los sobrenadantes por mg de proteína del hepatocito, en función del tiempo. El dato del contenido celular fue también expresado por mg de proteína del hepatocito (determinada previamente por la reacción de Lowry y col. 1951).

### **4.3. Farmacocinética de BZL.**

Otro grupo de animales controles y tratados con BZL fueron usados para estimar la velocidad de eliminación de BZL. Para este fin, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg peso corporal) y mantenidos en esta condición durante todo el experimento. La vena femoral, el conducto biliar común y la vejiga fueron canalizados utilizando catéteres de polietileno PC-50, PC-10 y PC-70, respectivamente (ver Figura 10). Después de un período de 15 min. de estabilización, se administró una dosis única de BZL en bolo intraduodenalmente (5 mg/kg peso corporal en solución salina). Se recolectaron muestras de bilis, orina y sangre de la cola a intervalos designados por 90 min. Para reponer los fluidos corporales, se administró la cantidad apropiada de solución salina i.v. durante todo el experimento. La temperatura corporal fue mantenida en todo momento en  $37,0 \pm 0,5$  °C con una lámpara infrarroja de calentamiento. Las muestras de bilis, orina y suero fueron tratadas con acetonitrilo/DMSO (1:1) y desproteinizadas con ácido tricloroacético (10 % p/v). El contenido de BZL fue determinado por HPLC (Waters 600, Waters, Milford, MA, EE.UU.). La corrida fue realizada en condiciones de elución isocrática en una columna C18 (Luna 5  $\mu$ , Phenomenex) con una fase móvil de acetonitrilo y agua (2:3 v/v) a una velocidad de flujo de 1 ml/min, como fuera descrito por Morilla y col. (2003). BZL fue detectado a 324 nm y cuantificado mediante el método del estándar externo por el área del pico.

Un grupo adicional de animales pretratados con BZL (100 mg/kg/día, 3 días consecutivos) fue utilizado para evaluar el decaimiento plasmático y los índices de

excreción biliar y urinaria de BZL remanente a las 24 h después de la última inyección. La información obtenida de este último grupo fue deducida al grupo tratado con BZL que recibió la dosis testigo de BZL.

Utilizándose el *software GraphPad Prism*, se obtuvieron el AUC plasmática (del inglés: “*Area Under the Curve*”), la concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) y la velocidad de decaimiento plasmático ( $k$ ). Además, se obtuvieron valores de excreción de BZL acumulativa y % de la dosis administrada en bilis y orina.



**Figura 10: Esquema de animales cateterizados para la determinación de la farmacocinética de BZL.** Los animales fueron anestesiados y se cateterizó el conducto biliar, la vejiga y la vena femoral. Después de un período de 15 min de estabilización, se administró intraduodenalmente una dosis única de BZL (5 mg/kg peso corporal en solución salina). Posteriormente, se recolectaron muestras de bilis, orina y sangre de la cola a intervalos designados por 90 min. Para reponer los fluidos corporales, se administró (i.v., por la vena femoral) la cantidad apropiada de solución salina durante todo el experimento.

#### 4.4. Absorción intestinal de BZL.

Para evaluar la velocidad de absorción de BZL (sentido mucoso-seroso) se utilizó el modelo de sacos intestinales no evertidos (Ghanem y col., 2011). Para ello, y bajo anestesia de pentobarbital (50 mg/kg peso corporal) se extrajo la porción de intestino delgado correspondiente al yeyuno proximal. Segmentos de 3 cm se lavaron cuidadosamente con solución salina helada y se usaron inmediatamente para la preparación de los saquitos intestinales. El armado de los saquitos se realizó sobre una placa de vidrio permanentemente enfriada sobre hielo. Los mismos fueron llenados con 750  $\mu$ l de solución de Krebs-Henseleit (40 mM glucosa, pH=7,40) previamente gaseado con  $O_2/CO_2$  (95:5) conteniendo 100  $\mu$ M de BZL (en el compartimento mucoso), en ausencia o presencia de PSC833 (10  $\mu$ M, inhibidor específico de P-gp, análogo no inmunosupresivo de la

ciclosporina A, Tocris Bioscience, Bristol, Inglaterra). Posteriormente fueron incubados en 7 ml de solución de Krebs-Henseleit (sin BZL, compartimiento seroso) (Mottino y col., 2001), continuamente gaseado con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5). Alícuotas del medio de incubación (100 µl) fueron recolectadas a los 5, 10, 15 y 20 min. Concluida la incubación, los sacos fueron lavados, pesados y homogenizados en solución salina fría en una (relación tejido:solución salina 1:2 p/v).

Todas las muestras obtenidas fueron desproteinizadas y evaluadas mediante HPLC (Morilla y col., 2003) como se describió anteriormente (apartado 4.3).

#### **4.5. Estudios estadísticos.**

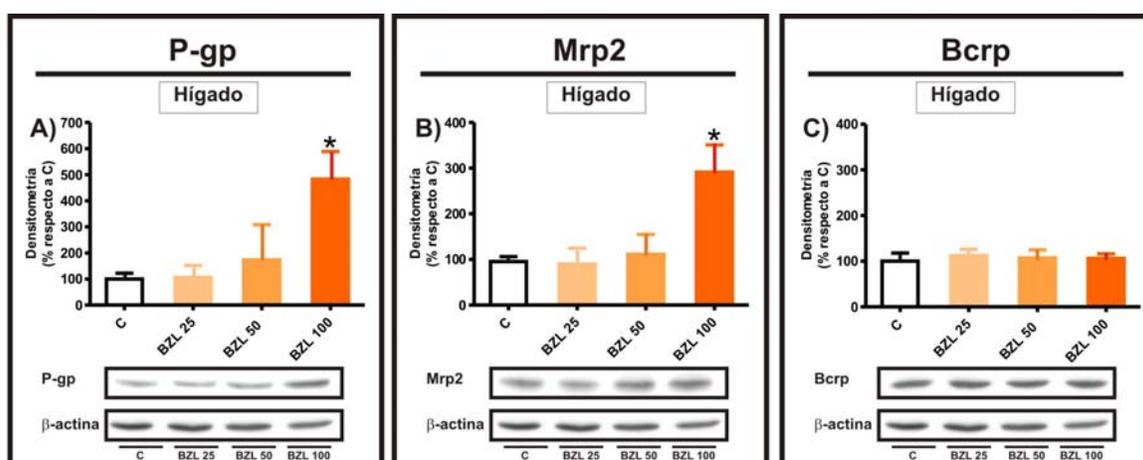
Todos los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente (ANOVA seguido de Newman-Keuls, o prueba de la *t* de Student, según corresponda) considerándose como diferencias significativas aquéllas que arrojen al menos un  $p < 0,05$ .

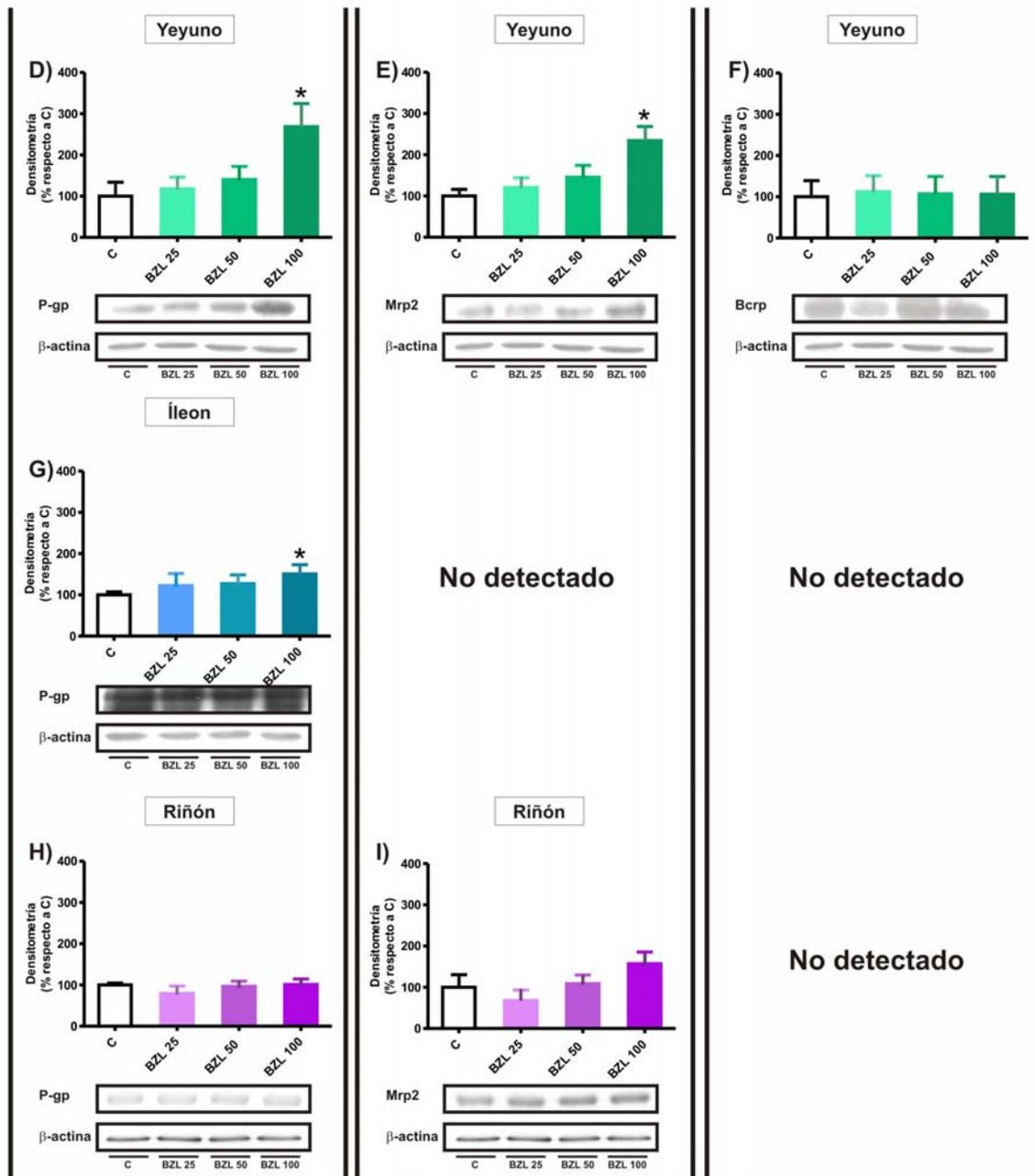
## ***V. Resultados***

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. Resultados preliminares.

Teniendo como finalidad la elección de la dosis de BZL que se utilizaría en los posteriores tratamientos de los animales, los mismos fueron tratados i.p. con BZL (dosis: 25, 50 ó 100 mg/kg peso corporal/día, 3 días) o con vehículo (animales controles) siguiendo el mismo esquema de administración. El tratamiento indujo un aumento en los niveles de expresión de los transportadores P-gp y Mrp2 sólo a la mayor dosis de BZL estudiada, en hígado (Fig. 11 A y B, respectivamente), y yeyuno (Fig. 11 D y E, respectivamente) y de P-gp en íleon (Fig. 11 G). Mrp2 no se detectó en íleon. No se observaron cambios significativos en riñón (Fig. 11 H y I, respectivamente). La expresión de Bcrp no se modificó en hígado ni en yeyuno (Fig. 11 C y F, respectivamente). No se detectó Bcrp en íleon ni en riñón. La dosis de 100 mg/kg peso corporal/día fue utilizada en los subsiguientes experimentos, por ser la única a la que se observa inducción en los transportadores más relevantes.



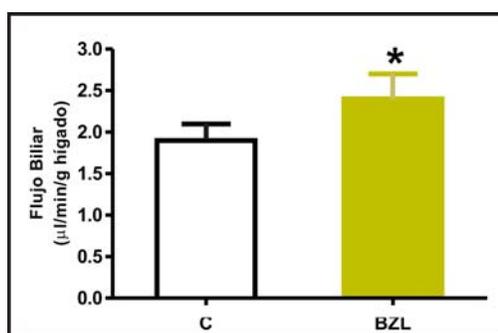


**Figura 11:** Expresión de P-gp y Mrp2 en hígado, intestino y riñón de rata. El tratamiento con BZL (100 mg/kg/día, 3 días) indujo un aumento en los niveles de expresión hepática de P-gp (5 veces respecto al control, **A**) y Mrp2 (2 veces respecto al control, **B**), de P-gp en yeyuno (2 veces respecto al control, **D**) y Mrp2 (2 veces respecto al control, **E**), y de P-gp en íleon (0,5 veces respecto al control, **G**). Mrp2 no se detectó en íleon. En riñón, el tratamiento con BZL no alteró los niveles de expresión de P-gp (**H**) ni Mrp2 (**I**), en comparación a los valores observados en el grupo control, en ninguna de las dosis evaluadas. La expresión de Bcrp no se modificó en Hígado ni en yeyuno (**C** y **F**, respectivamente). No se detectó Bcrp en íleon ni en riñón. La expresión proteica en los grupos controles se tomó como 100 %. \*diferente de C,  $p < 0,05$ ,  $(n=3)$ .

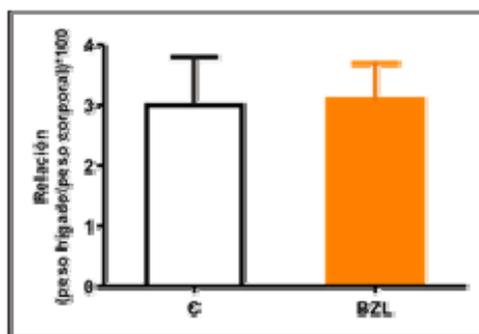
## 5.2. Efecto de BZL sobre la función secretora biliar, relación peso de hígado/peso corporal y marcadores séricos de daño hepático.

Con la finalidad de determinar si el pre-tratamiento con BZL podía causar daño hepático o modificar la funcionalidad, se determinó el flujo biliar, la relación peso de hígado/peso corporal y marcadores séricos de daño hepático.

Como se observa en la figura 12, el flujo biliar se vio significativamente incrementado en ratas tratadas con BZL (+ 25 %,  $p < 0,05$ ), sin cambios en la masa del hígado relativa al peso corporal (Fig. 13).

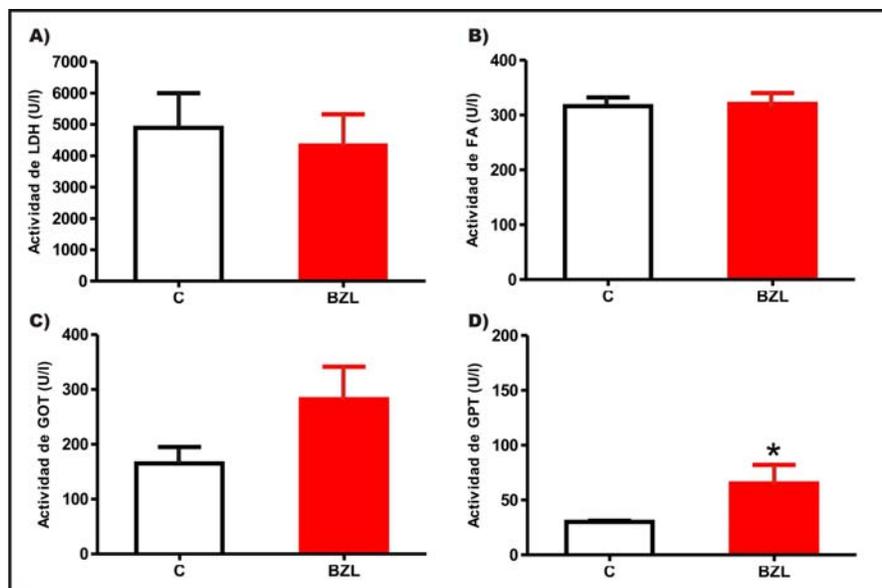


**Figura 12: Determinación de flujo biliar.** Los animales tratados con BZL (100 mg/kg/día, durante 3 días, barra gris) mostraron flujos biliares mayores (+ 25 %) a los animales controles (barra negra). \*diferente de C,  $p < 0,05$  (n=8).



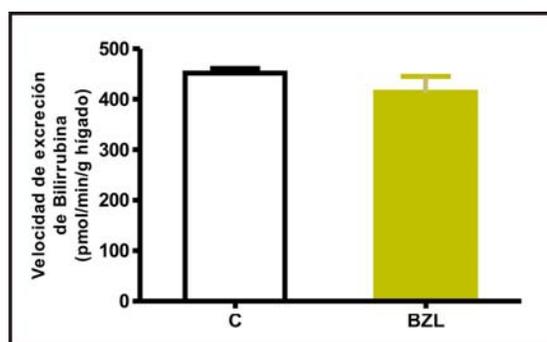
**Figura 13: Relación peso hígado-peso corporal.** El tratamiento con BZL no alteró la relación peso de hígado-peso corporal, en relación al grupo control (n=8).

Por otra parte, al evaluar los niveles séricos de LDH, FA, GOT y GPT, observamos que el pre-tratamiento con BZL no alteró los valores de las enzimas evaluadas (Fig. 14 A, B y C), a excepción de GPT (Fig. 14 D), la cual se incrementó levemente.

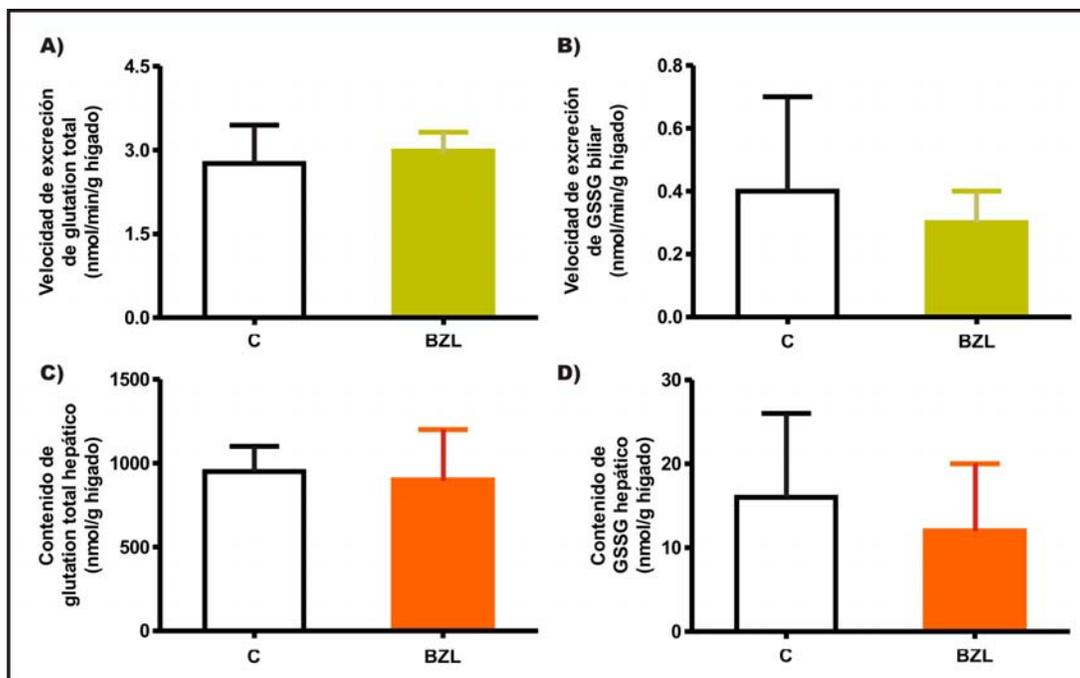


**Figura 14: Niveles séricos de enzimas hepáticas.** Los niveles séricos de LDH (A), FA (B) y GOT (C) no se vieron alterados en ratas tratadas con BZL, mientras que los niveles séricos de GPT (D) se incrementaron levemente en los animales tratados con BZL en relación al grupo control.\*diferente de C,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).

Al evaluar la velocidad de excreción biliar de bilirrubina (Fig. 15), glutatión total y GSSG (Fig. 16 A y B, respectivamente) no observamos cambios en ninguno de los parámetros evaluados, en respuesta al tratamiento con BZL. Además, el contenido hepático de glutatión total y GSSG fueron similares en ambos grupos (Fig. 16 C y D, respectivamente).



**Figura 15: Excreción biliar de bilirrubina.** La velocidad de excreción biliar de bilirrubina (pmol/min/g hígado) fue similar entre ambos grupos experimentales, ( $n=3$ ).



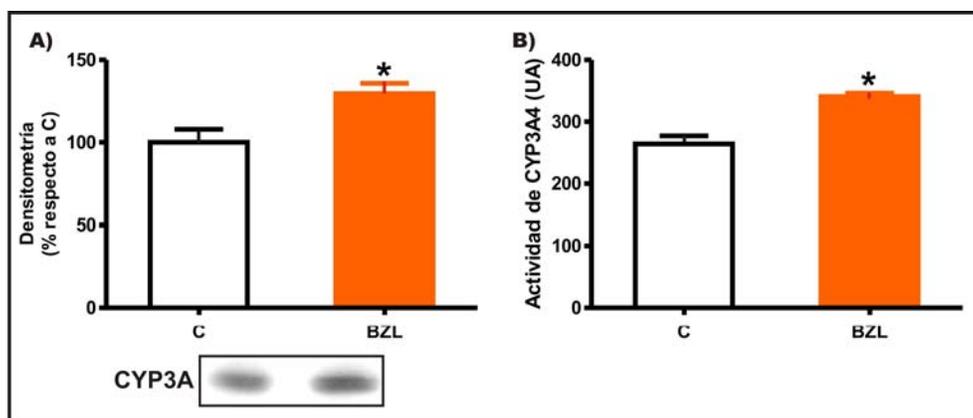
**Figura 16:** Velocidad de excreción y contenido hepático de GSSH y glutatión total. Las velocidades de excreción biliar de glutatión total y GSSG (A y B, respectivamente), y el contenido hepático de glutatión total y GSSG (C y D, respectivamente) fueron similares en ambos grupos (n=3-5).

### 5.3. Efecto del tratamiento con BZL sobre la expresión de enzimas de biotransformación de Fase I (CYP3A) y Fase II (UGTs y GSTs).

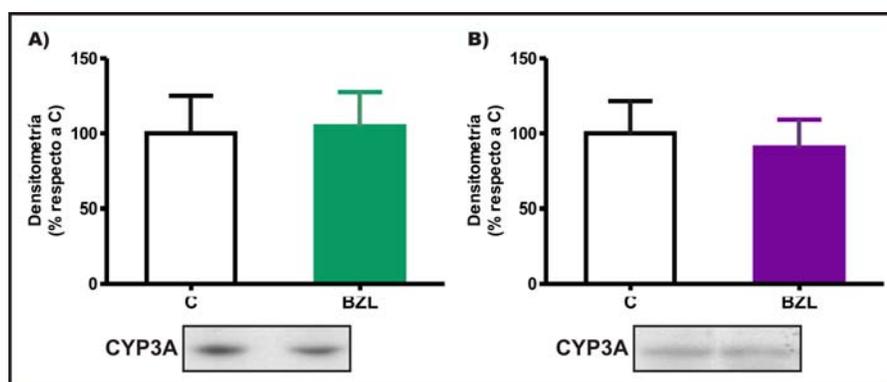
En principio, evaluamos el efecto del pretratamiento con BZL sobre los sistemas de biotransformación CYP3A, UGT y GST, los cuales son los sistemas enzimáticos cuantitativamente más importantes en los procesos de biotransformación.

Observamos que el tratamiento de ratas Wistar macho adultas con BZL aumenta no sólo la expresión proteica de la familia de proteínas CYP3A (responsable de la primera etapa de biotransformación en hígado del 50% de las drogas de uso clínico, Köhle y Bock, 2009) sino también estimula la actividad de CYP3A4 hepática (Fig. 17 A y B, respectivamente).

En intestino (yeyuno e íleon) y en riñón no se observaron cambios significativos en la expresión de esta enzima (Fig. 18 A y B, respectivamente).

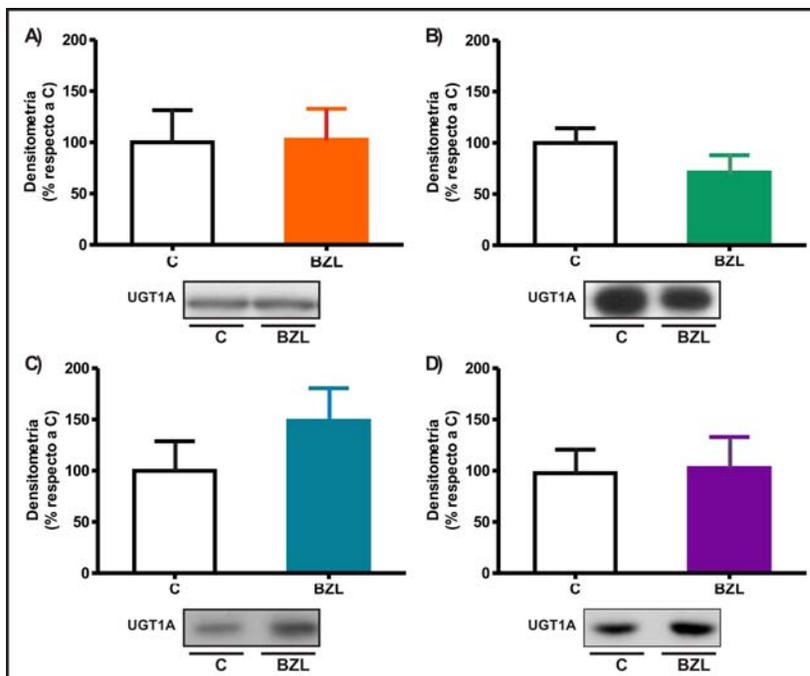


**Figura 17:** Expresión de CYP3A y actividad de CYP3A4 en hígado de rata. El tratamiento con BZL aumenta la expresión proteica de la subfamilia de proteínas CYP3A (A) y la actividad de CYP3A4 (B). \*diferente del control,  $p < 0,05$  ( $n=4$ ).



**Figura 18:** Expresión de CYP3A en yeyuno y riñón de rata. El tratamiento con BZL no modificó la expresión proteica de CYP3A en yeyuno (A) ni riñón (B) ( $n=4$ ).

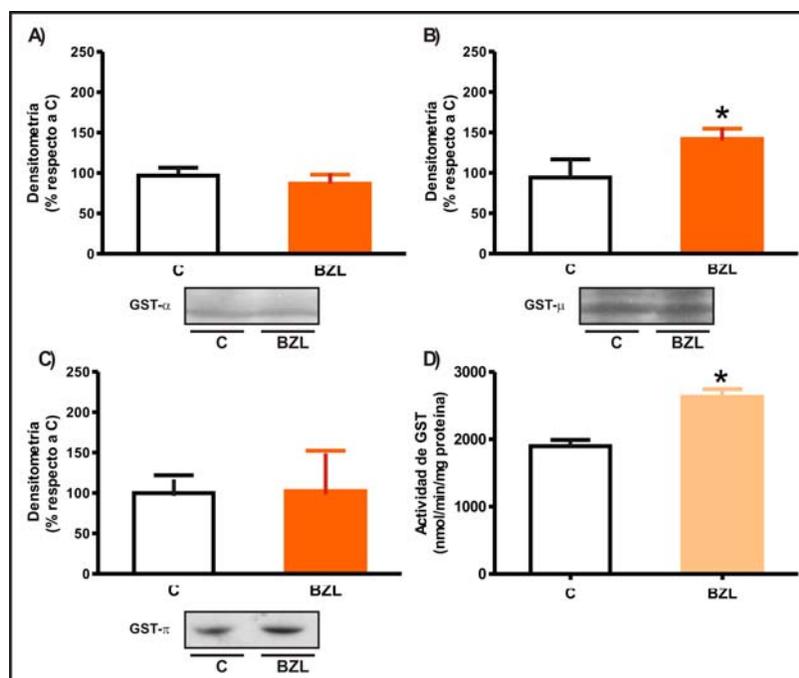
Por otra parte, la expresión de UGT1A fue detectada utilizando un anticuerpo que se une a la región C-terminal común a todas las isoformas de este grupo (Ikushiro y col., 1997). El tratamiento con BZL no alteró los niveles de expresión de UGT1A en ninguno de los tejidos analizados (Fig. 19).



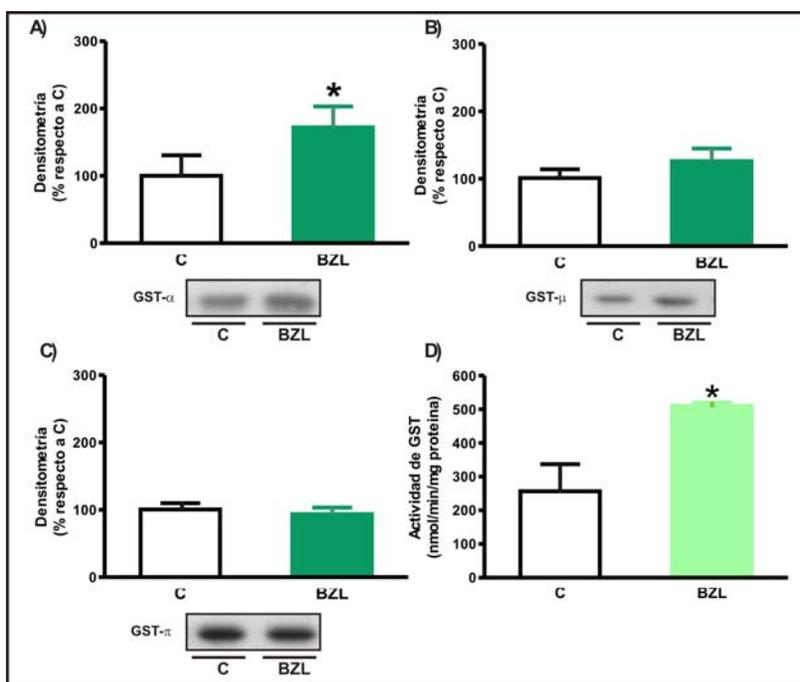
**Figura 19:** Expresión proteica de UGT1A en hígado, yeyuno, íleon y riñón. El tratamiento con BZL no alteró los niveles de expresión de UGT1A en ninguno de los tejidos analizados (n=4) (A: hígado; B: yeyuno; C: íleon; D: riñón).

En cuanto a GST, las clases  $\alpha$  y  $\mu$  fueron las únicas que mostraron un aumento en la expresión luego del tratamiento con BZL, con un concomitante aumento en la actividad global. En hígado se observó un aumento en la expresión proteica de GST $\mu$  cercano al +40 % (Fig. 20 B), sin cambios en la expresión de GST $\alpha$  (Fig. 20 A) ni GST $\pi$  (Fig. 20 C), acompañado de un aumento en la actividad del 38 % (Fig. 20 D).

**Figura 20:** Expresión y actividad de GSTs en hígado de rata. El tratamiento con BZL (100 mg/kg/día, 3 días) indujo un aumento en los niveles de expresión de GST $\mu$  (40 %, B), sin alterar los niveles de expresión de GST $\alpha$  (A) ni GST $\pi$  (C). La expresión proteica en los grupos controles se tomó como 100%. La actividad de GSTs (nmoles/min/mg proteína) se indujo un 38 % (D). \*diferente de C, p<0,05 (n=3).



Por otra parte, en yeyuno se observó un aumento proteico de GST $\alpha$  cercano al 100 % (Fig. 21 A), sin cambios en la expresión de GST $\mu$  (Fig. 22 B) ni GST $\pi$  (Fig. 21 C), el que se tradujo en un aumento de la actividad de GST global del 70 % (Fig. 22 D).

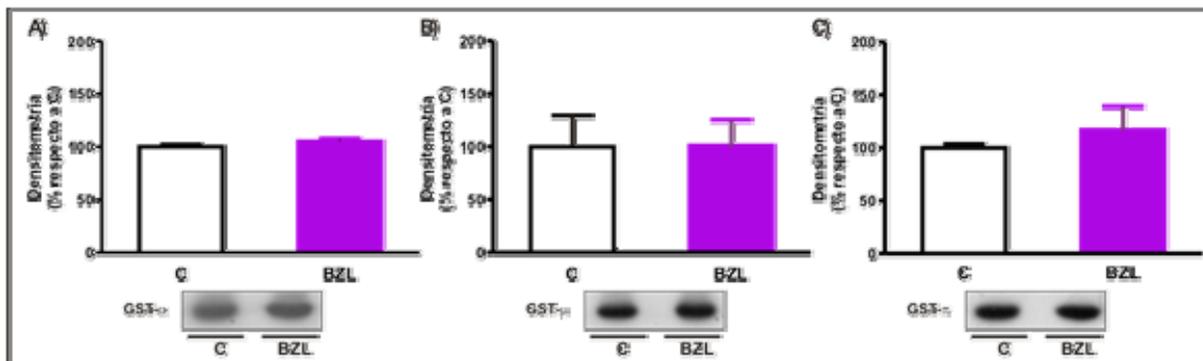
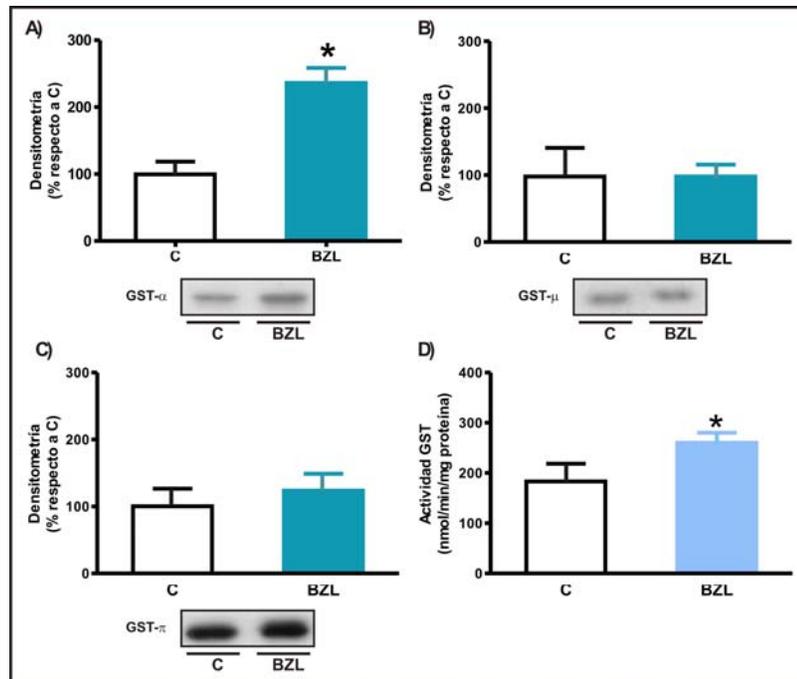


**Figura 21:** Expresión y actividad de GSTs en yeyuno de rata. El tratamiento con BZL (100 mg/kg/día, 3 días) indujo un aumento en los niveles de expresión de GST $\alpha$  (72 % respecto a C, **A**), sin alterar los niveles de expresión de GST $\mu$  (**B**) ni GST $\pi$  (**C**). La expresión proteica en los grupos controles se tomó como 100 %. La actividad de GST (nmoles/min/mg proteína) se indujo un 100 % (**D**). \*diferente de C,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).

Una situación similar fue observada en Íleon, con un aumento del 136 % en la expresión proteica de GST $\alpha$  (Fig. 22 A), sin cambios en la expresión de GST $\mu$  (Fig. 22 B) ni GST $\pi$  (Fig. 22 C), que se tradujo en un aumento de la actividad global de GST (43 %, Fig. 22 D). Estos resultados sugieren que el aumento de la actividad GST en intestino se debería al menos en parte a la inducción de la expresión proteica de GST $\alpha$ .

En riñón no se observaron alteraciones en la expresión de ninguna de las isoformas estudiadas (Fig. 23).

**Figura 22: Expresión y actividad de GSTs en íleon de rata.** El tratamiento con BZL (100 mg/kg/día, 3 días) indujo un aumento en los niveles de expresión de GST $\alpha$  (163 % respecto a C, **A**), sin alterar los niveles de expresión de GST $\mu$  (**B**) ni GST $\pi$  (**C**). La expresión proteica en los grupos controles se tomó como 100 %. La actividad de GST (nmoles/min/mg proteína) se indujo un 43 % (respecto a C, **D**). \*diferente de C,  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).



**Figura 23: Expresión proteica de GSTs en riñón.** El tratamiento con BZL (100 mg/kg/día, 3 días,  $n=4$ ) no modificó los niveles de expresión de GST $\alpha$  (**A**), GST $\mu$  (**B**) ni GST $\pi$  (**C**). La expresión proteica en los grupos controles se tomó como 100 %.

#### 5.4. Efecto del tratamiento con BZL sobre la expresión y actividad de P-gp y Mrp2 en tejidos secretores.

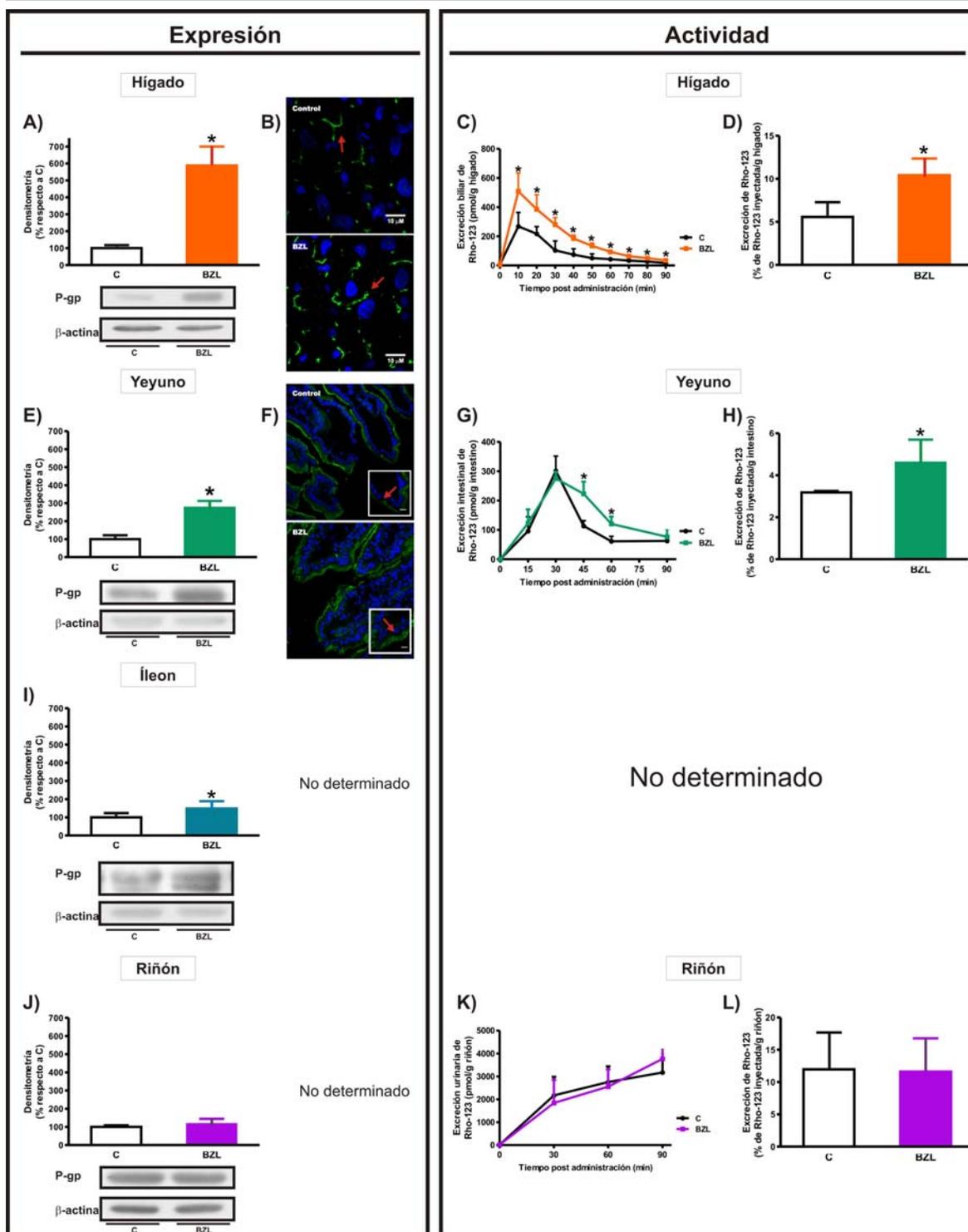
En cuanto a la expresión proteica de P-gp observamos que el tratamiento de ratas Wistar macho adultas con BZL indujo un aumento significativo en hígado

(500 %), en yeyuno (170 %) y en íleon (50 %) (Fig. 24 A, E y I, respectivamente). En riñón no se observaron cambios en la expresión de P-gp (Fig. 24 J).

El efecto de BZL sobre la expresión de P-gp en hígado e intestino también fue evaluado *in situ* por inmunomarcación fluorescente seguida de microscopía confocal utilizando un anticuerpo específico anti-MDR1. En hígado, P-gp se expresa principalmente en la membrana canalicular (Fig. 24 B, fluorescencia verde, flecha roja en la imagen). En las vellosidades intestinales, P-gp (fluorescencia verde) se expresa con preferencia en la punta de las mismas y sus niveles de expresión disminuyen a medida que avanzamos hacia la cripta. En los enterocitos, Mrp2 se localiza en la zona apical (Fig. 25 F, flecha roja en la imagen). El tratamiento con BZL no alteró la localización normal del transportador.

Para evaluar si el aumento en la expresión de P-gp podría tener consecuencias funcionales sobre su actividad, la velocidad de eflujo de Rho-123 (sustrato modelo de P-gp) fue medido en ratas tratadas con BZL y controles en un modelo de perfusión intestinal *in situ* de simple paso con recolección simultánea de bilis y orina. Observamos entonces un incremento en las velocidades de excreción biliar e intestinal (yeyuno) de Rho-123 (170 % y 85 %, respectivamente) en concordancia con el aumento de expresión de este transportador, como puede observarse en la figura 24 (C y G, respectivamente). Por otra parte, no se observaron diferencias en la excreción renal del compuesto en las ratas tratadas con BZL en relación al grupo control (Fig. 24 K). La actividad de P-gp en íleon no fue evaluada.

Además, la excreción de Rho-123 fue estimada como porcentaje de la dosis administrada, siendo significativamente mayor en la bilis de las ratas con BZL (~87%, Fig. 24 D) y en el perfusato intestinal (~40%, Fig. 24 H) mientras que en orina no se vio afectada (Fig. 24 L). Estos resultados indicarían que la eliminación global de sustratos de P-gp es mayor en las ratas tratadas con BZL.



**Figura 24: Expresión y actividad de P-gp en la rata.** El tratamiento con BZL indujo un aumento en los niveles de expresión de P-gp en hígado (A) en yeyuno (E), en íleon (I) sin cambios en la expresión en riñón (J). La expresión proteica en los grupos controles se tomó como 100%. Tanto en hígado como en yeyuno, la localización de P-gp (fluorescencia verde) fue la esperada (B y F, respectivamente); los núcleos fueron teñidos con DAPI (fluorescencia azul). Estas alteraciones se vieron reflejadas en un aumento en la excreción biliar (C) e intestinal (yeyuno, G), sin cambios en la excreción renal (K) de Rho-123, sustrato modelo de P-gp.

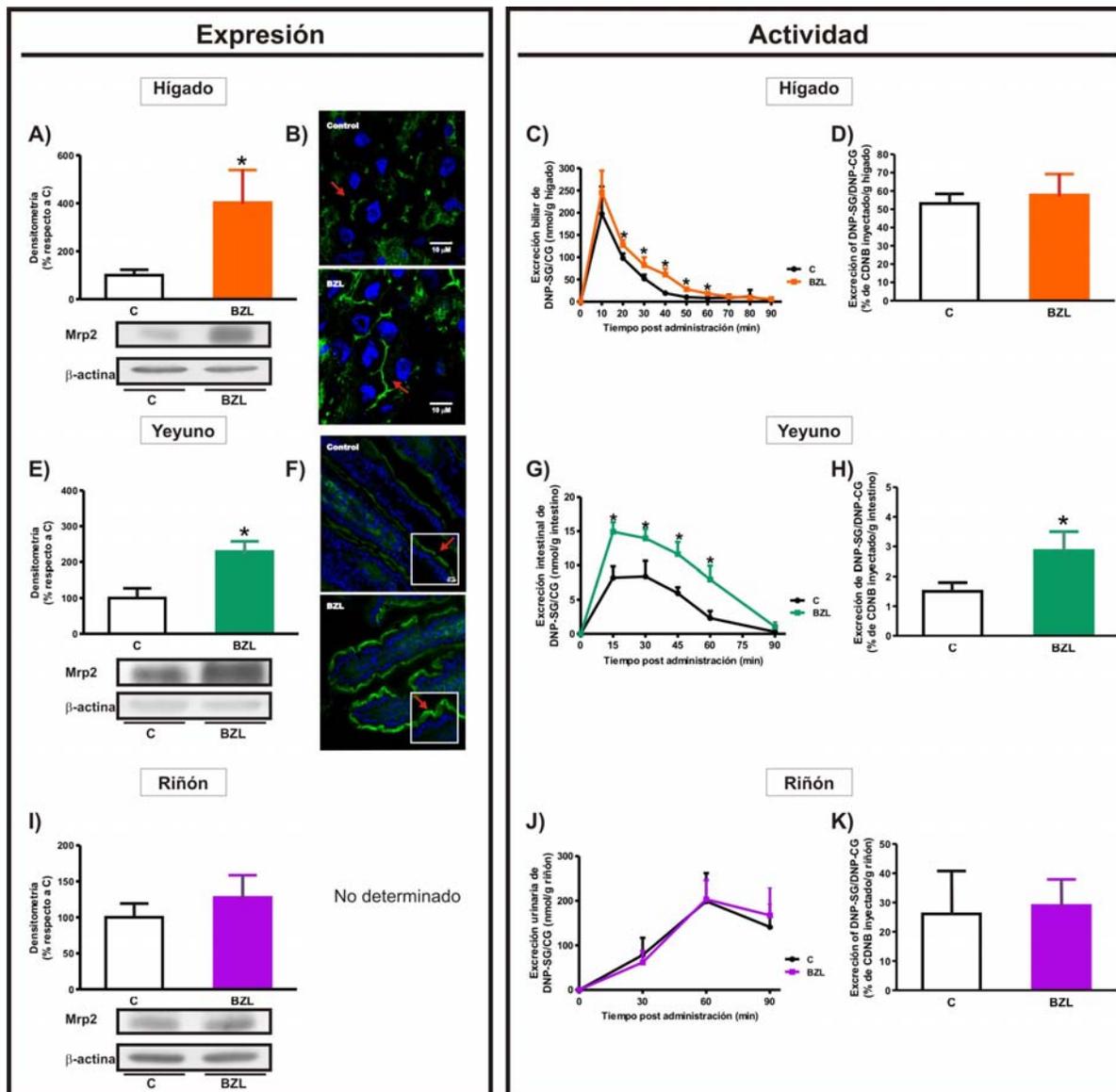
Se modificó además, el porcentaje de la dosis excretada por vía biliar (D) e intestinal (H), sin cambios en el porcentaje de la dosis excretada por vía urinaria (L). \*diferente de C,  $p < 0,05$ , (n=3-4).

En condiciones normales, las rutas biliares y urinarias son responsables de la excreción del ~5,6 % y ~12 % de Rho-123, respectivamente, con una menor contribución intestinal (~3,2 %). La contribución de las vías de excreción renal fue similar entre los animales tratados con BZL y controles (12 %), mientras que la excreción biliar e intestinal fueron mayores en ratas tratadas con BZL (10,5 % y 4,2 %, Fig. 24 D y H, respectivamente). Estos resultados sugieren una mayor excreción de sustratos de P-gp mediante la vía biliar en ratas bajo tratamiento con BZL.

Por otra parte, los niveles de expresión proteica de Mrp2 fueron significativamente inducidos por el tratamiento con BZL (100 mg/kg/día i.p., 3 días consecutivos, n=3) en hígado (300 %, Fig. 25 A) y en yeyuno (150 %, Fig. 25 E), sin alterarse los niveles de expresión en riñón (Fig. 25 I). En íleon, Mrp2 no pudo ser detectado.

El efecto de BZL sobre la expresión de Mrp2 en hígado e intestino también fue evaluado *in situ* por inmunomarcación fluorescente seguida de microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos anti-Mrp2. En hígado, Mrp2 se expresa principalmente en la membrana canalicular (Fig. 25 B, fluorescencia verde, flecha roja en la imagen). En las vellosidades intestinales, Mrp2 (fluorescencia verde) se expresa preferencialmente en la punta de las mismas y sus niveles de expresión disminuyen a medida que avanzamos hacia la cripta. En los enterocitos, Mrp2 se localiza en la zona apical (Fig. 25 F, flecha roja en la imagen). El tratamiento con BZL no alteró la localización normal del transportador.

Para evaluar si el aumento en la expresión Mrp2 podría tener consecuencias funcionales sobre su actividad, se determinó la velocidad de excreción de DNP-SG/CG (sustrato modelo de este transportador, resultante de la metabolización de CDNB) en un modelo de perfusión intestinal *in situ* de simple paso con recolección simultánea de bilis y orina (Fig. 25).

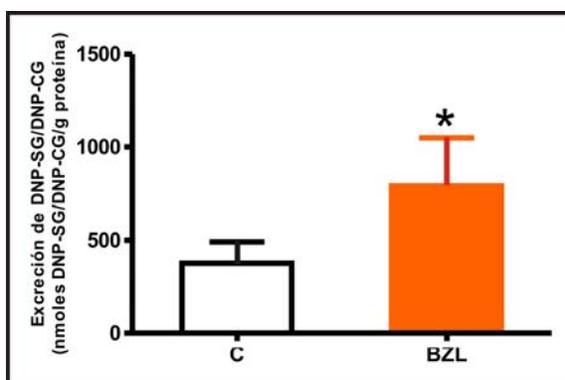


**Figura 25: Expresión y actividad de Mrp2 en rata.** El tratamiento con BZL (100 mg/kg/día, 3 días) indujo un aumento en los niveles de expresión de Mrp2 en hígado (3 veces respecto a C, **A**) y yeyuno (1,5 veces respecto a C, **E**), sin cambios en la expresión en riñón (**I**). Mrp2 no se detectó en íleon. La expresión proteica en los grupos controles se tomó como 100%. Tanto en hígado como en yeyuno, la localización de Mrp2 (fluorescencia verde) fue la esperada (**B** y **F**, respectivamente); los núcleos fueron teñidos con DAPI (fluorescencia azul). Estos aumentos se vieron reflejados en un aumento en la velocidad de excreción biliar e intestinal de DNP-SG/CG (**C** y **G**, respectivamente), sin cambios en la excreción renal de DNP-SG/CG (**J**). Estos cambios se tradujeron en un aumento en el porcentaje de excreción la dosis de CDNB administrada vía intestinal con respecto a (**H**), sin cambios en bilis ni orina (**D** y **K**, respectivamente). \*diferente de C,  $p < 0,05$ , (n=3-4).

Se observó que, a pesar del gran aumento observado en los niveles de expresión hepática de Mrp2 (Fig. 25 A), la excreción biliar de DNP-SG y su metabolito mayoritario (DNP-CG) fue ligeramente mayor en las ratas tratadas con BZL (49 %, Fig. 25 C). En yeyuno proximal, la velocidad de excreción de DNP-SG/CG (Fig. 25 G) en ratas tratadas con BZL se correlacionó con el aumento en los niveles de expresión de Mrp2 observados (Fig. 25 E). Como era esperado, no se observaron diferencias en la excreción renal de estos compuestos (Fig. 25 J).

La excreción de DNP-SG+DNP-CG fue también calculada como el porcentaje con respecto a la dosis de CDNB administrada. En condiciones normales, las rutas biliares y urinarias son responsables de la excreción del 50 y 10 % de los metabolitos de CDNB, respectivamente, con una menor contribución intestinal (<1%) (Gotoh y col., 2000). La contribución de las vías de excreción biliar y renal fue similar entre los animales tratados con BZL y controles (~58 % y ~29 %, Fig. 25 D y K, respectivamente), mientras que la excreción intestinal fue mayor en ratas tratadas con BZL (+ 35 %, Fig. 25 H). Estos resultados sugieren una mayor excreción de sustratos de Mrp2 mediante la vía intestinal en ratas bajo tratamiento con BZL.

Como el aumento en la actividad hepática de Mrp2 determinada *in vivo* no se corresponde con el aumento significativo detectado en los niveles proteicos (Fig. 25 B y A, respectivamente), se determinó la velocidad de excreción de DNP-SG, en el modelo de hepatocitos aislados (Fig. 26).



**Figura 26:** Excreción de DNP-SG en hepatocitos aislados. El tratamiento con BZL (100 mg/kg/día, 3 días) indujo un aumento en la velocidad de excreción hepática de DNP-SG; \*diferente de C,  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ .

El transporte de DNP-SG/DNP-CG al medio se vio significativamente incrementado por el pre-tratamiento con BZL (Fig. 26), en concordancia con la alta expresión proteica de Mrp2 detectada por *western blotting* (Fig. 25 A).

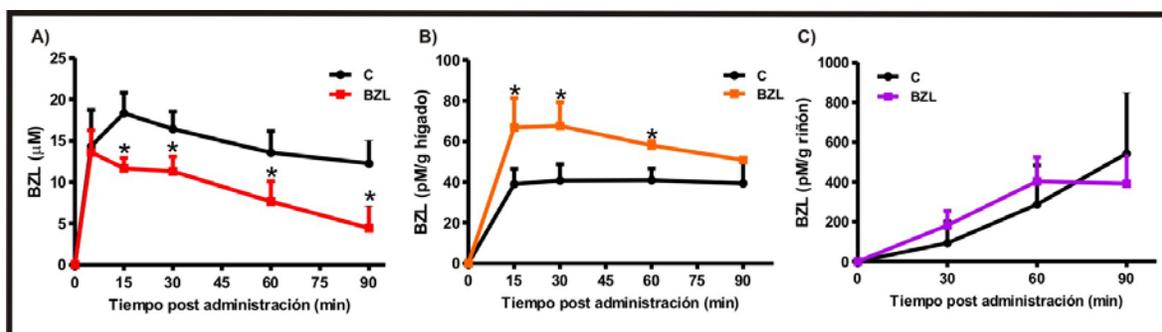
### 5.5. Efecto del pre-tratamiento con BZL sobre su propia biodisponibilidad.

En la Tabla 3 figuran los parámetros farmacocinéticos determinados en ratas controles y pretratadas con BZL para una dosis testigo de BZL. La constante de decaimiento plasmático de BZL ( $k$ ) fue mayor en ratas pre-tratadas con BZL comparadas con el grupo control (Fig. 17 A). Además, el área bajo la curva (AUC) fue menor en el grupo pre-tratado con BZL en comparación al grupo control (- 41 %). También puede observarse la cantidad de BZL eliminado en bilis y orina durante 90 min (Fig. 17 B y C, respectivamente). La cantidad de BZL excretada fue significativamente mayor en bilis de animales pre-tratados con BZL en comparación a los animales controles (+ 60 %). La cantidad de BZL excretada en orina fue similar entre ambos grupos experimentales.

	PARÁMETRO	C	BZL
PLASMA	$C_{\text{máx}}$ ( $\mu\text{M}$ )	18,8 $\pm$ 2,3	14,7 $\pm$ 1,6 *
	AUC (nmol min/ml)	80,0 $\pm$ 11,0	47,5 $\pm$ 1,2 *
	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	-0.0018 $\pm$ 0.0008	-0.0072 $\pm$ 0.0020 *
BILIS	Excreción acumulativa (pmol/g hígado)	152 $\pm$ 18	244 $\pm$ 23 *
	% dosis	0.64 $\pm$ 0.17	1.16 $\pm$ 0.10 *
ORINA	Excreción acumulativa (pmol/g riñón)	1178 $\pm$ 299	1016 $\pm$ 184
	% dosis	1.01 $\pm$ 0.67	1.55 $\pm$ 0.19

**TABLA 3: Parámetros farmacocinéticos de una dosis testigo de BZL.**  $C_{\text{máx}}$ : concentración plasmática máxima; AUC: área bajo la curva;  $k$ : velocidad de eliminación. Cada valor representa la media  $\pm$  SD. \*significativamente diferente de C,  $p < 0.05$ ,  $n = 4-5$ .

En todos los casos, los valores obtenidos en el grupo pre-tratado con BZL fue relativizado a un tercer grupo experimental pre-tratado con BZL (100 mg/Kg/día, 3 días) pero sin el agregado de la dosis testigo de BZL (5 mg de BZL/Kg peso corporal), en el cual se determinaron los mismos parámetros farmacocinéticos.



**Figura 17: Farmacocinética de una dosis testigo de BZL.** El pre-tratamiento con BZL (100 mg/kg/día, 3 días) indujo un aumento en la constante de decaimiento plasmático de una dosis testigo de BZL (5 mg/kg, intraduodenal), en comparación al grupo control, que se vio reflejado en una menor área bajo la curva (A). La velocidad de eliminación biliar de BZL y la cantidad de BZL excretada fueron significativamente mayor en los animales pre-tratados con BZL en comparación al grupo control (B). En orina, la cantidad de BZL excretada fue similar entre ambos grupos experimentales. \*diferente de C,  $p < 0,05$ , (n=4).

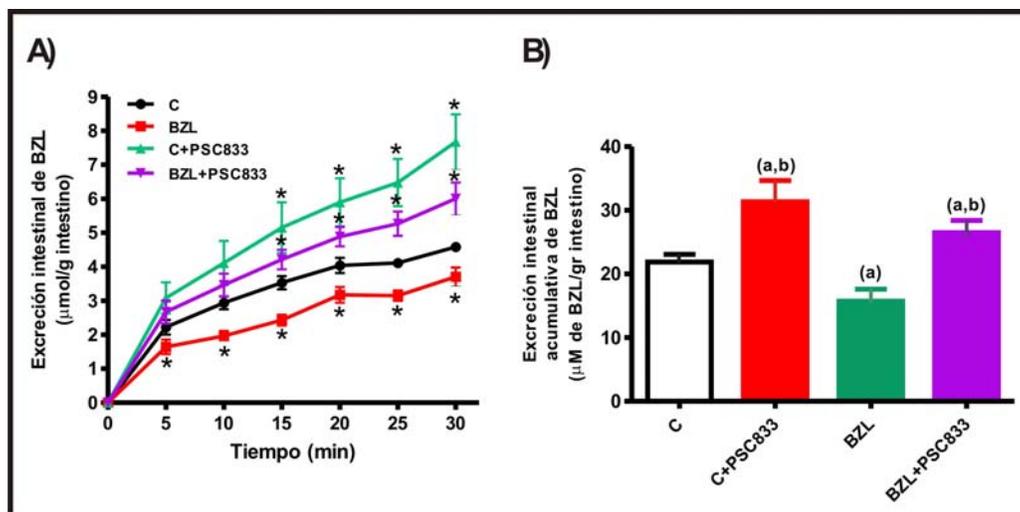
### 5.5.1. Efectos del pre-tratamiento con BZL sobre su propia absorción intestinal.

Ha sido reportado que P-gp, no así Mrp2, mediaría al menos en parte el eflujo de BZL en células HepG2, derivadas de un hepatoma humano (Rigalli y col., 2012).

Para evaluar si la inducción de P-gp a nivel intestinal podría afectar la absorción de BZL, se utilizó el modelo de sacos intestinales. La velocidad de absorción de BZL fue estimada en saquitos intestinales de yeyuno (donde observamos una mayor inducción de Mrp2 y P-gp por BZL) en presencia o ausencia de PSC833, inhibidor específico de P-gp.

Como puede observarse en la figura 18 (A), la velocidad de transporte de BZL desde el lado mucoso al lado seroso fue menor en el grupo pre-tratado con BZL, que en el grupo control, a lo largo de todo el experimento; efecto que se revirtió con el tratamiento con PSC833. Después de 30 minutos de incubación, se

observó además una menor absorción acumulativa de BZL en ratas pre-tratadas en comparación al grupo control ( $16.0 \pm 1.9$  y  $22.0 \pm 1.2$   $\mu\text{mol BZL/g}$  intestino, respectivamente, Fig. 28 B). PSC833 fue capaz de aumentar la captación intestinal en ambos grupos experimentales (C+PSC833:  $26.5 \pm 4.7$  y BZL+PSC833:  $28.5 \pm 4.4$   $\mu\text{mol BZL/g}$  intestino, respectivamente, Fig. 28 B).



**Figura 28:** *Excreción de BZL en saquitos aislados no-evertidos.* Los perfiles de absorción de BZL desde el lado mucoso al seroso fueron menores en el grupo pre-tratado con BZL (A). Después de 30 minutos de incubación, se observó además una menor absorción acumulativa de BZL en yeyuno de ratas pre-tratadas con BZL en comparación al grupo control (B). \*diferente de C,  $p < 0.05$ , (n=6).

## ***VI. Discusión***

## 6. DISCUSIÓN:

Los xenobióticos, son compuestos de naturaleza química muy variada, que se encuentran en el medio ambiente de forma natural o surgen como resultado de la actividad humana. Los organismos vivos se encuentran constantemente expuestos a una gran variedad de estos compuestos, que al ingresar al organismo, se distribuyen en los distintos compartimientos pudiendo ser metabolizados y/o acumulados (Kovacic y Somanathan, 2009; Bhattacharya y Keating, 2011; Lima y col., 2011). Estos compuestos son generalmente apolares y lipofílicos, característica que les permite atravesar con facilidad las membranas biológicas, imposibilitando su excreción por orina o heces y acumulándose en tejidos grasos. Sin embargo, también pueden sufrir procesos de biotransformación generando metabolitos más hidrosolubles, que facilitan su eliminación. La biotransformación es definida entonces como la suma de todas las reacciones químicas que alteran la estructura, solubilidad en agua y eventual distribución de endo- y xenobióticos. Además, la magnitud de acumulación de una droga en un determinado tejido es frecuentemente limitada no tanto por su habilidad para entrar a la célula sino por su tendencia a dejarla. Esto está relacionado con los mecanismos de eflujo presentes en la membrana celular que juegan un rol crítico en limitar la absorción y acumulación de sustancias potencialmente tóxicas o de uso terapéutico, y que pueden conferir resistencia a esos compuestos (Borst y col., 2006).

Si bien los sistemas de biotransformación y transportadores ABC se expresan diferencialmente en distintos tipos celulares, esta expresión no es estática ya que las células tienen una remarcable capacidad para regular la cantidad de estas proteínas tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. El tratamiento con determinados compuestos es capaz de alterar la expresión y actividad de los mismos en distintos tejidos y con ello modificar su propia farmacocinética y biodisponibilidad como así también la de drogas co-administradas que sean también sus sustratos (Greiner y col., 1999; Fromm y col., 2000; Zhou y col., 2007).

Se sabe que algunas drogas con propiedades antiparasitarias regulan la expresión de enzimas de biotransformación y transportadores con un importante impacto sobre la biodisponibilidad de otras drogas (Ashton y col., 1998; Bapiro y col., 2002; Burk y col., 2005). Hasta el momento no se han realizados estudios para evaluar los efectos de BZL sobre las enzimas de biotransformación y proteínas transportadoras que pudieran afectar su biodisponibilidad o la de fármacos co-administrados (por ej. diuréticos, antibióticos, antirretrovirales, inmunosupresores, entre otros).

Como antecedente, nuestro grupo de investigación, describió un incremento de los niveles proteicos de CYP3A4, P-gp, MRP2 y GST $\pi$  con la concomitante estimulación de su actividad (excepto para CYP3A4) en células HepG2, una línea celular derivada de hepatoma humano, tratadas con BZL (200  $\mu$ M, 48 hs) (Rigalli y col., 2012). En el presente trabajo de Tesis se evaluaron los efectos del pre-tratamiento con BZL sobre la expresión y actividad de enzimas de biotransformación de fase I y fase II y transportadores de eflujo ABC en hígado, intestino y riñón de rata y sus consecuencias farmacocinéticas.

Los resultados mostraron que el tratamiento con BZL incrementa el flujo biliar, sin alterar la velocidad de excreción biliar de glutatión total ni GSSG, determinantes mayoritarios del flujo biliar independiente de sales biliares; sugiriendo que el incremento observado en el flujo biliar podría deberse a la excreción biliar de metabolitos de BZL vía Mrp2 y/o P-gp.

Las pruebas de laboratorio en pacientes muestran valores de bilirrubina sérica normales, con raros casos de transaminasas elevadas principalmente en los primeros 15 días de tratamiento (Sosa-Estani y col., 1998). En nuestras condiciones experimentales, las ratas tratadas con BZL presentan un leve aumento en los niveles de GPT sin alteraciones en la excreción biliar de bilirrubina, ni de niveles séricos de otras enzimas utilizadas como marcadores de daño hepático (LDH, FA, GOT). Resultados similares fueron observados recientemente por Pinazo y col. (2012) en pacientes tratados con BZL durante 60 días, mostrando que BZL es capaz de producir alteraciones moderadas de la

función hepática, determinada a través del análisis de niveles séricos de transaminasas.

En células de mamífero el grupo nitro del BZL es reducido a un grupo amino por una nitro-reductasa tipo II, con la formación de varios radicales libres intermediarios y metabolitos electrofílicos. Sin embargo, al presente, poco se sabe sobre los efectos moduladores del BZL sobre la expresión y/o actividad de los sistemas de biotransformación. En cuanto a la fase I, la subfamilia CYP3A tiene una gran influencia sobre la biodisponibilidad de drogas en humanos, donde el 40-50% del metabolismo de todas las drogas involucra algún grado de oxidación mediado por CYP3A (Guengerich, 1995). Algunos fármacos que han mostrado ser metabolizados por CYP3A son: midazolam (hipnótico), ciclosporina A (inmunosupresor), clotrimazol (antimicótico), diazepam (ligando del receptor de benzodiazepinas), eritromicina (antibiótico) y lidocaína (anestésico local) entre otros (Zhou y col., 2007). Los resultados de este trabajo de Tesis muestran que el tratamiento con BZL produjo un aumento en la expresión proteica de la familia de CYP3A en hígado y, contrariamente a lo esperado, un aumento en la actividad de la isoforma CYP3A4. Trabajos previos habían demostrado que el tiempo de sueño inducido por pentobarbital era más prolongado después de una administración aguda de BZL a ratas (30 mg/kg de peso corporal i.p.). Este efecto fue asociado con una inhibición de los sistemas hepáticos microsomales de aminopirina- y etilmorfina-N-desmetilasas por interacción covalente con los derivados electrofílicos del BZL (inhibición no competitiva) (Masana y col., 1985). Adicionalmente, Workman y col. (1986) observaron que concentraciones farmacológicas de BZL (120  $\mu$ M) fueron capaces de inhibir la hidroxilación de lomustina por CYP en hígado de ratón. Estos autores postularon que este efecto del BZL podría explicar las modificaciones en la farmacocinética de la lomustina y la respuesta aumentada a esta droga observadas en los ratones con fibrosarcoma. Por otro lado, en un trabajo previo observamos que BZL (200  $\mu$ M, 48 h) producía un aumento en la expresión de CYP3A4 pero una disminución de su actividad en células HepG2 (Rigalli y col., 2012). Los resultados de este trabajo de Tesis muestran un modesto incremento en la expresión global de la familia CYP3A

acompañado de un aumento en la actividad de uno de sus miembros (CYP3A4). La contradicción entre los resultados descritos podría deberse a diferencias en los protocolos experimentales y/o a diferencias especie-específicas en respuesta al BZL. Como el hígado es el órgano cuantitativamente más importante en el proceso de biotransformación, los resultados sugieren que el metabolismo de otras drogas co-administradas y del propio BZL podría verse afectado por el tratamiento con BZL. No se observaron alteraciones en los niveles de expresión de los miembros de CYP3A por BZL en intestino ni riñón.

En cuanto al metabolismo de fase II, la expresión de UGT1A no se vio alterada por BZL en los tejidos analizados, indicando que esta etapa no es afectada, al menos para las isoformas analizadas que representan las isoenzimas más relevantes involucradas en la glucuronización de derivados fenólicos como acetaminofeno y compuestos endógenos como la bilirrubina (Ikushiro y col., 1995).

Es sabido que los metabolitos electrofílicos son metabolizados y excretados por procesos dependientes de glutatión que reducen su toxicidad. La reacción de conjugación es generalmente catalizada por GSTs, una familia de enzimas de detoxificación que protege a las macromoléculas celulares del ataque por compuestos electrofílicos reactivos (Hayes y Pulford, 1995). En el parásito, BZL es metabolizado por una nitro-reductasa tipo I NADH-dependiente produciendo glioxal (un agente citotóxico y mutagénico) (Hall y Wilkinson, 2012). En mamíferos, el grupo nitro es reducido a un grupo amino por una nitro-reductasa tipo II, con la formación de radicales libres intermediarios y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Aguilar y col., 1985; Maya y col., 2007; Hall y Wilkinson, 2012). Los mecanismos de defensa del *T. cruzi* contra el estrés oxidativo son deficientes (Krauth-Siegel y col., 2003; Turrens, 2004). En contraste, las células de los mamíferos cuentan con sistemas capaces de contrarrestar el desafío provocado por los radicales libres (mecanismos enzimáticos: GSTs, superóxido dismutasa, glutatión reductasa, etc. y mecanismos no enzimáticos: alfa-tocoferol, ascorbato, beta-carotenos y glutatión reducido) (Gutteridge y Halliwell, 2000). En los protocolos terapéuticos, BZL es administrado vía oral. Es posible que la inducción de la expresión y actividad de GST $\mu$  en hígado y GST $\alpha$  en intestino (yeyuno e

íleon) por BZL observada en nuestro trabajo pudiera representar un mecanismo compensatorio pre-sistémico para hacer frente a la sobre-producción de metabolitos electrofílicos en el sitio de entrada de la droga al organismo. Debe considerarse además, que muchos compuestos endógenos (O-quinolonas de catecolaminas y dopamina, prostaglandinas y productos de peroxidación lipídica, entre otros) y exógenos como agentes anti-carcinogénicos (melfalán), diuréticos (ácido etacrínico), plaguicidas (acroleína), y esteroides, son sustratos de las enzimas GSTs estudiadas (GST $\alpha$ , GST $\alpha$  y GST $\pi$ ) (Towsend y Tew, 2003), por lo tanto alteraciones en su expresión y actividad podrían tener repercusiones sobre el metabolismo de endo- y xenobióticos, dando lugar a resistencia a quimioterapéuticos o a variaciones en la velocidad de metabolización de compuestos tóxicos para el organismo.

Además de los sistemas de biotransformación, el incremento en la depuración de endo- y xenobióticos puede asociarse frecuentemente a altos niveles de expresión de proteínas transportadoras de eflujo, como P-gp y/o MRPs (Greiner y col., 1999; Fromm y col., 2000). Estos transportadores se expresan naturalmente en epitelio secretores, teniendo como función en el hígado y el riñón la de intervenir activamente en la excreción de drogas, mientras que en el intestino participan activamente en la excreción de drogas a la luz intestinal o limitan su absorción. Así, resultó de interés evaluar el efecto de BZL sobre la expresión y actividad de P-gp y Mrp2, en órganos involucrados en la absorción y excreción de distintos fármacos, que pudieran administrarse simultáneamente con BZL durante la quimioterapia de la enfermedad. Observamos, entonces, que el tratamiento de ratas Wistar macho adultas con BZL (100 mg/kg/día i.p. por 3 días consecutivos) indujo un aumento en los niveles de expresión de ambos transportadores en hígado y yeyuno, de P-gp en íleon, y no mostró alteraciones en los niveles de expresión en riñón. Estos resultados nos sugieren que la inducción de P-gp y Mrp2 en hígado, podría alterar la capacidad de excreción biliar de diversos compuestos y llevar a interacciones droga-droga a nivel hepático. Por otra parte, la inducción de P-gp a nivel intestinal podría tener implicancias en la absorción del BZL, que se administra terapéuticamente por vía oral o de otras drogas sustratos del

transportador. Como es sabido, P-gp es uno de los principales transportadores ABC expresados en intestino y representa una importante barrera contra la absorción de xenobióticos. Por consiguiente, su eventual inducción produciría una disminución de la biodisponibilidad de ciertos fármacos y en consecuencia, de su efectividad. Por otra parte, el aumento en la expresión de Mrp2 en intestino podría modificar el tiempo de permanencia en el interior celular y la excreción intestinal, de derivados resultantes de la metabolización del BZL y otras drogas.

Para evaluar si la inducción observada de estos transportadores tenía consecuencias funcionales, se utilizó un modelo *in vivo*, y demostramos un incremento en la actividad de transporte de P-gp en hígado utilizando el sustrato modelo Rho-123, en un todo de acuerdo con el aumento en la expresión del transportador. Es sabido que Rho-123 es también sustrato del transportador Bcrp (del inglés: *breast cancer resistance protein*) (Alqawi y col., 2004), sin embargo, la influencia de este transportador en la excreción biliar aumentada del fluoróforo no parece ser importante ya que no se detectaron cambios en su expresión proteica (ver resultados preliminares).

Con respecto a Mrp2, el aumento en su expresión es usualmente acompañada por un incremento en la excreción de sus sustratos. Sin embargo, el moderado incremento en la excreción biliar de DNP-SG+DNP-CG observado en ratas tratadas con respecto a las controles, no se correlaciona con el gran aumento observado en el contenido proteico de Mrp2 en hígado. Esto puede deberse a: la síntesis de proteína no funcional (por ej. Mrp2 no localizada en la membrana canalicular), a la presencia de otros compuestos que compitan en la excreción mediada por Mrp2 (por ej. metabolitos de BZL capaces de inhibir la actividad de Mrp2) o a concentraciones no saturantes de CDNB (la concentración utilizada en el modelo *in vivo* es saturante a nivel intestinal, pero puede no serlo a nivel hepático). Por otro lado, la velocidad de excreción biliar de sustratos endógenos de Mrp2 (bilirrubina, GSH y GSSG) no fue diferente entre grupos. Para clarificar esta cuestión, decidimos usar otra estrategia para evaluar la actividad intrínseca de Mrp2, utilizando el modelo de hepatocitos aislados. En el proceso de aislamiento, los hepatocitos se lavan de compuestos intracelulares (bilirrubina,

sales biliares, glutatión e incluso, los derivados de BZL) que podrían competir con DNP-SG por la secreción. En este modelo encontramos un mayor incremento en la actividad de Mrp2 que se corresponde con el aumento en los niveles proteicos. Estos resultados sugieren que los obtenidos *in vivo* pueden resultar, al menos en parte, de la competición entre DNP-SG y otros potenciales sustratos de Mrp2.

En conjunto, la sobre-expresión de estas proteínas (P-gp y Mrp2) en hígado podría resultar en una excreción biliar acelerada de drogas que son sus sustratos, afectando entonces su efectividad y/o su toxicidad.

Es conocido que los niveles de P-gp y Mrp2 varían inversamente a lo largo del intestino (Mottino y col., 2001; Doherty y Charman, 2002). Mrp2 se expresa mayoritariamente en el intestino proximal, mientras que la expresión de P-gp es mayoritariamente distal (Ayrton y Morgan, 2001). En nuestro caso, la mayor inducción de ambos transportadores se produjo en el segmento proximal del intestino delgado (yeyuno proximal). Cuando se testeó la velocidad de excreción intestinal de Rho-123 en el modelo *in vivo*, particularmente en el yeyuno, observamos un aumento significativo en las ratas tratadas con BZL en comparación con las ratas controles. Nuevamente, los niveles de Bcrp no mostraron variaciones entre grupos. Cuando la actividad *in vivo* de Mrp2 intestinal fue medida, una mayor excreción de DNP-SG+DNP-CG fue detectada en ratas tratadas con BZL en comparación con las controles, consistente con la sobre-expresión de la proteína por acción del fármaco. Consecuentemente, el sustancial incremento en los niveles de expresión y actividad de P-gp y Mrp2 en el intestino proximal puede llevar a un incremento en la secreción de sustancias que estén presentes en la sangre o a una reducción de la absorción de drogas que son oralmente administradas, como el propio BZL.

En resumen, existe un incremento en la expresión de P-gp y Mrp2 en hígado e intestino proximal en ratas tratadas con BZL. Estos resultados sugieren que, bajo tratamiento con BZL, interacciones droga-droga podrían ser observadas especialmente a nivel de la excreción/absorción, afectando las vías de eliminación de compuestos endógenos y exógenos.

Al presente, se desconoce si podría existir una inducción de sistemas de biotransformación y transportadores en pacientes tratados con BZL. La dosis usual utilizada para el tratamiento con BZL durante la enfermedad de Chagas varía entre 5 y 10 mg/kg peso corporal, administrada durante 30-60 días o por más de 5 meses en casos de reactivación de la enfermedad (Coura y de-Castro, 2002). En nuestros estudios, se utilizó una dosis de 100 mg/kg/día durante 3 días consecutivos que mostró un efecto inductor sobre varios sistemas. La concentración plasmática de BZL medida 24 hs posteriores a la última inyección en ratas fue de 15  $\mu\text{M}$ , la cual es similar a la encontrada en pacientes (13-26  $\mu\text{M}$ ) 24 hs posteriores a la última dosis después de 30 días de tratamiento (Raaflaub, 1980). En general, los roedores necesitan mayores dosis de un compuesto dado para reproducir los mismos efectos que en humanos. Entonces, el efector inductor de BZL en pacientes no debería ser descartado, dado que el tiempo de tratamiento es más extenso que en nuestro modelo experimental. Las interacciones droga-droga podrían ser particularmente importantes en pacientes bajo tratamiento de inmunosupresión con ciclosporina A, corticoesteroides y azatioprina para trasplantes de corazón o riñón (Bacal y col., 2010; Silva y col., 2010), o en pacientes VIH positivos infectados con *T. cruzi* que reciben antiretrovirales (DiazGranados y col., 2009; Almeida y col., 2011).

Por otra parte, la inducción de P-gp a nivel intestinal podría tener implicancias en la absorción del BZL, que se administra terapéuticamente por vía oral o de otras drogas sustratos del transportador. Hasta el momento, no existe evidencia directa basada en estudios clínicos que sea capaz de sustentar esta presunción. Sin embargo, y a favor de esta hipótesis, Raaflaub (1980) observó que la concentración plasmática máxima en pacientes hombres que recibieron BZL (7 mg/kg/día durante 30 días, dos veces al día) tiende a disminuir durante el tratamiento (-20 % después de 25 días), sugiriendo un incremento en el metabolismo y/o excreción de BZL. Es por esto que decidimos estudiar si las alteraciones en las proteínas transportadoras observadas podrían tener algún efecto sobre la biodisponibilidad de una dosis testigo de BZL (5 mg/kg). Los parámetros farmacocinéticos de la dosis testigo de BZL calculados mostraron un

aumento en la constante de eliminación plasmática ( $k$ ) y una menor AUC plasmática en el grupo pre-tratado con BZL (100 mg/kg/día) en comparación al grupo control, indicando un aumento en la depuración plasmática. Además, la  $C_{m\acute{a}x}$  de BZL en plasma fue menor en los animales pretratados con BZL, sugiriendo una menor absorción intestinal de BZL.

Cuando evaluamos la cantidad de BZL excretada por la vía biliar observamos un aumento significativo en animales pre-tratados con BZL en comparación a los animales controles. La cantidad de BZL excretada en orina fue similar entre ambos grupos experimentales, sugiriendo que el aumento en la depuración plasmática podría deberse, al menos en parte, al aumento observado a nivel biliar (debido a la inducción de P-gp).

Al observar además una disminución en la concentración plasmática máxima alcanzada por administración de la dosis testigo de BZL en animales pre-tratados con BZL en comparación al grupo control, decidimos evaluar si la capacidad de absorción intestinal podría estar afectada. Para este fin, estudiamos el transporte intestinal mucoso-seroso de BZL utilizando la técnica de sacos intestinales, en presencia o ausencia de PSC833 (inhibidor específico de la actividad de P-gp). Los resultados obtenidos (27 % menos transporte de BZL en el sentido luminal-seroso) confirmaron nuestra hipótesis. La inhibición de dicho efecto por acción de PSC833 confirma la participación de P-gp en el transporte de BZL. La participación de P-gp en el eflujo de BZL fue previamente observada en células HepG2 (Rigalli y col., 2012). La información obtenida durante esta Tesis sugiere la posibilidad de una disminución progresiva en la absorción de BZL y/o incremento en la metabolización/eliminación después de su administración terapéutica.

Durante el tratamiento con BZL pueden presentarse severos efectos adversos como dermatitis, intolerancia digestiva, polineuritis, dolor de cabeza, fatiga, etc. que pueden llevar a suspender la administración de la droga. El más común (con presentación en el 20-25% de los pacientes) es la dermatitis que aparece dentro de la primera semana de tratamiento y que generalmente tiene remisión espontánea (Viotti y col., 2009). Se ha postulado que la aparición de

reacciones adversas puede estar relacionada con elevados niveles plasmáticos de BZL (Raaflaub, 1980). Según mencionáramos anteriormente, pacientes que recibieron BZL durante 30 días mostraron concentraciones plasmáticas de BZL con una tendencia a disminuir en función del tiempo de tratamiento. Si la remisión de los efectos adversos con el transcurso del tratamiento está asociada al decaimiento en los niveles plasmáticos de BZL no se conoce hasta el presente.

El hecho de que el pre-tratamiento con BZL no haya producido alteraciones en la expresión de CYP3A, GST, P-gp y Mrp2 en riñón es desconocido, poniéndose en evidencia un efecto órgano-específico. El receptor de pregnanos X (PXR) es un receptor nuclear que regula la expresión de enzimas de biotransformación de Fase I y Fase II así como transportadores de xenobióticos (Kliewer y col., 2002; Klaassen y Aleksunes, 2010). PXR se expresa ampliamente en hígado y en intestino delgado de humano, rata, ratón y conejo. Interesantemente, estos son tejidos donde los sistemas de biotransformación y transportadores se encuentran ampliamente expresados y se inducen por BZL. En riñón se detectaron menores niveles de PXR (Kliewer y col., 2002). En células HepG2 donde se silenció el gen de PXR no se observó inducción de CYP3A4, GST $\pi$ , P-gp y MRP2 al ser expuestas a BZL sugiriendo que este receptor nuclear estaría involucrado en los efectos observados (Rigalli y col., 2012). Postulamos entonces que la inducción diferencial de los sistemas estudiados en hígado e intestino en comparación a la ausencia de efectos observados en riñón podría estar relacionada a diferencias tejido-específicas en la expresión de PXR y/o otros factores de transcripción. Futuros experimentos serán necesarios para dilucidar los mecanismos que median los efectos de BZL sobre estos sistemas (por ejemplo, regulación transcripcional o no-transcripcional, participación de receptores nucleares, etc.).

Desafortunadamente, no existe información en la literatura con respecto a la afectación de los sistemas de biotransformación y transporte durante la infección con *T. cruzi*. Sin embargo, la enfermedad de Chagas se caracteriza por ser un proceso inflamatorio similar a una enfermedad autoinmune. Es sabido que en un proceso inflamatorio se liberan diferentes citoquinas y que algunas de ellas (TNF-

$\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, etc.) en general disminuyen la expresión de sistemas de biotransformación y transporte (Monshouwer y col., 1996; Strasser y col., 1998; Trauner y col., 1999; Sukhai y col., 2001; Dietrich y col., 2004; Fernández y col., 2004; Renton, 2005). Entonces, no puede descartarse que durante la infección con *T. cruzi* existan cambios en la expresión y actividad de sistemas de biotransformación y proteínas transportadoras mediados por estas citoquinas. Estudios adicionales son necesarios para responder esta cuestión y evaluar si el BZL podría adicionalmente resultar beneficioso al inducir estos sistemas.

En conclusión, el incremento de la expresión y actividad de P-gp y Mrp2 en hígado y yeyuno proximal junto con el aumento en la expresión y actividad de CYP3A4 en hígado, y GST hepática e intestinal, debidas al pre-tratamiento con BZL, podrían dar lugar a la aparición de interacciones droga-droga con otros fármacos que pudieran ser co-administrados durante el tratamiento, así como afectar el metabolismo y excreción de BZL y sus metabolitos.

## ***VII. Conclusiones***

## 7. CONCLUSIONES:

En el presente trabajo de tesis observamos que el tratamiento con BZL incrementa el flujo biliar, sin alterar la velocidad de excreción biliar de glutathion total ni GSSG, determinantes mayoritarios del flujo biliar independiente de sales biliares; indicando que el incremento observado en el flujo biliar podría deberse a la excreción biliar de metabolitos de BZL vía Mrp2 y/o P-gp.

Además, el incremento de la expresión y actividad de P-gp y Mrp2 en hígado y yeyuno proximal junto con el aumento en la expresión y actividad de CYP3A4 en hígado, y GST hepática e intestinal, debidas al pre-tratamiento con BZL, podrían dar lugar a la aparición de interacciones droga-droga con otros fármacos que pudieran ser co-administrados durante el tratamiento, debido principalmente a la afectación de sistemas involucrados en la depuración de compuestos endógenos y exógenos, incluyendo el propio BZL y sus metabolitos.

Por otra parte, el hecho de que pre-tratamiento con BZL no haya producido alteraciones en la expresión de CYP3A, GST, P-gp y Mrp2 en riñón es desconocida, poniéndose en evidencia un efecto órgano-específico. PXR es un receptor nuclear que regula la expresión de enzimas de biotransformación de Fase I y Fase II así como transportadores de xenobióticos que se expresa ampliamente en hígado y en intestino delgado, y en menor medida en riñón. Además, en resultados previos de nuestro grupo de investigación observamos que células HepG2 donde se silenció el gen de PXR no mostraron inducción de CYP3A4, GST $\pi$ , P-gp y MRP2 al ser expuestas a BZL, indicando que este receptor nuclear está involucrado en los efectos observados. Postulamos entonces que la inducción diferencial de los sistemas estudiados en hígado e intestino en comparación a la carencia de efectos observados en riñón podría estar relacionada a diferencias tejido-específicas en la expresión de PXR y/o otros factores de transcripción. Futuros experimentos serán necesarios para dilucidar los mecanismos moleculares que median los efectos de BZL sobre estos sistemas.

Por último, los parámetros farmacocinéticos de la dosis testigo de BZL calculados mostraron un aumento en la constante de eliminación plasmática ( $k_e$ ) y

una menor AUC plasmática en el grupo pretratado con BZL en comparación al grupo control, indicando un aumento en la depuración plasmática. Además, la  $C_{m\acute{a}x}$  de BZL en plasma fue menor en los animales pre-tratados con BZL, sugiriendo una menor absorción intestinal de BZL. Cuando evaluamos la cantidad de BZL excretada por la vía biliar observamos un aumento significativo en este parámetro en animales pre-tratados con BZL en comparación a los animales controles. La cantidad de BZL excretada en orina fue similar entre ambos grupos experimentales, por lo que el aumento en la depuración plasmática podría deberse, al menos en parte, al aumento en la excreción a nivel biliar.

Al observar además una disminución en la concentración plasmática máxima alcanzada por administración de la dosis testigo de BZL en animales pre-tratados con BZL en comparación con el grupo control, decidimos evaluar si la capacidad de absorción intestinal podría estar afectada. Observamos entonces, disminución en el transporte de BZL en el sentido luminal-seroso, confirmando nuestra hipótesis. La inhibición de dicho efecto por acción de PSC833 confirma la participación de P-gp en el transporte de BZL. Un efecto similar fue observado previamente en células HepG2 con silenciamiento de la expresión de P-gp. La información obtenida durante esta Tesis sugiere la posibilidad de una disminución progresiva en la absorción de BZL y/o incremento en la metabolización/eliminación durante su administración terapéutica.

Podemos concluir que el tratamiento con BZL es capaz de inducir la expresión y actividad de sistemas de biotransformación y proteínas de eflujo en hígado e intestino, pudiendo alterar el metabolismo y excreción, y/o modificar la farmacocinética del propio BZL y/o de drogas co-administradas.

## ***VIII. Bibliografía***

**8. BIBLIOGRAFÍA:**

1. Acevedo, M.L.; Graus, W.L. (2004) Transcriptional activation by nuclear receptors. *Essays Biochem* 40, 73-88.
2. Aguilar, E.G.; de Arranz, C.K.; de Toranzo, E.G.; Castro, J.A. (1985) Benznidazole and nifurtimox nitroreductase activity in liver microsomes from male rats preinduced with Phenobarbital or 3-methylcholanthrene. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 50: 443-446.
3. Akita, H.; Suzuki, H.; Ito, K.; Kinoshita, S.; Sato, N.; Takikawa, H.; Sugiyama, Y. (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511, 7-16.
4. Almeida, E.A.; Novaes-Ramos Júnior, A.; Correia, D.; Shikanai-Yasuda, M.A. (2011) *Rev Soc Bras Med Trop* 44, 762-770.
5. Alqawi, O.; Bates, S.; Georges, E. (2004) Arginine482 to threonine mutation in the breast cancer resistance protein ABCG2 inhibits rhodamine 123 transport while increasing binding. *Biochem J* 382: 711-716.
6. Amin, M.L. (2013) P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* 7, 27–34.
7. Andrade ZA. (1999) Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 71-80.
8. Armstrong, R.N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10, 2-18.
9. Ashton, M.; Hai, T.N.; Sy, N.D.; Huong, D.X.; Huong, N.V.; Niêu, N.T.; Công, L.D. (1998) Artemisinin pharmacokinetics is time-dependent during repeated oral administration in healthy male adults. *Drug Metab Dispos* 26, 25–27.
10. Ayrton, A.; Morgan, P. (2001) Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 31, 469-497.

11. Bacal, F.; Silva, C.P.; Pires, P.V.; Mangini, S.; Fiorelli, A.I.; Stolf, N.G.; Bocchi, E.A. (2010) Transplantation for Chagas disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades Chagas. *Clin Transplant* 24, E29-E34.
12. Ballatori, N.; Truong, A.T. (1989) Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am J Physiol* 256, G22-G30.
13. Ballatori, N.; Truong, A.T. (1992) Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol* 263, G617-G624.
14. Ballatori, N.; Rebeor, JF. (2005) Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 238-255.
15. Ballatori, N.; Krance, S.M.; Notenbonn, S.; Shi, S.; Tieu, K.; Hammond, C.L. (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390, 191-214.
16. Bapiro, T.E.; Andersson, T.B.; Otter, C.; Hasler, J.A.; Masimirembwa, C.M. (2002) Cytochrome P450 1A1/2 induction by antiparasitic drugs: dose-dependent increase in ethoxyresorufin O-deethylase activity and mRNA caused by quinine, primaquine and albendazole in HepG2 cells. *Eur J Clin Pharmacol* 58, 537-542.
17. Benet, L.Z. (2009) The drug transporter-metabolism alliance: uncovering and defining the interplay. *Mol Pharmacol* 6, 1631-1643.
18. Bhattacharya, P.; Keating, AF. (2011) Ovarian metabolism of xenobiotics. *Exp Biol Med (Maywood)* 236, 765-771.
19. Board, P.G.; Menon, D. (2013) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3267-3288.
20. Bock, K.W. (2010) Functions and transcriptional regulation of adult human hepatic UDP-glucuronosyl-transferases (UGTs): Mechanisms responsible for interindividual variation of UGT levels. *Biochemical Pharmacology* 80, 771-777.

21. BockHennig, B.; Kohle, C.; Nill, K.; Bock, K. (2002) Influence of t-butylhydroquinone and beta-naphthoflavone on formation and transport of 4-methylumbelliferone glucuronide in Caco-2/TC-7 cell monolayers. *Biochem Pharmacol* 63, 123-128.
22. Borst, P.; Zelcer, N.; van de Wetering, K. (2006) MRP2 and 3 in health and disease. *Cancer Lett* 234, 51-61.
23. Burk, O.; Arnold, K.A.; Geick, A.; Tegude, H.; Eichelbaum, M. (2005) A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol Chem* 386, 503-513.
24. Campos, M.C.; Castro-Pinto, D.B.; Ribeiro, G.A.; Berredo-Pinho, M.M.; Gomes, L.H.; da-Silva-Belliény, M.S.; Goulart, C.M.; Echevarria, A.; Leon, L.L. (2013) P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. *Parasitol Res* 112, 2341-2351.
25. Canaparo, R.; Finnstrom, N.; Serpe, L.; Nordmark, A.; Muntoni, E.; Eandi, M.; Rane, A.; Zara, G.P. (2007). Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 1138-1144.
26. Catania, V.; Luquita, M.; Sánchez-Pozzi, E.; Ikushiro, S.; Emi, T.; Iyanagi, T.; Mittino, A. (2003) Effect of spironolactone on the expression of rat hepatic UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem Pharmacol* 66, 171-177.
27. Catania, V.A.; Sanchez-Pozzi, E.J.; Luquita, M.G.; Ruiz, M.L.; Villanueva, S.S.; Jones, B.; Mottino, A.D. (2004) Co-regulation of expression of phase II metabolizing enzymes and multidrug resistance-associated protein 2. *Ann Hepatol* 3, 11-17.
28. Chan, L.M.; Lowes, S.; Hirst, B.H. (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 21, 25-51.
29. Chhabra, R.S.; Eastin, W.C. (1984) Intestinal absorption and metabolism of xenobiotics in laboratory animals. En: *Intestinal Toxicology*. Editor: Schiller, C.M. Raven, New York, PP. 145-160.

30. Coto C (1982) En: Adelantos en microbiología y enfermedades infecciosas, vol. 1. Editores: Coto C, Esparzo J y de Torres RA. UBA, Buenos Aires.
31. Coura, J.R.; de-Castro, S.L. (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz 97, 3-24.
32. Dallagiovanna, B.; Gamarro, F.; Castanys, S. (1996) Molecular characterization of a P-glycoprotein-related *tcpgp2* gene in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 75, 145-157.
33. Desmet, V.J. (1994) Organizational Principles. En: The liver: Biology and Pathobiology. Editores: Arias IM, Boyer JL, Fausto M.D., Jacoby W B, Schachter D., and Shafritz D.A. Raven Press, Nueva York, EE.UU., pp. 3-14.
34. Dias, J.C.P. (2000) Epidemiología. En: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2da. ed. Editores: Brener Z, Andrade Z, Barral-Neto M. Guanabara Koogan, Río de Janeiro, pp. 48-74.
35. Diaz-de-Toranzo, E.G.; Castro, J.A.; Franke-de-Cazzulo, B.M.; Cazzulo, J.J. (1988) Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. Experientia 44, 880-881.
36. Diaz-Granados, C.A.; Saavedra-Trujillo, C.H.; Mantilla, M.; Valderrama, S.L.; Alquichire, C.; Franco-Paredes, C. (2009) Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. Lancet Infect Dis 9, 324-330.
37. Dietrich, C.G.; de-Waart, D.R.; Ottenhoff, R.; Schoots, I.G.; Elferink, R.P. (2001a) Increased bioavailability of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in MRP2-deficient rats. Mol Pharmacol 59, 974-80.
38. Dietrich, C.G.; de-Waart, D.R.; Ottenhoff, R.; Bootsma, A.H.; van-Gennip, A.H.; Elferink, R.P. (2001b) Role of MRP2 and GSH in intrahepatic cycling of toxins. Toxicology 167, 73-81.

39. Dietrich, C.G.; Geier, A.; Oude-Elferink, R.P. (2003) ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* 52, 1788-1795.
40. Dietrich, C.G.; Geier, A.; Salein, N.; Lammert, F.; Roeb, E.; Oude-Elferink, R.P.; Matern, S.; Gartung, C. (2004) Consequences of bile duct obstruction on intestinal expression and function of multidrug resistance-associated protein 2. *Gastroenterology* 126, 1044-1053.
41. Ding, X.; Kaminsky, L.S. (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43,149-173.
42. Doherty, M.M.; Charman W.N. (2004) The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism? *Clin Pharmacokinet* 41: 235-253.
43. Doyle, L.A.; Yang, W.; Abruzzo, L.E.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A.K.; Ross, D.D. (1998) Cloning and characterization of breast cancer resistance protein (BCRP), a novel ATP-binding cassette (ABC) transporter that may contribute to the multidrug-resistance phenotype of MCF-7/AdrVp breast cancer cells. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 39.
44. Dresser, G.K.; Spence, J.D.; Bailey, D.G. (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 38, 41-57.
45. Dutton, G. (1980) *En: Glucuronidation of drugs and other compounds*. CRC Press. Boca Raton, FL, EE.UU.
46. Eloranta, J.J.; Meier, P.J.; Kullak-Ublick, G.A. (2005) Coordinate transcriptional regulation of transport and metabolism. *Methods Enzymol* 400, 511-530.
47. Estudante, M.; Morais, J.G.; Soveral, G.; Benet, L.Z. (2013) Intestinal drug transporters: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 1340-1356.
48. Evers, R.; de-Haas, M.; Sparidans, R.; Beijnen, J.; Wielinga, P.R.; Lankelma, J.; Borst, P. (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by

- the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer* 83, 375-383.
49. Erlinger, S. (1994) Bile flow. En: *The liver: Biology and Pathobiology*. Editores: Arias, I.M.; Boyer, J.L.; Fausto, M.D.; Jacoby, W.B.; Schachter, D.; Shafritz, D.A. Raven Press, Nueva York, EE.UU., pp. 769-786.
50. Erlinger, S.; Dhumeaux, D. (1974) Mechanisms and control of secretion of bile water and electrolytes. *Gastroenterology* 66, 281-304.
51. Fernandez, C.; Buyse, M.; German-Fattal, M.; Gimenez, F. (2004) Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *J Pharm Pharm Sci* 17, 359-371.
52. Fetsch, P.A.; Abati, A.; Litman, T.; Morisaki, K.; Honjo, Y.; Mittal, K.; Bates, S.E. (2006) Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett* 235, 84-92.
53. Fritz, F.; Chen, J.; Hayes, P.; Sirotnak, FM. (2000) Molecular cloning of the murine cMOAT ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1492, 531-536.
54. Fromm, M.F.; Kauffmann, H.M.; Fritz, P.; Burk, O.; Kroemer, H.K.; Warzok, R.W.; Eichelbaum, M.; Siegmund, W.; Schrenk, D. (2000). *Am J Pathol* 157, 1575-1580.
55. Gatmaitan, Z.C.; Arias, I.M. (1993) Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Adv Pharmacol* 24, 77-97.
56. Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.
57. Geick, A.; Eichelbaum, M.; Burk, O. (2001) Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem* 276, 14581-14587.
58. Geneser, F. (1984) En: *Histología*. Editores: Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. pp 440-451.

59. Gerk, P.M.; Vore, M. (2002) Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 407-415.
60. Ghanem, C.I.; Arias, A.; Novak, A.; Carpini, G.D.; Villanueva, S.; Blazquez, A.G.; Marin J.J.; Mottino, A.D.; Rubio, M.C. (2011) Acetaminophen-induced stimulation of MDR1 expression and activity in rat intestine and in LS 174T human intestinal cell line. *Biochem Pharmacol* 81, 244-250.
61. Goepfert, A.R.; Scheerens, H.; Vermeulen, N.P. (1995) Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 25, 25-65.
62. González-Cappa, S.; Durante-de-Isola, E. (1994) Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. En: *Enfermedad de Chagas*. Editores: Storino, R.; Miles, J. Doyma Argentina S.A., Buenos Aires, pp. 31-40.
63. Gotoh, Y.; Suzuki, H.; Kinoshita, S.; Hirohashi, T.; Kato, Y.; Sugiyama, Y. (2000) Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 433-439.
64. Greiner, B.; Eichelbaum, M.; Fritz, P.; Kreichgauer, H.P.; von-Richter, O.; Zundler, J. (1999) The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 104, 147-153.
65. Griffith O. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106, 207-221.
66. Guengerich, F.P. (1995) Cytochrome P450 proteins and potential utilization in biodegradation. *Environ Health Perspect* 103, 25-28.
67. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2002) National Institutes of Health, EE.UU. 2ª ed.

68. Gutteridge, J.M.; Halliwell, B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 899: 136-147.
69. Haberkorn, V.; Oziol, L.; Goudonnet, H. (2003) 9-cis-Retinoic acid regulation of four UGT isoforms in hepatocytes from rats with various thyroid states. *Pharm Res* 20, 1568-1573.
70. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, 7130-7139.
71. Hall, B.S.; Wilkinson, S.R. (2012) Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 115-123.
72. Hardison, W.G.; Wood, C.A. (1978) Importance of bicarbonate in bile salt independent fraction of bile flow. *Am J Physiol* 235, E158-E164.
73. Hayes, P.C.; Harrison, D.J.; Boucher, I.A.D.; McLellan, L.I.; Hayes, J.D. (1989) Cytosolic and microsomal glutathione S-transferase isoenzymes in normal human liver and intestinal epithelium. *Gut* 30, 854-859.
74. Hayes, J.D.; Pulford, D.J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 445-600.
75. Hoare, C.A. (1972) *En: The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.* Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburg, pp. 60-72.
76. Hum, D.; Belanger, A.; Levesque, E.; Barbier, O.; Beaulieu, M.; Albert, C.; Vallee, M.; Guillemette, C.; Tchernof, A.; Turgeon, D.; Dubois, S. (1999) Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 413-423.
77. Hunter, J.; Hirst, B.H.; Simmons, N.L. (1993a) Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm Res* 10, 743-749.

78. Hunter, J.; Jepson, M.A.; Tsuruo, T.; Simmons, N.L.; Hirst, B.H. (1993b) Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J Biol Chem* 268, 14991-14997.
79. Ibrahim, S.; Peggins, J.; Knapton, A.; Licht, T.; Aszalos, A. (2001) Influence of beta-adrenergic antagonists, H1-receptor blockers, analgesics, diuretics, and quinolone antibiotics on the cellular accumulation of the anticancer drug, daunorubicin: P-glycoprotein modulation. *Anticancer Res* 21, 84-87.
80. Ikushiro, S.; Emi, Y.; Iyanagi, T. (1995) Identification and analysis of drug-responsive expression of UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) isozyme in rat hepatic microsomes using anti-peptide antibodies. *Arch Biochem Biophys* 324, 267-272.
81. Ishii, Y.; Nurrochmad, A.; Yamada, H. (2010) Modulation of UDP-glucuronosyltransferase activity by endogenous compounds. *Drug Metab Pharmacokinet* 25, 134-148.
82. Ishikawa, T.; Onishi, Y.; Hirano, H.; Oosumi, K.; Nagakura, M.; Tarui, S. (2004) Pharmacogenomics of Drug Transporters: A New Approach to Functional Analysis of the Genetic Polymorphisms of ABCB1 (P-Glycoprotein/MDR1). *Biol Pharm Bull* 27, 939-948.
83. Jakobsson, P.J.; Thoren, S.; Morgenstern, R.; Samuelsson, B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7220-7225.
84. Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154, 103-116.
85. Kageyama, M.; Fukushima, K.; Togawa, T.; Fujimoto, K.; Taki, M.; Nishimura, A.; Ito, Y.; Sugioka, N.; Shibata, N.; Takada, K. (2006) Relationship between excretion clearance of rhodamine 123 and P-

- glycoprotein (Pgp) expression induced by representative Pgp inducers. *Biol Pharm Bull* 29, 779-784.
86. Kaplowitz, N. (1980) Physiological significance of glutathione S-transferases. *Am J Physiol* 239, 439-444.
87. Kashfi, K.; Yang, E.; Roy-Chowdhury, J.; Roy-Chowdhury, N.; Dannenberg, A. (1994) Regulation of uridine diphosphate glucuronosyltransferase expression by phenolic antioxidants. *Cancer Res* 54, 5856-5859.
88. Kessler, M.; Acuto, O.; Storelli, C.; Murer, H.; Muller, M.; Semenza, G. (1978) A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. *Biochim Biophys Acta* 506, 136-154.
89. Kiang, T.K.; Ensom, M.H.; Chang, T.K. (2005) UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 106, 97-132.
90. Kim, S.G.; Cho, M.K. (1996) Expression of glutathione S-transferases Ya, Yb1, Yb2, Yc1 and Yc2 and microsomal epoxide hydrolase genes by thiazole, benzothiazole and benzothiadiazole. *Biochem Pharmacol* 52, 1831-1841.
91. Kim, R.B.; Leake, B.F.; Choo, E.F.; Dresser, G.K.; Kubba, S.V.; Schwarz, U.I.; Taylor, A.; Xie, H.G.; McKinsey, J.; Zhou, S.; Lan, L. B.; Schuetz, J.D.; Schuetz, E.G.; Wilkinson, G.R. (2001) Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 70, 189-199.
92. Klaassen, C.D.; Aleksunes, L.M. (2010) Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev* 62, 1-96.
93. Kliewer, S.A.; Goodwin, B.; Willson, T.M. (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 23, 687-702.

94. Köhle, C.; Bock, K.W. (2009) Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol* 77, 689-699.
95. Koeppen, B.M. (2009) En: Berne y Levy, *Fisiología* 6<sup>o</sup> ed. Editores: Koeppen, B.M.; Stanton, B.A. Elsevier, Barcelona, España, pp. 557-593.
96. Kovacic, P.; Somanathan, R. (2009) Pulmonary toxicity and environmental contamination: radicals, electron transfer, and protection by antioxidants. *Rev Environ Contam Toxicol* 201, 41-69.
97. Kullak-Ublick, G.A.; Stieger, B.; Hagenbuch, B.; Meier, P.J. (2000) Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 20, 273-292.
98. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
99. Lee, F.Y.; Workman, P.; Chesseman, K.H. (1987) Misonidazole and benznidazole inhibit hydroxylation of CCNU by mouse liver microsomal cytochrome P-450 in vitro. *Biochem Pharmacol* 36, 1349-1355.
100. Lee, T.K.; Li, L.; Ballatori, N. (1997) Hepatic Glutathione and Glutathione S-Conjugate transport mechanisms. *Yale Journal of Biology and Medicine* 70, 287-300.
101. Leslie, E.M.; Deeley, R.G.; Cole, S.P.C. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, 216-237.
102. Lewis, D.F.V. (2001) En: *Guide to Cytochromes P450. Structure and Function*. Editor: Lewis, D.F.V. Taylor y Fancis, New York, EE.UU., pp. 1-101.
103. Li, A.P.; Kaminski, D.L.; Rasmussen, A. (1995) Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* 104, 1-8.
104. Lima, D.R.; Bezerra, M.L.; Neves, E.B.; Moreira, F.R. (2011) Impact of ammunition and military explosives on human health and the environment. *Rev Environ Health* 26, 101-110.

105. Lown, K.S.; Mayo, R.R.; Leichtman, A.B.; Hsiao, H.L.; Turgeon, D.K.; Schmiedlin-Ren, P.; Brown, M.B.; Guo, W.; Rossi, S.J.; Benet, L.Z.; Watkins, P.B. (1997) Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 62, 248-260.
106. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
107. Luquita, M.G.; Catania, V.A.; Sanchez-Pozzi, E.J.; Mottino, A.D. (1996) Ovine prolactin increases hepatic UDP-glucuronosyltransferase activity in ovariectomized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 278, 921-925.
108. Maliepaard, M.; Scheffer, G.L.; Faneyte, I.F.; Van Gastelen, M.A.; Pijnenborg, A.C.L.M.; Schinkel, A.H.; Van De Vijver, M.J.; Scheper, R.J.; Schellens, J.H.M. (2001) Subcellular localisation and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61, 3458–3464.
109. Mangelsdorf, D.J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evans, R. M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
110. Martinez-Cabot, A.; Morato, A.; Messeguer, A. (2005) Synthesis and stability studies of the glutathione and N-acetylcysteine adducts of an iminoquinone reactive intermediate generated in the biotransformation of 3-(N-phenylamino)propane-1,2-diol: implications for toxic oil syndrome. *Chem Res Toxicol* 18, 1721-1728.
111. Masana, M.; de-Toranzo, E.G.; Rubio, M.C.; Castro, J.A. (1985) Effect of benznidazole on the mixed function oxygenase system from rat liver microsomes. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 276, 4-11.
112. Masmoudi, T.; Mounie, J.; Artur, Y.; Magdalou, J.; Goudonnet, H. (1997) Comparative quantification of two hepatic UDP-

- glucuronosyltransferase bilirubin isoforms mRNAs in various thyroid states in rat. *Biochem Pharmacol* 53, 1013-1017.
113. Maya, J.D.; Cassels, B.K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A. (2007) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146: 602-620.
114. Meier, P.; Sztul, E.; Reuben, A.; Boyer, J. (1984) Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. *J Cell Biol* 98, 991-1000.
115. Mehlhorn, H. (2001) En: *Encyclopedic reference of parasitology*, vol. 1 y 2, 2ª edición. Editor: Mehlhorn, H. Springer, Berlin Heidelberg New York.
116. Metivier, R.; Reid, G.; Gannon, F. (2006). Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep* 7, 161-167.
117. Meyer, D.J.; Coles, B.; Pemble, S.E.; Gilmore, K.S.; Fraser, G.M.; Ketterer, B. (1991) Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* 274, 409-414.
118. Ministerio de Salud de la Nación. Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán". Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén". Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación de Endemoepidemias (CeNDIE). Secretaría de Programas Sanitarios Subsecretaría de Promoción y Prevención. Dirección de Enfermedades Transmisibles por Vectores. Coordinación Nacional de Control de Vectores. Programa Nacional de Chagas. Guía para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Agosto de 2012.
119. Monshouwer, M.; Witkamp, R.F.; Nujmeijer, S.M.; Van Amsterdam, J.G.; Van Miert, A.S. (1996) Suppression of cytochrome P450- and UDP

- glucuronosyl transferase-dependent enzyme activities by proinflammatory cytokines and possible role of nitric oxide in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 137, 237-244.
120. Montalto-de-Mecca, M.; Bernacchi, A.S.; Castro, J.A. (2000) Prevention of benznidazole-induced prolonged effect on the pentobarbital sleeping time of rats using different thiol-containing compounds. *Re. Commun Mol Pathol Pharmacol* 108, 39-48.
121. Morilla, M.J.; Benavídez, P.E.; López, M.O.; Romero, E.L. (2003) Liposomal benznidazole: a high-performance liquid chromatographic determination for biodistribution studies. *J Chromatogr Sci* 41, 405-409.
122. Mottino, A.D.; Hoffman, T.; Jennes, L.; Vore, M. (2000) Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 721-723.
123. Mottino, A., Tuchweber, B., Plaa, G.L., Yousef, I.M. (2000a) Role of perivenous hepatocytes in tauro lithocholate-induced cholestasis in vivo. *Toxicol Lett.* 116, 69-77.
124. Mottino, A.D.; Hoffman, T.; Jennes, L.; Vore, M. (2000b) Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 717-723.
125. Mottino, A.D.; Hoffman, T.; Jennes, L.; Cao, J.; Vore, M. (2001) Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartum rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G1261-G1273.
126. Mulder, G.J. (1990) En: Conjugation reactions in drug metabolism. Editor: Mulder, G.J. Taylor y Francis, New York, EE.UU., pp. 50-105.
127. Myers, N.C.; Grune, S.; Jameson, H.L.; Sawkat-Anwer, M. (1996) cGMP stimulates bile acid-independent bile formation and biliary bicarbonate excretion. *Am J Physiol* 270, G418-G424.
128. Nelson, D.R.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J.J.; Feyereisen, R.; Waxman, D.J.; Waterman, M.R.; Gotoh, O.; Coon, M.J.; Eastabrook, R.W.; Gunsalus, I.C.; Nebert, D.W. (1996) P450

- superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.
129. OMS, Organización Mundial de la Salud, 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
  130. OPS, Organización Panamericana de la salud, 2013. [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3591&Itemid=3921)
  131. Orellana, M.; Guajardo, V. (2004) Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Rev Med Chil* 132, 85-94.
  132. Ohoka, K.; Tacaño, M.; Okano, T. (1993) p-Aminohippurate transport in rat renal brush border membranes: A potential sensitive transport system and an anion exchanger. *Biol Pharm Bull* 16, 395-401.
  133. Oude-Elferink, R.; Ottenhoff, R.; Liefding, W.; de-Hann, J.; Jansen, P. (1989) Hepatobiliary transport of glutathione and glutathione conjugate in rats with hereditary hyperbilirubinemia. *J Clin Invest* 84, 476-483.
  134. Oude-Elferink, R.P.; Meijer, D.K.; Kuipers, F.; Jansen, P.L.; Groen, A.K.; Groothuis, G.M. (1995) Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. *Biochim Biophys Acta* 1241, 215-268.
  135. Paulino, M.; Iribarne, F.; Dubin, M.; Aguilera-Morales, S.; Tapia, O.; Stopani, A.O.M. (2005) The chemotherapy of chagas' disease: an overview. *Mini-Reviews Med Chem* 5, 499-519.
  136. Pfeifer, N.D.; Hardwick, R.N.; Brouwer, K.L. (2013) Role of hepatic efflux transporters in regulating systemic and hepatocyte exposure to xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* en-prensa.
  137. Pinazo, M.J.; Guerrero, L.; Posada, E.; Rodríguez, E.; Soy, D.; Gascon, J. (2012) Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 390-395.
  138. Pushparajah, D.S.; Umachandran, M.; Plant, K.E.; Plant, N.; Ioannides, C. (2008) Up-regulation of the glutathione S-transferase

- system in human liver by polycyclic aromatic hydrocarbons; comparison with rat liver and lung. *Mutagenesis* 23, 299-308.
139. Raaflaub, J.; Ziegler, W.H. (1979) Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung* 29, 1611-1614.
140. Raaflaub, J. (1980) Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung* 30, 2192-2194.
141. Rassi, A.Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J.A. (2010) Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-1402.
142. Raether, W.; Hänel, H. (2003) Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol Res* 90 Supp 1:S19-S39.
143. Renton, K.W. (2005) Regulation of drug metabolism and disposition during inflammation and infection. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1, 629-640.
144. Richert, L.; Tuschl, G.; Abadie, C.; Blanchard, N.; Pekthong, D.; Mantion, G.; Weber, J.C.; Mueller, S.O. (2009) Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 235, 86-96.
145. Rigalli, J.P.; Perdomo, V.G.; Luquita, M.G.; Villanueva, S.S.; Arias, A.; Theile, D.; Weiss, J.; Mottino, A.D.; Ruiz, M.L.; Catania, V.A. (2012) Regulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in HepG2 cells: involvement of pregnane X-receptor. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1951.
146. Roberts, J.T.; Bleehen, N.M. (1985) Benznidazole with CCNU: a clinical phase I toxicity study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11, 331-334.
147. Roberts, M.S.; Magnusson, B.M.; Burczynski, F.J.; Weiss, M. (2002) Enterohepatic Circulation. Physiological, Pharmacokinetic and Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet* 41, 751-790.
148. Roche. (1983). En: Informe Radanil, Roche, Productos Roche S.A.Q.e I. Farma – Departamento Médico- Biblioteca. Buenos Aires, Argentina, pp. 1-16.

149. Rowland, I.R.; Walker, R. (1983) The gastrointestinal tract in food toxicology. En: Toxic Hazards in Food. Editores: Conning, D.M.; Lansdown, A.B.G. Croom Helm, London, PP. 183-275.
150. Ruiz, M.L.; Villanueva, S.S.M.; Luquita, M.G.; Sánchez-Pozzi, E.J.; Crocenzi, F.A.; Pellegrino, J.M.; Ochoa, J.E.; Vore, M.; Mottino, A.D.; Catania, V.A. (2005) Mechanisms involved in spironolactone-induced choleresis in the rat. Role of multidrug resistance-associated protein 2. *Biochem Pharmacol* 69, 531-539.
151. Ruiz, M.L.; Villanueva, S.S.; Luquita, M.G.; Vore, M.; Mottino, A.D.; Catania, V.A. (2006) Ethynylestradiol increases expression and activity of rat liver MRP3. *Drug Metab Dispos* 34, 1030-1034.
152. Ruiz, M.L.; Villanueva, S.S.; Luquita, M.G.; Pellegrino, J.M.; Rigalli, J.P.; Aria, A.; Sanchez-Pozzi, E.J.; Mottino, A.D.; Catania, V.A. (2009) Induction of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) by spironolactone in rats. *Eur J Pharmacol* 623, 103-106.
153. Schwab, M.; Schaeffeler, E.; Marx, C.; Fromm, M.F.; Kaskas, B.; Metzler, J.; Stange, E.; Herfarth, H.; Schoelmerich, J.; Gregor, M.; Walker, S.; Cascorbi, I.; Roots, I.; Brinkmann, U.; Zanger, U.M.; Eichelbaum, M. (2003) Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124, 26-33.
154. Schwartz, D.E.; Hofheinz, W. (1982) Metabolism of nitroimidazoles. En: Nitroimidazoles: Chemistry, Pharmacology, and Clinical applications. Editores: Breccia, A.; Cavelleri, B.; Adams, G.E. Plenum Press, New York, pp. 91-104.
155. Selen, P.; Gordon, P.; Poli, A. (1980) Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 630, 103-118.
156. Siekevitz, P. (1962) Preparation of microsomes and submicrosomal fractions: Mammalian. *Methods Enzymol* 5, 61-68.

157. Siemann, D.W.; Morrissey, S.; Wolf, K. (1983) In vivo potentiation of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea by the radiation sensitizer benznidazole. *Cancer Res* 43, 1010-1013.
158. Silva, A.E.; Silva, A.C.; Faleiros, A.C.; Guimarães, C.S.; Corrêa, R.R.; Oliveira, F.A.; Correia, D.; Teixeira, A.C.; Ramirez, L.E.; Teixeira, V. P.; dos-Reis, M.A. (2010) Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. *Ann Diagn Pathol* 14, 199-203.
159. Smith, T.K. (1991) Dietary modulation of the glutathione detoxification pathway and the potential for altered xenobiotic metabolism. *Adv Exp Med Biol* 289, 165-169.
160. Sosa Estani, S.; Segura, E.L.; Ruiz, A.M.; Velazquez, E.; Porcel, B.M.; Yampotis, C. (1998) Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 59, 526-529.
161. Strassburg, C.P.; Strassburg, A.; Kneip, S.; Barut, A.; Tukey, R.H.; Rodeck, B.; Manns, M.P. (2002) Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. *Gut* 50, 259-265.
162. Strasser, S.; Smid, S.; Mashford, M.; Desmond, P. (1997) Sex hormones differentially regulate isoforms of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharm Res* 14, 1115-1121.
163. Strasser, S.I.; Mashford, M.L.; Desmond, P.V. (1998) Regulation of uridine diphosphate glucuronosyltransferase during the acute-phase response. *J Gastroenterol Hepatol* 13, 88-94.
164. Sukhai, M.; Yong, A.; Pak, A.; Piquette-Miller, M. (2001) Decreased expression of P-glycoprotein in interleukin-1beta and interleukin-6 treated rat hepatocytes. *Inflamm Res* 50, 362-370.
165. Suzuki, H.; Sugiyama, Y. (1998) Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Semin Liver Dis* 18, 359-376.

166. Tanigawara, Y. (2000) Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Ther Drug Monit* 22, 137-140.
167. Tephly, T.; Green, M.; Puig, J.; Irshaid, Y. Endogenous substrates for UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica* 18, 1201-1210.
168. Terao, T.; Hisanaga, E.; Sai, Y.; Tamai, I.; Tsuji A. (1996) Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *J Pharm Pharmacol* 48, 1083-1089.
169. Thiebaut, F.; Tsurou, T.; Hamada, H.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Willingham, M.C. (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci* 84, 7735-7738.
170. Thimmulappa, R.K.; Mai, K.H.; Srisuma, S.; Kensler, T.W.; Yamamoto, M.; Biswal, S. (2002) Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 62, 5196-5203.
171. Thorn, M.; Finnstrom, N.; Lundgren, S.; Rane, A.; Loof, L. (2005) Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol* 60, 54-60.
172. Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27, 502-522.
173. Tirona, R.G.; Lee, W.; Leake, B.F.; Lan, L.B.; Cline, C.B.; Lamba, V.; Parviz, F.; Duncan, S.A.; Inoue, Y.; Gonzalez, F.J.; Schuetz, E.G.; Kim, R.B. (2003) The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat Med* 9, 220-224.
174. Torres, C.; Barreiro, L.; Dallagiovanna, B.; Gamarro, F.; Castanys, S. (1999) Characterization of a new ATP-binding cassette transporter in *Trypanosoma cruzi* associated to a L1Tc retrotransposon. *Biochim Biophys Acta* 1489, 428-432.

175. Torres, A.; Mac-Laughlin, M.; Quaglia, N.; Stremmel, W. (2003) Role of BSP/Bilirubin binding protein on p-aminohippurate transport in rat kidney. *Mol Cell Biochem* 245, 149-156.
176. Townsend, D.M.; Tew, K.D. (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22: 7369-7375.
177. Trauner, M.; Meier, P.J.; Boyer, J.L. (1999) Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. *J Hepatol* 31, 165-178.
178. Tsuji, A.; Tamai, I. (1996) Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm Res* 13, 963-977.
179. Tucker, T.G.H.A.; Milne, A.M.; Fournel-Gigleux, S.; Fenner, K.S.; Coughtrie, M.W.H. (2012) Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum. *Biochemical Pharmacology* 83, 279–285.
180. Ufer, M.; Dilger, K.; Leschhorn, L.; Daufresne, L.; Mosyagin, I.; Rosenstiel, P.; Haesler, R.; Kuehbacher, T.; Nikolaus, S.; Schreiber, S.; Cascorbi, I. (2008) Influence of CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 genotype and expression on budesonide pharmacokinetics: a possible role of intestinal CYP3A4 expression. *Clin Pharmacol Ther* 84, 43-46.
181. Villanueva, S.S.M.; Ruiz, M.L.; Luquita, M.G.; Sánchez-Pozzi, E.J.; Catania, V.A.; Mottino, A.D. (2005) Involvement of Mrp2 in hepatic and intestinal disposition of dinitrophenyl-Sglutathione in partially hepatectomized rats. *Toxicol Sci* 84, 4-11.
182. Villanueva, S.S.; Perdomo, V.G.; Ruiz, M.L.; Rigalli, J.P.; Arias, A.; Luquita, M.G.; Vore, M.; Catania, V.A.; Mottino, A.D. (2012) Effect of glucagon-like peptide 2 on hepatic, renal, and intestinal disposition of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. *Drug Metab Dispos* 40, 1252-1258.
183. Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Bertocchi, G.; Petti, M.; Alvarez, M.G.; Postan, M.; Armenti, A. (2006) Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 144, 724-734.

184. Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Alvarez, M.G.; Petti, M.; Bertocchi, G.; Armenti, A. (2009) Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7, 157-163.
185. Warrington, J.S.; Greenblatt, D.J.; Von-Moltke, L.L. (2004) Role of CYP3A enzymes in the biotransformation of triazolam in rat liver. *Xenobiotica* 34, 463-471.
186. Wells, P.G.; Mackenzie, P.I.; Chowdhury, J.R.; Guillemette, C.; Gregy P.A.; Ishii, Y.; Hansen, A.J.; Kessler, F.K.; Kim, P.M.; Chowdhury, N.R.; Ritter, J.K. (2004) Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metab Dispos* 32, 281-290.
187. Werck-Reichhart, D.; Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1, S3003.
188. Workman, P.; Walton, M.I.; Lee, F.Y. (1986) Benznidazole: nitroreduction and inhibition of cytochrome P-450 in chemosensitization of tumour response to cytotoxic drugs. *Biochem Pharmacol* 35, 117-119.
189. Yokota, H.; Iwano, H.; Endo, M.; Kobayashi, T.; Inoue, H.; Ikushiro, S.; Yuasa, A. (1999) Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 340, 405-409.
190. Zhou, S.F.; Xue, C.C.; Yu, X.Q.; Wang, G. (2007). Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. *Curr Drug Metab* 8, 526-553.
191. Zhou, S.F.; Xue, C.C.; Yu, X.Q.; Li, C.; Wang, G. (2007) Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 29, 687-710.

## ***IX. Agradecimientos***

## 9. Agradecimientos.

Antes de concluir con este trabajo de Tesis quisiera extender mis agradecimientos a todos aquellos que me acompañaron en esta etapa de mi vida y que me ayudaron y me hicieron sentir acompañada. En especial, quería agradecer:

A **Damián**, por ser el pilar mas importante de mi vida, mi cable a tierra, por su amor incondicional y su apoyo en cada uno de los proyectos que he emprendido.

A mi **familia**, que aún sin comprender completamente mi profesión me ha apoyado incondicionalmente en mis decisiones y me ha sabido guiar para construir mi presente y mi futuro.

A **Viviana**, por ser como una segunda madre, que preocupada por aquellos que ama nos guía, nos protege y nos enseña, brindándonos contención, tiempo, paciencia y todos sus conocimientos. Gracias, por estar siempre atenta, siempre dispuesta a solucionar los problemas, siempre mirando hacia el futuro de todos y cada uno.

A **Claudia** que junto con Vivi supieron encender una luz de esperanza y compasión en uno de los momentos más oscuros de mi vida, aun cuando eso implicara luchar contra la opinión de otros.

A **Aldo**, por guiarnos cuando encontrábamos un callejón sin salida; sembrando sus conocimientos donde los experimentos parecían no tener explicación.

A este grupo de seres maravillosos, a: **Juan Pablo, Agostina, Silvina, Laura y Maite**, que me acompañaron en esta etapa de mi vida, trabajando codo a codo en la mesada, que con sus consejos laborales y de vida, con su sinceridad, su amistad, sus cuidados y su comprensión, me ayudaron a crecer tanto personal

como profesionalmente, haciendo fácil y placentero el trabajo en equipo. Gracias, millones de gracias.

A **Julia**, amiga y compañera de proyectos personales, que me motivó a lograr hermosos proyectos y buscar nuevos rumbos. Por las charlas, los viajes, los cafés y por todas las buenas experiencias culinarias que hacen que uno disfrute aun más la vida.

A **Marcelo, José y Elena**, por su colaboración técnica, su excelente disposición al trabajo y sus consejos.

A **Juan** por estar siempre dispuesto a colaborar para que todo funcione mejor, contestar el teléfono en cualquier que se lo necesite, y por brindar siempre la solución a cada percance que surja.

A los integrantes del **IFISE**, por dejarme formar parte de este grupo humano tan valioso, por los reactivos y protocolos prestados, las charlas, las risas, la catarsis, los “grupos de autoayuda pos-western”, y por supuesto, por los mates, los asados y los *after-office*.

A toda la **gente de la facultad**, por su ayuda desinteresada, su tiempo y su predisposición. Porque una de las primeras enseñanzas que tuve a lo largo de este trabajo de tesis fue que “***El mundo es de las relaciones, y benditos aquellos que aprenden a compartir***”.

A los **jurados** de esta tesis, por tomarse el trabajo de leer y evaluar este trabajo, dedicando su tiempo y sus conocimientos a enriquecer mi formación.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (**CONICET**) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (**ANPCyT**), por financiar mi trabajo de tesis, permitiéndome forjar mi futuro laboral y personal entorno a la profesión que amo.

A todos, muchas gracias por esta experiencia extraordinaria.

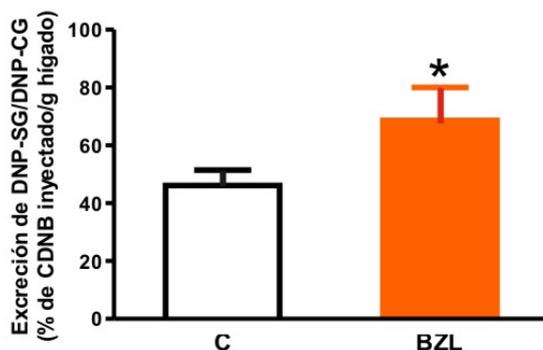
## FE DE ERRATAS DE TESIS

### HIPÓTESIS:

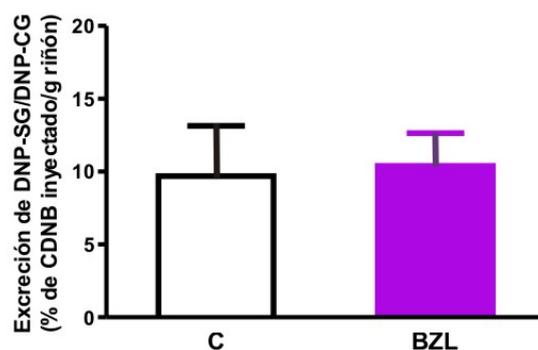
El tratamiento con BZL altera la expresión y actividad de sistemas de biotransformación y proteínas transportadoras afectando el metabolismo y eliminación de endo- y xenobióticos.

### RESULTADOS:

- En página 75, donde dice: “Estos resultados sugieren una mayor excreción del sustrato de P-gp mediante la vía biliar ...”, debe decir: “Estos resultados sugieren una mayor excreción del sustrato de P-gp mediante la vía biliar e **intestinal** ...”.
- En página 76, la figura 25 D debe reemplazarse por:



- En página 76, la figura 25 K debe reemplazarse por:



- En página 77, donde dice “...mientras que la excreción intestinal fue mayor en ratas tratadas con BZL (+ 35 %, Fig. 25 H)...”, debe decir: “...mientras que la excreción intestinal fue mayor en ratas tratadas con BZL (+ **80** %, Fig. 25 H)...”.

- En página 78, la Tabla 3 debe reemplazarse por:

	PARÁMETRO	C	BZL
PLASMA	$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{M}$ )	18,8 $\pm$ 2,3	14,7 $\pm$ 1,6 *
	<b>AUC</b> (nmol min/ml)	<b>1298 <math>\pm</math> 178</b>	<b>799 <math>\pm</math> 20 *</b>
	<b>k</b> ( $\text{min}^{-1}$ )	<b>-0.0042 <math>\pm</math> 0.0020</b>	<b>-0.0166 <math>\pm</math> 0.0045*</b>
BILIS	Excreción acumulativa (pmol/g hígado)	152 $\pm$ 18	244 $\pm$ 23 *
	% dosis	0.64 $\pm$ 0.17	1.16 $\pm$ 0.10 *
ORINA	Excreción acumulativa (pmol/g riñón)	1178 $\pm$ 299	1016 $\pm$ 184
	% dosis	1.01 $\pm$ 0.67	1.55 $\pm$ 0.19

**TABLA 3: Parámetros farmacocinéticos de una dosis testigo de BZL.**  $C_{m\acute{a}x}$ : concentración plasmática máxima; AUC: área bajo la curva; k: velocidad de eliminación. Cada valor representa la media  $\pm$  SD. \*significativamente diferente de C,  $p < 0.05$ ,  $n = 4-5$ .

- En página 79, la leyenda del eje Y de Figura 17 B, donde dice: “BZL (pM/g hígado)”, debe decir: “BZL (**pmol**/g hígado)”.
- En página 79, la leyenda del eje Y de Figura 17 C, donde dice: “BZL (pM/g riñón)”, debe decir: “BZL (**pmol**/g riñón)”.
- En página 80, en leyenda del eje Y de Figura 18 A, donde dice: “Excreción intestinal de BZL...”, debe decir: “**Absorción** intestinal de BZL...”.
- En página 80, en leyenda del eje Y de Figura 18 B, donde dice: “Excreción intestinal acumulativa de BZL ( $\mu\text{M}$  de BZL/gr intestino)”, debe decir: “**Absorción** intestinal acumulativa de BZL ( $\mu\text{mol}$  de BZL/g intestino)”.
- En página 80, en leyenda de Figura 18, donde dice: “Excreción de BZL...”, debe decir: “**Absorción** de BZL...”.
- En página 80, en leyenda de Figura 18, se agrega: “a: diferente de C; b: diferente de BZL”.