



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de doctorado

Modulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por benznidazol en la línea celular HepG2. Rol del receptor de pregnanos X.

Presentada por Juan Pablo Rigalli

Rosario, Argentina

2013

Modulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por benznidazol en la línea celular HepG2. Rol del receptor de pregnanos X.

Juan Pablo Rigalli

Licenciado en Biotecnología de la Universidad Nacional de Rosario

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, Área Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01/04/2009 y el 19/07/2013, bajo la dirección de la Dra. Viviana A. Catania y la codirección de la Dra. María L. Ruiz.

Parte de los resultados que se describen en el presente Trabajo de Tesis fueron publicados en los artículos originales y presentados en los congresos que se detallan a continuación:

1. Artículos

1.1. "Regulation of biotransformation systems and abc transporters by benznidazole in HepG2 cells. Involvement of Pregnane X-receptor". Rigalli JP, Perdomo VG, Luquita MG, Villanueva SS, Arias A, Theile D, Weiss J, Mottino AD, Ruiz ML y Catania VA. *Plos Negl Trop Dis*. 6: e1951. (2012).

2. Presentaciones en congresos

2.1. "Benznidazol (BZL) modula la expresión de proteínas transportadoras de drogas en hígado de rata y en la línea celular HepG2". Perdomo VG, Rigalli JP, Luquita MG, Villanueva SSM, Ruiz ML, Mottino AD, Echenique CG y Catania VA. Presentado en: LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, XLII Congreso de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental y Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Mar del Plata, 17 al 20 de noviembre de 2010.

2.2. "Efecto del tratamiento con benznidazol sobre sistemas de biotransformación y excreción de drogas en la línea celular HepG2". Rigalli JP, Perdomo VG, Villanueva SS, Echenique CG, Mottino AD, Ruiz ML y Catania VA. Presentado en: XXIX Congreso Nacional de Cardiología. Córdoba, 20 al 22 de mayo de 2011.

2.3. "Modulación de sistemas de biotransformación y excreción de drogas por Benznidazol (BZL) en células HepG2. Rol del receptor nuclear de pregnanos X (PXR)". Rigalli JP, Perdomo VG, Luquita MG, Villanueva SS, Mottino AD, Ruiz ML y Catania VA. Presentado en: LVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Mar del Plata, 16 al 19 de noviembre de 2011.

2.4. "Regulación de CYP3A4 por Benznidazol (BZL) en células HepG2. Rol del receptor de pregnanos X (PXR)". Rigalli JP, Perdomo VG, Theile D, Weiss J, Mottino AD, Ruiz ML y Catania VA. Presentado en: XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mendoza, 31 de octubre al 2 de noviembre de 2012.

Índice

Abreviaturas	VI
Introducción	1
1. Hígado	1
2. Sistemas de biotransformación y transportadores de drogas	2
2.1. Sistemas de biotransformación de fase I	2
2.2. Sistemas de biotransformación de fase II	4
2.2.1. UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs)	4
2.2.2. Glutation S-transferasas (GSTs)	5
2.3. Proteínas transportadoras de drogas	6
2.3.1. Transportadores de captación	6
2.3.2. Transportadores de eflujo	7
2.3.2.1. P-glicoproteína (P-gp)	8
2.3.2.2. Proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (MRP2)	9
2.3.2.3. Proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP)	12
2.3.2.4. Proteína asociada a resistencia a multidrogas 3 (MRP3)	13
3. Regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas	15
3.1. Generalidades	15
3.2. Regulación transcripcional de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas	16
3.2.1. Generalidades. Receptores Nucleares	16
3.2.2. Receptor de pregnanos X. Mecanismo de acción	18
3.2.3. Regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por fármacos a nivel transcripcional. Rol de PXR	22
3.2.3.1. Regulación de sistemas de fase I	22
3.2.3.2. Regulación de sistemas de fase II	23
3.2.3.3. Regulación de proteínas transportadoras	23
4. Interacciones droga-droga	26
5. Benznidazol	28
5.1. Generalidades	28
5.2. Mecanismo de acción	29
5.3. Esquema de tratamiento y farmacocinética de BZL	29

5.4. Efectos del BZL sobre sistemas de biotransformación y transportadores de drogas	31
6. Objetivos	33
7. Hipótesis del Trabajo de Tesis Doctoral	34
Materiales y Métodos	35
1. Reactivos generales y materiales	35
2. Cultivo celular	35
2.1. Células HepG2	35
2.2. Células LS180	36
3. Tratamientos con Benznidazol	36
4. Estudios de expresión a nivel de proteína	38
4.1. Obtención de lisados celulares	38
4.2. Obtención de preparaciones de membranas plasmáticas	38
4.3. Determinación de la concentración de proteínas	39
4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes	39
4.5. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas	40
5. Estudios de expresión a nivel de ARNm	41
5.1. Purificación de ARN total y control de calidad	42
5.2. Retrotranscripción a ADN complementario (RT-PCR)	42
5.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	43
6. Actividad de proteínas transportadoras de drogas	45
6.1. Actividad de P-gp	45
6.2. Actividad de MRP2	45
7. Actividad de enzimas de biotransformación	47
7.1. Actividad de CYP3A4	47
7.2. Actividad de GST	48
8. Participación de PXR en la regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas. Mediación de los efectos del BZL por PXR	49
8.1. Sobreexpresión de PXR	49
8.2. Silenciamiento de PXR	51
8.3. Ensayo de activación de PXR por BZL	52
8.3.1. Generación de la línea estable codificando el sistema reportero	52
8.3.2. Incubación de las células LS180-PXRRE con BZL	54

9. Transporte y metabolismo de BZL en células HepG2	54
9.1. Metabolismo de BZL en células HepG2	54
9.2. Transporte de BZL en células HepG2	55
9.2.1. Ensayos con inhibidores	55
9.2.2. Silenciamiento de P-gp	56
9.2.3. Efecto del pretratamiento con BZL sobre su acumulación intracelular	57
10. Estudios estadísticos	57
Resultados I	58
Efecto del tratamiento con BZL sobre de sistemas de biotransformación y transportadores de xenobióticos. Rol de PXR	
1. Estudios de expresión a nivel de proteína	58
1.1. Expresión de transportadores de drogas en lisados celulares	58
1.2. Expresión de P-gp y MRP2 en membrana plasmática	59
1.3. Expresión de sistemas de biotransformación	60
2. Estudios de expresión a nivel de ARNm	61
3. Estudios de actividad	62
3.1. Actividad de sistemas de biotransformación	62
3.1.1. Actividad de CYP3A4	62
3.1.2. Actividad de GST	62
3.2. Actividad de transportadores de drogas	63
3.2.1. Actividad de P-gp	63
3.2.2. Actividad de MRP2	63
4. Expresión de P-gp y cofactores en la línea celular HepG2	65
5. Rol de PXR en el efecto de BZL sobre sistemas de biotransformación y transportadores de drogas	65
5.1. Experimentos de sobreexpresión de PXR	65
5.1.1. Sobreexpresión de PXR en células HepG2	66
5.1.2. Expresión de genes blanco en condiciones de sobreexpresión de PXR	67
5.2. Experimentos de silenciamiento de PXR	68
5.2.1. Silenciamiento de PXR en células HepG2	68
5.2.2. Efecto del silenciamiento de PXR sobre la inducción de sistemas	

de biotransformación y transportadores de drogas por BZL	68
5.3. Efecto de BZL sobre los niveles de expresión de PXR y RXR α	70
5.4. Activación de PXR por BZL	71
Resultados II	72
Metabolismo y transporte de BZL en células HepG2	
1. Metabolismo de BZL en células HepG2	72
2. Efecto de inhibidores de transportadores de drogas sobre la acumulación de BZL	73
3. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la acumulación de BZL	73
3.1. Silenciamiento de P-gp	73
3.2. Acumulación de BZL en células PXR ⁺ y células PXR ⁻	74
4. Acumulación de BZL en células pretratadas con BZL	74
Discusión	76
1.1. Efecto del tratamiento con BZL sobre la expresión y actividad de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas	76
1.2. Participación de PXR en el efecto de BZL sobre sistemas de biotransformación y transportadores de drogas	80
2. Participación de transportadores de eflujo en la secreción de BZL y efecto del pretratamiento con BZL	87
Conclusiones	93
Resumen	94
Bibliografía	99
Agradecimientos	133

Abreviaturas

- 2-AAF: 2-acetilaminofluoreno
- ABC: del inglés, *ATP binding cassette*
- AF: función de activación
- AP-1: proteína de activación 1
- ARE: elemento de respuesta antioxidante
- ATP: adenosina trifosfato
- AUC: área bajo la curva, del inglés *Area under the curve*
- BCRP: proteína de resistencia de cáncer de mama
- BENEFIT: del inglés, *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*
- BHE: barrera hematoencefálica
- BSEP: bomba exportadora de sales biliares
- BZL: benznidazol
- CAR: receptor constitutivo de androstanos
- CCRP: proteína de retención citoplasmática del receptor constitutivo de androstanos
- CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno
- CHO: células de ovario de hamster chino
- $C_{m\acute{a}x}$: concentración máxima alcanzada en plasma
- CMC: concentración micelar crítica
- CYP: proteína de la familia del citocromo P450
- D.O.: densidad óptica
- DBD: dominio de unión a ADN, del inglés *DNA binding domain*
- DEPC: dietilpirocarbonato
- DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DNP-SG: dinitrofenil-S-glutation
- dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato
- DR3: repetición directa separada por 3 nucleótidos
- DR4: repetición directa separada por 4 nucleótidos

- DTNB: ácido ditionitrobenzoico
- DTT: ditionitrotol
- EC₅₀: concentración efectiva 50
- EDTA: etilendiaminotetraacético
- EGTA: etilenglicoltetraacético
- EHBR: ratas hiperbilirrubinémicas Eisai
- ER3: repetición evertida separada por 3 nucleótidos
- ER6: repetición evertida separada por 6 nucleótidos
- ER8: repetición evertida separada por 8 nucleótidos
- FXR: receptor X de farnesoides
- G: Gauge
- GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- GSH: glutatión reducido
- GST: glutatión-S-transferasa
- GY/TR: del inglés, *Groningen Yellow transport deficient rats*
- HNF4 α : factor nuclear hepático 4 α
- HRP: peroxidasa de rábano picante, del inglés *Horseradish peroxidase*
- Hsp90: proteína de choque térmico 90
- JNK: quinasa N-terminal de c-Jun
- LBD: dominio de unión a ligando, del inglés *Ligand binding domain*
- LXR: receptor X hepático
- M3G: morfina-3-glucurónido
- M6G: morfina-6-glucurónido
- miR: micro ARN
- MRP: proteína asociada a resistencia a multidrogas
- MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- NCoR: correpresor de receptores nucleares
- NF κ B: factor nuclear κ B
- NLS: señal de localización nuclear
- Nrf2: factor nuclear relacionado al factor eritroide 2

- NRIP1: proteína de interacción con receptores nucleares
- OAT: transportador de aniones orgánicos
- OATP: proteína transportadora de aniones orgánicos
- OCT: transportador de cationes orgánicos
- P-gp: P-glicoproteína
- pb: pares de bases
- PBS: *buffer* fosfato salino
- PCN: pregnenolona-16 α -carbonitrilo
- PGC: coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales
- PhIP: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina
- PM: peso molecular
- PREM: elemento de respuesta proximal
- PRO: probenecid
- PVDF: difluoruro de polivinilideno
- PXR: receptor de pregnanos X
- PXRRE: elemento de respuesta a PXR
- R123: rodamina 123
- RIF: rifampicina
- RXR: receptor X de retinoides
- SDS: dodecilsulfato sódico
- SFB: suero fetal bovino
- SHP: del inglés *Small heterodimer partner*
- siRNA: ARN pequeño de interferencia
- SLC: transportador de solutos
- SMRT: mediador del silenciamiento de los receptores de retinoides y hormona tiroidea
- SRC: coactivador de receptores de esteroides
- SULT: sulfotransferasa
- $t_{1/2}$: tiempo de vida media
- TCA: ácido tricloroacético

- TcP-gp: proteína similar a P-gp de *Trypanosoma cruzi*
- UDPAG: ácido uridindifosfoglucurónico
- UDP: uridina difosfato
- UGT: uridina difosfato-glucuronosiltransferasa
- VDR: receptor de vitamina D
- VER: verapamilo
- XREM: elemento de respuesta a xenobióticos
- XRS: secuencia de respuesta a xenobióticos

1. Hígado

Todas las células del cuerpo humano están dotadas en mayor o menor medida de la capacidad de responder a la exposición a fármacos. Existen además ciertos órganos de importancia sobresaliente por lo que representa su función para la biodisponibilidad y por ende, para el efecto final del fármaco. El hígado, el riñón y el intestino son tres de ellos, siendo el primero el cuantitativamente más importante.

El hígado es la glándula más grande del organismo, representa un 1/50 del peso corporal. Su rol endocrino consiste en la secreción de proteínas plasmáticas como α - y β -globulinas, albúmina, protrombina y fibrinógeno entre otras. Su función exocrina 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. Estos últimos, luego de ser secretados en bilis, llegan al duodeno y luego de una mayor o menor reabsorción a nivel intestinal son eliminados del organismo confiriéndole de esta manera a la secreción biliar y al hígado en general un rol farmacológico clave.

El hígado recibe una doble irrigación sanguínea. Por un lado, la vena porta le aporta el 75% de la irrigación hepática y aporta sangre proveniente del tracto gastrointestinal, el bazo y el páncreas. Transporta todas las sustancias absorbidas por el intestino a excepción de los lípidos, por lo que el hígado representa una barrera que deben traspasar los fármacos administrados por vía oral para llegar a la circulación sistémica. El efecto del hígado sumado al del intestino como limitante de la absorción de fármacos conforman lo que se denomina efecto de primer paso y su importancia varía en función de cada fármaco. Por ejemplo midazolam, ciclosporina A, loperamida, everolimus y tacrolimus, entre otras, son drogas que experimentan un efecto de primer paso de proporción considerable [1-5]. La arteria hepática por otro lado, le aporta al hígado el 25% restante de su irrigación y con ella todos los compuestos ya presentes en la circulación sistémica, como ser aquéllos absorbidos a nivel gastrointestinal que ya sobrepasaron el efecto de primer paso y fundamentalmente aquéllos administrados por vía parenteral.

Las ramas terminales de la vena porta y de la arteria hepática desembocan en los sinusoides hepáticos. Los mismos son capilares que poseen una alta permeabilidad a todos los compuestos presentes en la sangre a excepción de los elementos celulares. Los hepatocitos están separados de los sinusoides sólo por un estrecho espacio perivascular denominado espacio de Disse por el cual pueden difundir todos los compuestos para hacer contacto con el hepatocito [6].

La membrana plasmática del hepatocito tiene dos dominios claramente diferenciados. El dominio basolateral es el más extenso en superficie y es la principal vía de entrada de fármacos como así también la vía de salida de aquellos compuestos que son devueltos a la sangre. Por otro lado, la membrana apical es la vía de salida de los fármacos que son secretados a bilis. Se trata de una membrana altamente impermeable, en parte, gracias a la carga negativa de su superficie que impide el reflujo de aniones hacia el hepatocito. Las membranas apicales de dos hepatocitos vecinos forman el canalículo biliar que se encuentra sellado y separado del espacio intercelular mediante uniones estrechas. Los canalículos se continúan en vías biliares intrahepáticas de mayor calibre y éstas en vías extrahepáticas que se unen para formar el conducto hepático común, que luego de unirse con el conducto cístico proveniente de la vesícula biliar, forma el conducto colédoco que desemboca en el duodeno a nivel de la ampolla de Vater, volcando de esta manera la secreción biliar al intestino.

La bilis es una solución acuosa de compuestos orgánicos e inorgánicos resultante de tres procesos: generación del flujo biliar canalicular, reabsorción y secreción a nivel de los conductos biliares. El flujo canalicular se origina como consecuencia del transporte de agua impulsado por un gradiente osmótico generado por el transporte de sustratos como sales biliares, HCO_3^- y glutatión entre otros. Junto con ellos se secretan distintos endo- y xenobióticos, entre ellos fármacos. La acumulación de aniones en el canalículo favorece la difusión de agua a través de canales desde el interior del hepatocito (vía transcelular) y desde el líquido extracelular a través de las uniones estrechas (vía paracelular). Luego de experimentar cambios de composición y osmolaridad a lo largo de las vías biliares y en la vesícula, la bilis llega al intestino y con ella los distintos xenobióticos que serán excretados del organismo [7].

2. Sistemas de biotransformación y transportadores de drogas

2.1. Sistemas de biotransformación de fase I

La excreción de xenobióticos puede ser favorecida mediante su modificación química. Las reacciones de fase I son, por lo general, las primeras reacciones de biotransformación que experimentan los fármacos al ingresar a la célula. Las consecuencias inmediatas de la acción de éstos sistemas son un aumento en la hidrosolubilidad del compuesto como así también un cambio en la actividad farmacológica

que puede implicar o bien una activación o una inactivación del mismo. Las reacciones de fase I implican reacciones de oxidoreducción catalizadas por citocromos del tipo P450. Existen más de 40 tipos distintos de reacciones entre los que pueden mencionarse: hidroxilación, epoxidación, dealquilación, N- y S-oxidación, dehalogenación, dehidrogenación, deaminación y desulfuración, entre otras.

Las enzimas tipo citocromo P450 que participan en las reacciones de fase I se encuentran divididas en tres familias (CYP1, 2, 3), las cuales a su vez se dividen en subfamilias (ej. CYP2A y CYP2B son dos subfamilias de la familia CYP2). Dentro de las subfamilias existen distintos miembros, por ejemplo CYP1A1 y CYP1A2.

Cuantitativamente, el hígado es el principal sitio de expresión y acción de los sistemas de fase I siendo también considerable la expresión y actividad en intestino y riñón [8]. Además, se ha descrito la expresión de miembros de las familias 1, 2 y 3 del citocromo P450 en tejido mamario, próstata, placenta y tejido neural entre otras localizaciones [9]. En cuanto a su localización intracelular, se ubican insertos en la membrana del retículo endoplasmático. La expresión de los miembros individuales del citocromo P450 muestra una gran variación interindividual dependiente de factores etarios [10], étnicos y nutricionales [11], entre otros.

Existen más de 1000 sustratos de los citocromos 1, 2 y 3. Si bien las tres familias revisten importancia farmacológica, la subfamilia CYP3A, y en particular el miembro CYP3A4 es responsable de la biotransformación de más del 50% de las drogas empleadas en la práctica clínica [12] y, en hígado, representa el 30% de los citocromos totales [8].

Algunos de los fármacos que experimentan reacciones de fase I y la/s enzima/s involucradas se detallan en la tabla 1 [13].

FAMILIA	SUBFAMILIA	SUSTRATOS
CYP1	A	aminas heterocíclicas, paracetamol
CYP2	B	ciclofosfamida, cloranfenicol, fenitoína, fenobarbital
CYP2	C	diazepam, diclofenac, ibuprofeno, naproxeno
CYP2	D	clorpromazina, codeína, metoprolol, propranolol
CYP3	A	carbamazepina, ciclosporina A, clotrimazol, dexametasona, diazepam, eritromicina, lidocaína, midazolam, rifampicina, verapamilo

Tabla 1. Principales subfamilias del citocromo P450 involucradas en reacciones de biotransformación de fase I y ejemplos de sustratos.

2.2. Sistemas de biotransformación de fase II

Los sistemas de biotransformación de fase II catalizan la conjugación de los productos de las reacciones de fase I como también de fármacos sin modificar con compuestos como glutatión en las reacciones catalizadas por las glutatión-S-transferasas (GSTs), ácido glucurónico en las reacciones catalizadas por las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs), el grupo sulfurilo de la adenosina 3'fosfato 5'fosfosulfato en las reacciones catalizadas por las sulfotransferasas (SULTs), el grupo acetilo del acetyl CoA en las reacciones catalizadas por las acetiltransferasas y el grupo metilo de la S-adenosilmetionina en las reacciones catalizadas por las metiltransferasas. El presente trabajo se focalizará específicamente en las UGTs y GSTs, las que en conjunto son responsables del metabolismo de fase II de más del 50% de las drogas usadas clínicamente [14-16]

2.2.1. UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs)

Las UGTs catalizan aproximadamente el 35% de las reacciones de fase II [17]. Se expresan en el lado luminal del retículo endoplasmático de hepatocitos, enterocitos y células de los túbulos renales entre otras localizaciones 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 [18].

La reacción de glucuronización catalizada por la UGT es una sustitución nucleofílica que resulta en la conjugación del fármaco o sus metabolitos de fase I con ácido glucurónico y la liberación de UDP como grupo saliente (Fig. 1). Los grupos nucleofílicos participantes pueden ser alcoholes alifáticos y aromáticos, ácidos carboxílicos, aminas y grupos tioles entre otros, y el resultado puede ser un O-, N-, C- o S-glucurónido más hidrosoluble que el compuesto de partida que es, a nivel del hígado, eliminado por vía biliar o volcado a la sangre sinusoidal [19]. Los productos formados exhiben, por lo general, una menor actividad farmacológica. Una excepción a la regla la constituye la morfina, ya que el 6-glucurónido es más activo que la morfina misma [20].

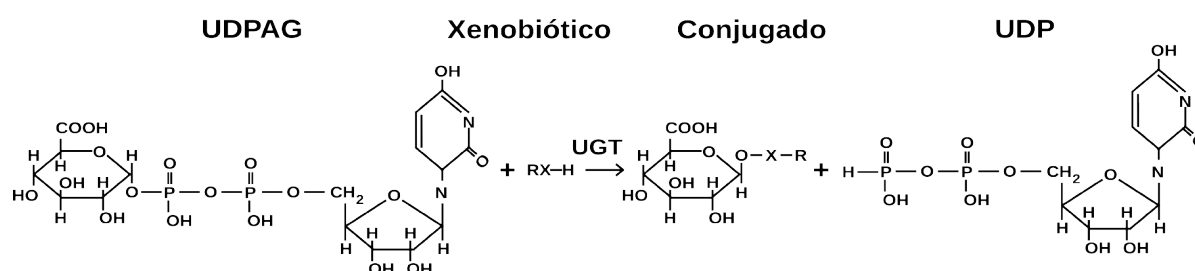


Fig. 1. Reacción de glucuronización catalizada por las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs).

Las UGTs humanas de relevancia farmacológica se dividen en dos familias: UGT1 y UGT2 y tres subfamilias UGT1A, UGT2A y UGT2B. Su expresión y función, al igual que la de los sistemas de fase I, varía en función del sexo del individuo, grupo étnico y estados fisiopatológicos o alteraciones genéticas como en el caso de los síndromes de Gilbert y Crigler-Najjar asociados a mutaciones en los genes codificantes de las UGTs [19,21].

Si bien no puede desestimarse la importancia de la familia de la UGT2, la subfamilia UGT1A en su conjunto participa de la conjugación del mayor número de fármacos entre los que pueden mencionarse paracetamol, naproxeno, ibuprofeno, diclofenac, etinilestradiol, etopósido, morfina y ácido valproico, entre otros. Sus miembros son codificados por un único locus y surgen por corte y empalme alternativo generándose proteínas con una porción N-terminal variable y una porción C-terminal común que permite su detección simultánea por inmunocuantificación [19].

El hígado es el sitio de glucuronización más importante. Los conjugados resultantes pueden ser excretados en bilis o bien basolateralmente. Los conjugados excretados a bilis pueden ser luego hidrolizados por acción de la β -glucuronidasa intestinal generando una aglicona que puede experimentar recirculación enterohepática y ser excretada en orina. Los conjugados excretados por la vía basolateral son filtrados a nivel renal y eliminados en orina.

2.2.2. Glutation-S-transferasas (GSTs)

Las GSTs catalizan sustituciones nucleofílicas aromáticas, sustituciones nucleofílicas de un carbono saturado, adiciones de Michael y reacciones con anillos de oxirano cuyo denominador común es la formación de un conjugado de glutation (Fig. 2). Su función es la detoxificación de compuestos electrofílicos entre los que se encuentran especies reactivas del oxígeno y compuestos generados por contacto con las mismas (ej. 4-hidroxinonenal). Entre los sustratos se encuentran epóxidos, cetonas α,β -insaturadas, ésteres, peróxidos y quinonas, entre otros [14,16]. Cada sustrato puede ser conjugado por más de una isoenzima.

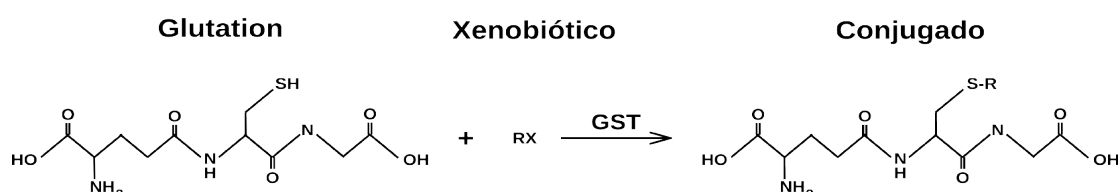


Fig. 2. Reacción de conjugación con GSH catalizada por las Glutation-S-transferasas (GSTs).

Las GSTs son enzimas diméricas y se dividen en 8 clases (α , μ , κ , π , σ , θ , ξ y ω). Su localización intracelular es por lo general citosólica aunque se ha observado expresión en núcleo, mitocondrias y peroxisomas. Se ha descrito expresión de GST en hígado, riñón y el tracto gastrointestinal entre otras localizaciones [16].

Los conjugados de glutatión que se forman en el hígado pueden ser secretados a bilis a través de la membrana apical llegando así al intestino, o bien ser secretados a la sangre sinusoidal a través de la membrana basolateral del hepatocito. Aquéllos secretados apicalmente pueden ser hidrolizados por la γ -glutamiltanspeptidasa de las vías biliares y del intestino y luego por la cisteinil glicina dipeptidasa o la aminopeptidasa M para producir un conjugado de cisteína que puede recircular enterohepáticamente y llegar al riñón donde son metabolizados a ácidos mercaptúricos y excretados en orina. Alternativamente, los compuestos son excretados directamente del hepatocito a la sangre sinusoidal, hidrolizados a nivel de los túbulos proximales renales, metabolizados a ácidos mercaptúricos y finalmente excretados en orina [14].

2.3. Proteínas transportadoras de drogas

En una célula, tanto el ingreso como el eflujo de fármacos puede tener lugar a través de proteínas transportadoras. Las mismas son proteínas transmembrana que facilitan el transporte de distintos compuestos a favor o en contra de un gradiente de concentración.

2.3.1. Transportadores de captación

Los transportadores de captación se expresan, fundamentalmente, en la membrana basolateral del hepatocito y en ambas membranas del enterocito y de las células tubulares renales. En el hepatocito y en las células renales posibilitan la captación de sustratos desde la sangre. En el enterocito, además, cumplen un rol en la absorción de distintos compuestos desde el *lumen* intestinal. Su función es particularmente relevante para la captación de aquellos compuestos que dada su hidrofiliidad y/o tamaño no difunden eficientemente a través de la bicapa lipídica.

Las proteínas de captación de mayor relevancia farmacológica pertenecen a los transportadores SLC y comprenden a las familias de las proteínas transportadoras de aniones orgánicos (OATPs), los transportadores de aniones orgánicos (OATs) [22] y los transportadores de cationes orgánicos (OCTs) [23]. Existen diversos miembros dentro de cada familia cuya expresión difiere en los distintos tejidos. Algunos sustratos

característicos de cada grupo de transportadores se detallan en la tabla 2.

	SUSTRATOS
OATPs	atorvastatina, atrasentán, bosentán, digoxina, docetaxel, enalapril, eritromicina, fexofenadina, fluvastatina, imatinib, metotrexato, olmesartán, paclitaxel, pravastatina, telmisartán
OATs	5-fluorouracilo, ácido valproico, bumetanida, captopril, furosemida, indometacina, ketoprofeno, losartán, metotrexato, olmesartán, penicilina G, tetraciclina, zidovudina
OCTs	aciclovir, atropina, cimetidina, debrisoquina, desipramina, ganciclovir, imatinib, lamivudina, metformina, pirilamina, quinina, ranitidina

Tabla 2. Principales familias de transportadores de captación de drogas y sustratos característicos de las mismas.

El mecanismo de transporte es multiespecífico. Mientras que en el caso de las OATPs y los OATs suele ser un contratransporte con otro anión (ej. bicarbonato, α -cetoglutarato), en el caso de los OCTs puede tratarse también de una difusión facilitada movida por el gradiente electroquímico del catión transportado [22]. Debido a su característica bidireccional es que en las células renales ciertos transportadores pueden participar también en la secreción de compuestos a la orina [24]. Un diagrama de la localización de los principales sistemas de biotransformación y transportadores de fármacos se muestra en la figura 3.

2.3.2. Transportadores de eflujo

Facilitan el transporte de endo- y xenobióticos desde el interior al exterior celular. Existen transportadores apicales expresados en membrana canalicular del hepatocito y en la membrana luminal de las células tubulares renales y de los enterocitos, entre otros tejidos. Cumplen un rol en la secreción de fármacos a bilis, a orina y al *lumen* intestinal respectivamente. Entre ellos puede mencionarse a la P-glicoproteína (P-gp), a la proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (MRP2) y a la proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP).

Por otro lado, los transportadores basolaterales se expresan en la membrana sinusoidal del hepatocito y en las membranas basolaterales de células tubulares renales y de los enterocitos, facilitando el transporte de compuestos desde la célula a la sangre. Entre ellos puede mencionarse a la proteína asociada a resistencia a multidroga 3 (MRP3), a la proteína asociada a resistencia a multidroga 1 (MRP1) de expresión extrahepática y a la proteína asociada a resistencia a multidroga 4 (MRP4). Cabe aclarar

que en riñón MRP4 exhibe una localización apical (Fig. 3). En el presente Trabajo de Tesis se evaluará particularmente P-gp, MRP2 y BCRP como transportadores apicales y MRP3 como transportador basolateral.

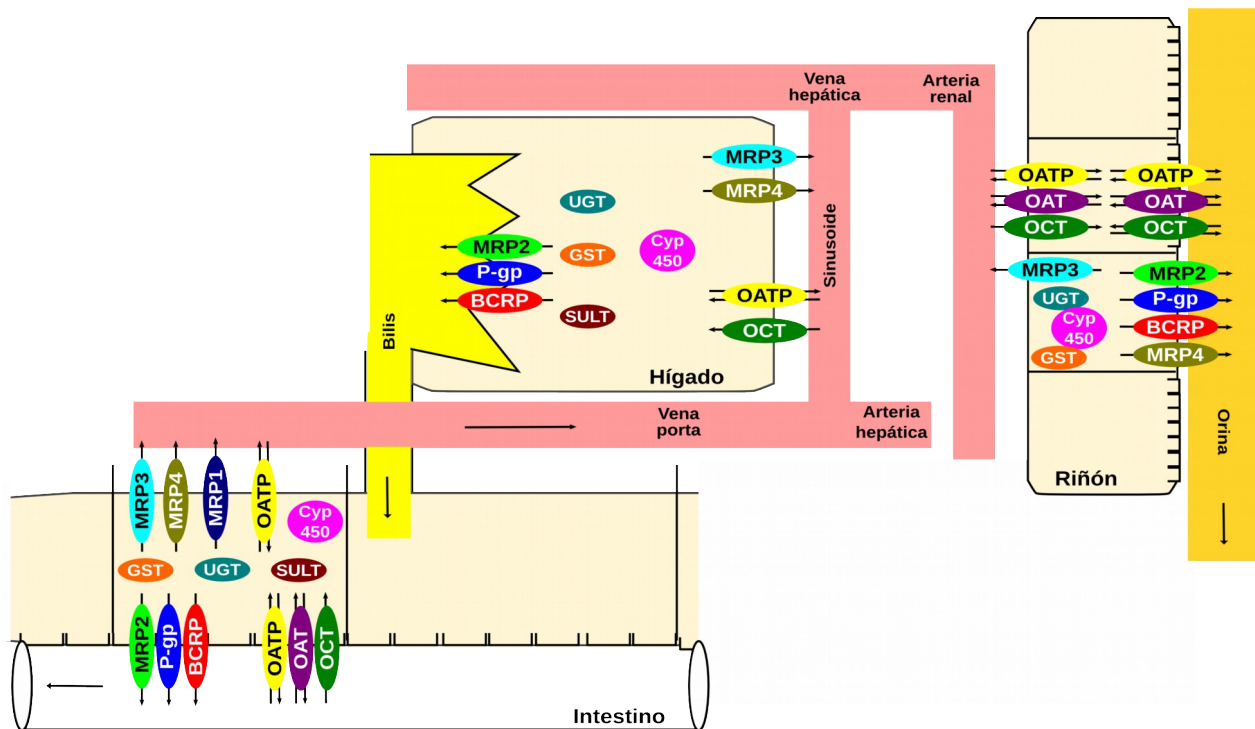


Fig. 3. Localización de los principales sistemas de biotransformación y transportadores de drogas en órganos de relevancia farmacológica.

2.3.2.1. P-glicoproteína (P-gp)

La P-glicoproteína (P-gp, MDR1, ABCB1) fue descubierta en la década del 70. Su presencia en una línea celular derivada de ovario de hamster chino (células CHO) reducía la permeabilidad de colchicina y otras drogas anfipáticas [25]. P-gp es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de los transportadores ABC (*ATP Binding Cassettes*) caracterizada por dos dominios de 6 segmentos transmembrana cada uno y un sitio de unión a ATP en el extremo C-terminal de cada dominio (Fig. 4) [26]. Su expresión se observó en la membrana plasmática de células polarizadas como la membrana canalicular del hepatocito, la membrana apical de células tubulares renales, la membrana apical del enterocito y la membrana luminal de células endoteliales de la barrera hematoencefálica [27,28]. También se ha descrito su expresión en células hematopoyéticas, leucocitos y placenta [29]. Además se ha observado expresión de P-gp en diversas células tumorales y líneas celulares [30-33].

P-gp transporta xenobióticos desde el interior hacia el exterior celular en forma activa dependiente de ATP. Los compuestos transportados presentan una gran variedad

de estructuras químicas y tamaño. Por ejemplo, la cimetidina (PM = 250 Da) es sustrato de P-gp al igual que la gramicidina D (PM = 1900 Da). Los rasgos comunes de los sustratos que se transportan con mayor eficiencia son su hidrofobicidad y su naturaleza anfipática. La presencia de grupos con carga positiva dentro de la molécula también aumenta la eficiencia del transporte, aunque compuestos acídicos también pueden ser transportados [29]. Algunos fármacos transportados por P-gp se detallan en la tabla 3.

La presencia de P-gp en un dado tipo celular tiene múltiples implicancias. Por un lado, reduce la concentración intracelular de xenobióticos y debido a esto es que se ha caracterizado a P-gp como un factor de resistencia en células tumorales al reducir la concentración intracelular de drogas citostáticas en contacto con el ADN. En un estudio clínico publicado en el año 2001 se observó que pacientes con leucemia mieloide aguda que recibían ciclosporina A (inhibidor de P-gp) en conjunto con el tratamiento de citarabina + daunorubicina mostraban concentraciones séricas de daunorubicina, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad significativamente mayores que los pacientes que no habían recibido ciclosporina A [34]. En células Caco-2, derivadas de un adenocarcinoma de colon humano, P-gp también protege a la célula de la acumulación de sustancias potencialmente nocivas [35]. Por otro lado, en diversas pruebas clínicas se ha observado que el transporte mediado por P-gp cumple un rol clave en la depuración sistémica de xenobióticos. Por ejemplo, sujetos homocigotas (TT) para el polimorfismo C3435T exhiben una menor expresión de P-gp intestinal y mayores niveles plasmáticos de digoxina [36]. En relación con esto se observó que sujetos homocigotas GG para el polimorfismo G2677T, el cual en estudios *in vitro* se asoció a menor actividad de P-gp, mostraban un valor de área bajo la curva (AUC) luego de la administración de fexofenadina al menos 40% mayor que los sujetos heterocigotas o homocigotas TT [37].

2.3.2.2. Proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (MRP2)

MRP2 (ABCC2) pertenece a la familia de las MRPs, la cual a su vez pertenece a la familia de los transportadores ABC. Las MRPs, al igual que P-gp, se caracterizan estructuralmente por la presencia de dos dominios formados por seis segmentos transmembrana cada uno y un dominio de unión a ATP ubicado en sentido C-terminal del último segmento. Algunas MRPs tales como MRP2 y MRP3 poseen un dominio adicional N-terminal con 5 segmentos transmembrana (Fig. 4) [38,39].

El descubrimiento de MRP2 fue facilitado por la existencia de dos cepas de ratas (EHBR y GY/TR) que exhibían hiperbilirrubinemia y una excreción biliar deficiente de

leucotrieno C4 conjugado con glutathion y de otros aniones orgánicos. Sin embargo, la excreción biliar de un derivado del glicocolato (sustrato de BSEP/ABCB11) y de daunomicina (sustrato de P-gp) permanecía sin alteraciones [40]. En seres humanos, por otro lado, se había observado una excreción deficiente de aniones orgánicos e hiperbilirrubinemia en pacientes con el síndrome de Dubin-Johnson [41]. En 1991, Akerboom y col. [42] caracterizaron el transporte ATP dependiente de dinitrofenil-S-glutathion (DNP-SG) en vesículas de membranas plasmáticas de hígado de rata. El transporte era inhibido por glutathion oxidado y taurocolato los que también eran transportados a través de las vesículas. Poco tiempo después Cole y col. [43] lograron clonar un gen que codificaba una proteína que se encontraba sobreexpresada en una línea celular de cáncer de pulmón resistente a la doxorubicina. La misma no era inhibible por ciclosporina A como P-gp y fue denominada proteína asociada a resistencia a multidroga (MRP). Büchler y col. [44] describieron una isoforma hepática de expresión canalicular de MRP que no se expresaba en ratas GY/TR⁻ ni EHBR. Su ausencia era también la determinante del síndrome de Dubin-Johnson en humanos [45]. La nueva proteína se denominó MRP2 por su similitud con la MRP previamente descrita por Cole y col. [43,46]. En los años siguientes se caracterizó la expresión de MRP2 en el dominio apical de células de los túbulos proximales renales [47] y del enterocito [48]. También se ha observado expresión de MRP2 en capilares de la barrera hematoencefálica y en diversos tumores humanos [49].

MRP2 transporta un amplio espectro de sustratos endo- y xenobióticos, por lo general aniones orgánicos conjugados con glucuronato o con glutathion pero pudiendo transportar también distintos aniones sin conjugar. El glutathion (tanto oxidado como reducido) también es sustrato de MRP2 [50]. Algunos ejemplos de fármacos que son transportados por MRP2 se mencionan en la tabla 3.

La localización de MRP2 le otorga un rol fundamental en la excreción de sustratos a bilis, orina y a nivel intestinal donde, además, representa una primera barrera para la absorción oral de xenobióticos [50].

Cambios en la actividad de MRP2 podrían modificar la excreción de sus sustratos y, por ende, su acumulación pudiendo entrañar consecuencias farmacológicas (menor biodisponibilidad debido a una mayor actividad del transportador) y toxicológicas (debido a una menor actividad del transportador). Se ha observado, por ejemplo, que ratas TR⁻ exhibían una menor excreción biliar e intestinal del cancerígeno asociado a los alimentos 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP) [51]. Un resultado similar se observó

en ratones *knock out* para Mrp2 a los que se les administró el citostático paclitaxel. Los mismos mostraron una mayor AUC cuando el agente era administrado en forma intravenosa. El mismo efecto se observó cuando la droga era administrada por vía oral bajo la condición de que el animal no poseyera P-gp funcional. En otro estudio, se observó que la administración de etinilestradiol a ratas y, su consecuente inhibición de la expresión de MRP2, reducía la depuración biliar de doxorubicina y aumentaban su AUC en aproximadamente un 60% [52].

En estudios clínicos se observó que la administración de rifampicina reducía el AUC del ácido micofenólico, lo que puede deberse a la inducción de MRP2 por rifampicina [53]. En otro estudio se observó una expresión mayor de MRP2 en hígados de sujetos heterocigotas CG en la posición 1446 respecto de la variante CC. Los portadores de la variante CG exhibieron una menor AUC para pravastatina que los de la variante CC [54].

Al igual que en el caso de P-gp, se ha asociado a MRP2 con una menor acumulación de sustancias citostáticas en células tumorales. La inhibición de su expresión y/o actividad se asoció con una sensibilización de las mismas [50]. No obstante, aún no existe evidencia contundente acerca de una correlación entre MRP2 y el éxito de un tratamiento específico o el pronóstico de la enfermedad.

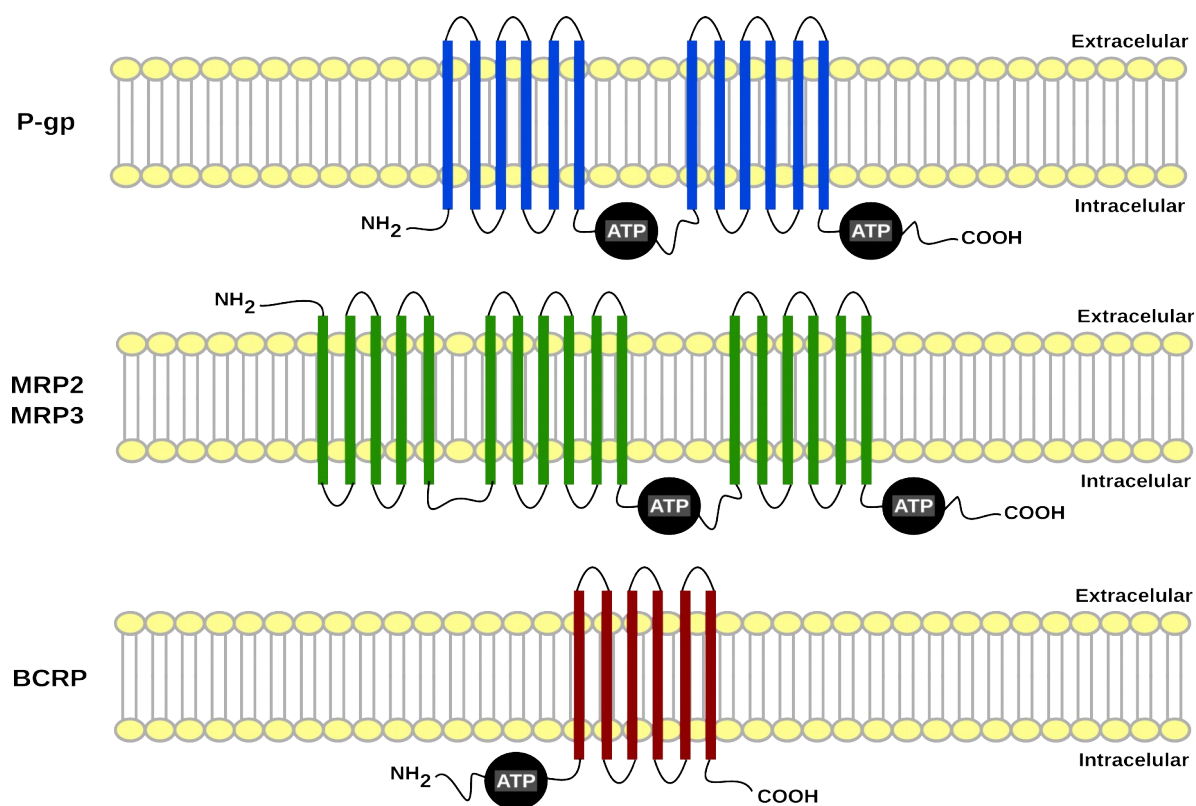


Fig. 4. Estructura de las proteínas transportadoras de drogas P-gp, MRP2, MRP3 y BCRP.

2.3.2.3. Proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP)

La proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP/ABCG2) debe su nombre al hecho de haber sido descubierta en la línea celular MCF-7 derivada de un carcinoma de mama. En dicha línea celular, Doyle y col. descubrieron la presencia de clones con menor acumulación de daunorubicina que se asociaba a la presencia de un polipéptido de 655 aminoácidos sin sobreexpresión de otros transportadores ya conocidos en ese momento [55]. A diferencia de los demás transportadores analizados en esta sección, BCRP es una proteína de 72 kDa y se caracteriza estructuralmente por la presencia de un único dominio formado por 6 segmentos transmembrana y un dominio de unión a ATP hacia N-terminal. Para su funcionamiento, no obstante, se requiere su homodimerización (Fig. 4) [56].

La expresión de BCRP fue descrita en distintos epitelios polarizados o tejidos con función de barrera; por ejemplo: membrana canalicular del hepatocito, membrana apical de enterocitos, membrana apical de células de los túbulos proximales renales, membrana apical del sinciciotrofoblasto, membranas apicales de células mioideas de la barrera hematotesticular, membrana luminal de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y membrana apical de las células epiteliales alveolares de la glándula mamaria [57,58].

BCRP transporta un variado rango de sustratos, fundamentalmente xenobióticos, tanto conjugados como sin conjugar (tabla 3), siendo algunos de ellos también transportados por otras proteínas. Particularmente a nivel de la glándula mamaria y mediante estudios con ratones *knock out Abcg2^{-/-}*, se asoció a BCRP con el transporte de riboflavina hacia la leche [57].

La actividad de BCRP, al igual que la de P-gp, posee múltiples implicancias. Por un lado reduce la concentración intracelular de drogas, lo que es de particular importancia en las células tumorales. Además de lo descrito por Doyle y col. en células MCF-7 [55], se observó que dos líneas celulares polarizadas (LLC-PK y MDCK-II) sobreexpresando BCRP transportaban mayores niveles de topotecán en sentido basolateral-apical que las células controles sin sobreexpresión del transportador [59]. Además, la actividad de BCRP a nivel hepático, renal e intestinal favorece la excreción de fármacos disminuyendo su biodisponibilidad. Entre ellos se encuentran compuestos empleados en la quimioterapia del cáncer. Esto implica que, además de disminuir la concentración intracelular del compuesto, BCRP también estaría disminuyendo la concentración del fármaco a nivel sistémico y de esa manera la concentración del mismo que llega a las células tumorales. Por ejemplo, se observó que pacientes con carcinoma renal portadores del genotipo AA

en el polimorfismo C421A asociado a una menor actividad de BCRP exhibían una mayor concentración plasmática de sunitinib luego de una administración oral que los heterocigotas o los homocigotas CC. Así mismo el AUC resultó menor en los pacientes con el genotipo CC que en los demás grupos [60]. En otro estudio se observó que pacientes con cáncer de ovario o de células pequeñas de pulmón heterocigotas CA en la misma posición exhibían una mayor AUC luego de la administración oral de topotecán que los pacientes homocigotas CC [61]. Además se observó que BCRP afecta la biodisponibilidad de otros tipos de fármacos, como por ejemplo ciprofloxacina [62].

Por último, la función de BCRP a nivel de barrera hematoencefálica, barrera hematotesticular y placenta propicia el mantenimiento de concentraciones bajas de sus sustratos en sistema nervioso central, túbulos seminíferos y a nivel del feto previniendo los potenciales efectos nocivos de fármacos y tóxicos [63].

2.3.2.4. Proteína asociada a resistencia a multidrogas 3 (MRP3)

MRP3 (ABCC3) fue descrita por primera vez a finales de la década del 90 cuando se descubrió la existencia en el genoma humano de homólogos de los transportadores MRP1 y MRP2 previamente descubiertos. Los mismos autores hallaron una alta expresión a nivel de ARNm mediante el ensayo de protección con ARNasa en hígado e intestino y una menor expresión en riñón [64]. Un estudio similar de König y col. [65] confirmó los descubrimientos anteriores demostrando además la localización a nivel de la membrana basolateral del hepatocito. A nivel intestinal, en rata, se describió una expresión proteica en la membrana basolateral del enterocito creciente en dirección distal siendo máxima en colon [66].

MRP3, al igual que MRP2, transporta aniones orgánicos conjugados. No obstante, a diferencia de MRP2, MRP3 transporta los conjugados de ácido glucurónico con mayor eficiencia que los de glutatión. En la tabla 3 se detallan ejemplos de sustratos de relevancia farmacológica [22].

Dada su localización basolateral, MRP3 media el transporte de sustratos desde el interior celular hacia la sangre. En el caso del hepatocito, la secreción a la sangre sinusoidal posibilita la posterior excreción a nivel renal ofreciendo una ruta de eliminación alternativa a la vía biliar aunque en condiciones basales en ratas y humanos su expresión es baja. En relación con esto, la expresión de MRP3 en hígado de ratas EHBR y sometidas a ligadura del conducto colédoco resultó mayor que en ratas Sprague Dawley controles [67,68]. Una observación similar se obtuvo en pacientes con síndrome de

Dubin-Johnson [65]. Por lo que se postuló que existiría una sobreexpresión compensatoria de MRP3 en situaciones en las que la expresión de MRP2 se encuentra disminuida. En otras situaciones, aún sin disminución de la expresión de MRP2, la inducción de MRP3 puede desencadenar un redireccionamiento de la excreción de sustratos de MRP2 hacia sangre vía MRP3 como fuera observado en ratas para el glucurónido de paracetamol [69].

PROTEÍNA	SUSTRATOS
P-gp	actinomicina D, colchicina, ciclosporina A, daunorubicina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, erlotinib, eritromicina, fexofenadina, imatinib, ivermectina, loperamida, losartán, lovastatina, nelfinavir, paclitaxel, ritonavir, saquinavir, topotecán, verapamilo, vinblastina, vincristina
MRP2	glucurónidos de paracetamol, diclofenac, etinilestradiol y morfina; ácido etacrínico y 4-hidroxinonenal conjugados a glutatión; metotrexato, ritonavir, saquinavir, vinblastina
BCRP	abacavir, albendazol, ciprofloxacina, daunorubicina, erlotinib, etopósido, furosemida, gefitinib, hidroclorotiazida, imatinib, lamivudina, lapatinib, metotrexato, mitoxantrona, nitrofurantoina, norfloxacina, prazosina, resveratrol 3-sulfato, rosuvastatina, sunitinib, topotecán, zidovudina
MRP3	glucurónidos de paracetamol, etinilestradiol, etopósido, morfina, resveratrol; leucovorina, metotrexato

Tabla 3. Sustratos de los transportadores P-gp, MRP2, BCRP y MRP3.

Al igual que para los demás transportadores analizados, cambios en MRP3 pueden modificar la farmacocinética y el efecto terapéutico de distintas drogas. Esto se observó, por ejemplo, en el tratamiento con morfina, la que se puede conjugar formando morfina-3-glucurónido (M3G) y morfina-6-glucurónido (M6G), siendo el segundo metabolito el que presenta mayor poder analgésico. En ratones, dado que la expresión constitutiva de MRP3 es considerable, la secreción hepática de ambos metabolitos es fundamentalmente a sangre vía MRP3 seguida de excreción urinaria. La administración intravenosa de morfina a ratones *Mrp3^{-/-}* da como resultado niveles plasmáticos de M3G significativamente menores que en ratones *wild type*. Al administrar el metabolito activo M6G, el cual no es sintetizado *in vivo* en ratones, se observó una disminución del efecto

antinociceptivo en ratones *knock out* respecto de los salvajes [70]. Un efecto similar se observó luego de la administración de paracetamol, en cuyo caso los ratones *Mrp3^{-/-}* exhiben una concentración plasmática 10 veces menor que los tipo salvaje [71].

La actividad de MRP3 también se asoció *in vitro* con una menor concentración intracelular de drogas citostáticas y/o citotóxicas empleadas en la quimioterapia del cáncer [72]. En un estudio clínico se asoció además a la sobreexpresión de MRP3 con un peor pronóstico en pacientes con leucemia linfoblástica aguda infantil [73].

3. Regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas

3.1. Generalidades

Tanto en el caso de los sistemas de biotransformación como de los transportadores de drogas existe una regulación dinámica. En la mayoría de los casos, estos sistemas actúan en respuesta a cambios en las concentraciones de endo- y xenobióticos en el organismo. Si bien el objetivo de su función es el restablecimiento de los niveles basales de dichos compuestos o, al menos, contrarrestar la elevación recientemente producida, los cambios ocasionados pueden también generar interacciones droga-droga. Los mecanismos reguladores pueden dividirse en 4 niveles:

La **regulación transcripcional** implica un cambio en la síntesis de ARNm. Es el más lento de los mecanismos e involucra vías nucleares de transducción de señales, ej. receptores nucleares.

Por otro lado, la regulación **postranscripcional** implica, por lo general, cambios en la estabilidad del ARNm. En células HepG2 se observó que la inducción de CYP3A4 por etanol cursaba con un mayor tiempo de vida media del ARNm [74]. Esto permitiría explicar la mayor expresión del mensajero observada tiempo después *in vivo* en pacientes alcohólicos de estadios no avanzados [75]. En el caso de los sistemas de fase II, Wareing y col. [76] ya habían sugerido la estabilización del ARNm como mecanismo responsable de la mayor expresión de GST α y GST π en una línea celular resistente al CDNB. Para P-gp, por su parte, se observó una inducción por estabilización del ARNm en el tratamiento con el antiparasitario ivermectina en una línea celular hepática de origen murino. La inducción se reflejaba en una mayor actividad del transportador con potenciales consecuencias farmacológicas [77].

La **regulación traduccional** implica cambios a nivel de la síntesis de proteína y

suele reconocerse cuando existe un cambio en los niveles de proteína sin cambios o con cambios inversos en los niveles de ARNm. Los mecanismos de regulación traduccional son diversos. Uno de ellos es la regulación por micro ARNs (miRs), como puede ocurrir con MRP2 en células HepG2 tratadas con RIF. En este caso, se observó un aumento en la expresión del ARNm y una disminución en la proteína que estaría asociada a una sobreexpresión del miR-379 inducida por RIF. La interacción con el miR a nivel del extremo 3' no traducido del ARNm de MRP2 produce una inhibición de la traducción [78]. La regulación vía miRs también se demostró para P-gp y CYP3A4 [79,80]. Para MRP2 se describió también una regulación traduccional en función de la región 5' no traducida presente en el mensajero que modificaría la interacción con los ribosomas [81,82].

Finalmente la regulación **postraduccional**, el más rápido de los mecanismos, opera en cuestión de minutos e involucra cambios en los niveles de actividad de la proteína sin cambios en su expresión. Para los sistemas enzimáticos de biotransformación, el mecanismo más común es la inhibición enzimática. En el caso del CYP3A4, por ejemplo, la inhibición puede ser reversible o irreversible por unión covalente a la enzima (ej. irinotecán) o al grupo hemo (claritromicina) [12,83]. Por otro lado, se demostró que el ácido etacrínico, la camptotecina y la indometacina, entre otros fármacos, son inhibidores de distintas isoformas de la GST [84]. En el caso de las proteínas transportadoras la regulación puede ser por cambios reversibles en la localización [85,86]. Un ejemplo lo constituye la colestasis por faloidina, donde se observa la endocitosis de MRP2 en un lapso de 30 minutos [87]. No obstante, también puede darse una inhibición a corto plazo reversible de la actividad, por lo general de carácter competitivo [12,88].

Si bien no puede descartarse la importancia de ninguno de los mecanismos anteriores, en el caso de la regulación por fármacos y, particularmente, por fármacos de naturaleza hidrofóbica, el mecanismo transcripcional es el de mayor frecuencia.

3.2. Regulación transcripcional de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas

3.2.1. Generalidades. Receptores nucleares

El mecanismo más estudiado de regulación de sistemas de biotransformación y transporte por fármacos es el transcripcional. En la mayoría de los casos se encuentra mediado por **receptores nucleares**. Los mismos son factores de transcripción de

localización citoplasmática y/o nuclear que, en general, se activan por ligando. Luego de su activación, se unen a secuencias reguladoras específicas de sus genes blanco modificando así sus niveles de expresión.

A nivel estructural, los receptores nucleares poseen 5 ó 6 dominios con funciones conservadas designados alfabéticamente del dominio A al dominio F en dirección N-terminal a C-terminal (Fig. 5). En el extremo N-terminal se encuentra la región A/B, la cual es altamente variable de receptor a receptor. Esta aloja a la función de activación 1 (AF1) en la que radica la actividad de ciertos receptores nucleares en ausencia de ligando. La región A/B también suele ser blanco de fosforilaciones.

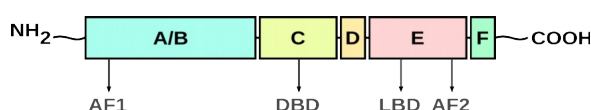


Fig. 5. Estructura general de los receptores nucleares.

A continuación se ubica la región C que corresponde al dominio de unión al ADN (DBD) y representa el dominio más conservado entre los distintos receptores nucleares. También suele ser blanco de modificaciones postraduccionales. A continuación se ubica la región D o bisagra, que suele alojar secuencias de localización nuclear. Seguidamente, se encuentra el dominio de unión a ligando (LBD) o región E, el cual se encuentra menos conservado que el DBD. El LBD contiene cuatro estructuras bien diferenciadas. La primera de ellas es la superficie de dimerización que media la interacción con otros receptores nucleares, ya que por lo general, los receptores nucleares actúan como homodímeros (ej. receptor de estrógenos) o heterodímeros (ej. receptor de vitamina D, receptor de pregnanos X). El LBD también contiene un bolsillo hidrofóbico donde se une el ligando, una región de unión a proteínas coreguladoras y la función de activación 2 (AF2). La región F de los receptores nucleares corresponde al extremo C-terminal.

Los receptores nucleares en estado no activado pueden encontrarse ya unidos al ADN o bien encontrarse libres en el núcleo o en el citoplasma. Luego de la unión del ligando tienen lugar cambios conformacionales en la AF2 que hacen a la superficie de la proteína más apta para la interacción con proteínas coreguladoras. Las mismas son también factores de transcripción que suelen tener actividad remodeladora de la cromatina (ej. histona desacetilasa, histona acetiltransferasa o histona metiltransferasa). En caso de que el efecto sea activador de la transcripción, tendrá lugar el reclutamiento de coactivadores con actividad histona acetiltransferasa o metiltransferasa que hacen la

cromatina más accesible para la maquinaria transcripcional (factores generales de la transcripción y ARN polimerasa II) [89].

3.2.2. Receptor de Pregnanos X. Mecanismo de acción

El receptor de pregnanos X (PXR, NR1I2) es el receptor nuclear más importante en la mediación del efecto de fármacos y xenobióticos en general, sobre la expresión de los sistemas de biotransformación y excreción de los mismos. PXR fue clonado por primera vez a partir de una biblioteca de hígado de ratón [90]. El receptor nuclear recientemente clonado formaba un heterodímero con el receptor X de retinoides α (RXR α , NR2B1), era activado por derivados de la pregnenolona y otros compuestos como dexametasona y mifepristona y se unía a secuencias reguladoras del gen que codifica al CYP3A1 murino [90]. Posteriormente se clonaron los receptores de origen humano, de conejo y de rata, lo que permitió establecer comparaciones entre ellos. Los DBDs exhiben un alto porcentaje de similitud interespecífica. La mayor de las diferencias se registra al comparar a PXR de conejo con PXR de ratón, donde la identidad es del 92,5%. En los demás casos la identidad observada es mayor. Por el contrario, el LBD constituye la región de mayor variabilidad interespecífica dentro de PXR. En este caso el porcentaje de identidad al comparar entre los LBDs de PXR de distintas especies asciende a no más del 82%. Las diferencias a nivel del LBD son las responsables de la activación específica de especie. Así, por ejemplo, rifampicina (RIF) es un activador de PXR de origen humano y de conejo pero no de PXR de rata ni de ratón. Por el contrario, pregnenolona 16 α -carbonitrilo (PCN) es un activador del receptor de rata, ratón y conejo pero no del receptor de origen humano [91].

Hasta el momento se han observado altos niveles de expresión de PXR en hígado e intestino. También se ha observado expresión de PXR, aunque con niveles inferiores, en riñón, pulmón, estómago, monocitos, capilares de la barrera hematoencefálica, útero, ovario, placenta, glándula mamaria, osteoclastos, corazón, glándulas adrenales, células progenitoras de la médula ósea, ciertas regiones del cerebro y en diversas células tumorales [92].

La importancia de PXR en la regulación de los sistemas en cuestión se basa en dos pilares. Por un lado, su elevada promiscuidad en lo que hace a la unión de ligandos y, por otro lado, su unión a las secuencias reguladoras de un gran número de genes entre los que se encuentran sistemas de biotransformación de fase I, de fase II y transportadores de drogas, entre otros [93].

La elevada promiscuidad de PXR se debe a la presencia de un bolsillo hidrofóbico de gran tamaño (1200 Å³). El mismo goza además de una flexibilidad que le permite expandirse hasta 1600 Å³ y acomodar compuestos de tamaños y, fundamentalmente, de estructuras químicas variables. Si bien para algunos de ellos aún no se ha probado su rol como ligando de PXR, es decir su unión al bolsillo hidrofóbico del mismo, una lista de compuestos activadores de PXR se presenta en la tabla 4 [94-111].

FÁRMACOS		TÓXICOS AMBIENTALES
Bosentán	Macitentan	Bisfenol A
Carbamazepina	Mifepristona (RU486)	Cipermetrina
Ciclofosfamida	Nifedipina	Endosulfano
Ciproterona Acetato	Nilotinib	Fenvalerato
Cisplatino	Paclitaxel	Lindano
Clotrimazol	Rifampicina	Metoxicloro
Dexametasona	Rilpivirina	Nonilfenol
Efavirenz	SR12813	Trans-nonacloro
Erlotinib	Sulfadimidina	Zearalenona
Espironolactona	Sulfinpirazona	
Fenitoína	Tadalafil	COMPUESTOS DE LA DIETA
Fenobarbital	Tamoxifeno	
Flutamida	Triclosano	Daidzeína
Gefinitib	Troglitazona	Gingkólidos A y B
Hiperforina	Vinblastina	Genisteína
Ifosfamida	Vincristina	Piperina
Lovastatina	Voriconazol	

COMPUESTOS ENDÓGENOS		
Ácido 3-cetolítico	Ácido lítico	Estradiol
Ácido cólico	Corticosterona	Pregnenolona
Ácido desoxicólico	Dehidroepiandrosterona	Progesterona

Tabla 4. Activadores de PXR. La tabla detalla fármacos, tóxicos ambientales, compuestos ingeridos con la dieta y compuestos endógenos para los cuales se ha demostrado un rol activador y/o como ligando de PXR.

Existen dos modelos que pretenden explicar el mecanismo de activación de PXR. En

un primer estudio, se describió la localización de PXR sobreexpresado en células HeLa íntegramente en el núcleo de las mismas. Para ello, era necesaria la presencia de una secuencia de localización nuclear (NLS) bipartita ubicada en el extremo N-terminal de PXR. Mutaciones en la NLS también eran responsables de una disminución en la capacidad de activar la expresión de un gen reportero sensible a PXR luego de la exposición a RIF [112]. En los años posteriores, Saradhi y col. [113] mostraron la localización también nuclear de PXR en células COS y su unión a los cromosomas durante la mitosis. En estas condiciones PXR ya se encontraría unido a RXR α . Sumado a esto, Johnson y col. [114] demostraron la interacción de PXR con el mediador del silenciamiento de los receptores de retinoides y hormona tiroidea, también llamado correpressor de receptores nucleares 2 (SMRT/NCoR2) a nivel del núcleo de las mismas células. También se demostró la interacción de PXR con otras proteínas correpressoras como *small heterodimer partner* (SHP) y el correpressor de receptores nucleares 1 (NCoR1) [115]. Las mismas tienen función remodeladora de la cromatina, principalmente debido a su actividad histona desacetilasa. Lo anterior permite postular un modelo en el cual, PXR se podría comportar como represor de la expresión génica en ausencia de ligando, condición que dada su promiscuidad, sería difícil de observar. Ante el agregado o el incremento en la concentración de un ligando (activación del receptor) se produciría la disociación de los correpresores y la unión de coactivadores. Entre estos últimos se encuentran la proteína p300 [116], los coactivadores de receptores de esteroides 1 y 2 (SRC1 y SRC2), la proteína de interacción con receptores nucleares (NRIP1), el factor nuclear hepático 4 α (HNF4 α) y el coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales (PGC) [115,117,118]. Los coactivadores, al igual que los correpresores, poseen actividad remodeladora de la cromatina, predominando en este caso la actividad histona acetiltransferasa, la cual favorece la decondensación de la cromatina. Además, los coactivadores sirven de puente entre la secuencia promotora del ADN y la maquinaria de la transcripción (Fig. 6A).

En otro modelo, demostrado para PXR de ratón, PXR se encuentra en condiciones de reposo en el citoplasma anclado a la proteína de retención citoplasmática del receptor constitutivo de androstanos (CCRP) y la proteína de choque térmico 90 (Hsp90). A las 3 h luego del tratamiento con PCN, comienza a incrementarse la cantidad de PXR en el núcleo, llegando a un pico luego de las 8 h y comenzando a disminuir luego de las 17 h, momento en el cual comienza a registrarse un aumento en los niveles de ARNm de un gen blanco (CYP3A11). La translocación al núcleo es dependiente de la NLS ubicada en

el DBD y de una secuencia de respuesta a xenobióticos (XRS) ubicada en el extremo C-terminal del LBD [119]. Luego de la unión del ligando, el receptor se disocia de CCRP y Hsp90 y migra al núcleo donde heterodimeriza con RXR α y une coactivadores con actividad remodeladora de la cromatina favoreciendo la activación de la expresión génica (Fig. 6B).

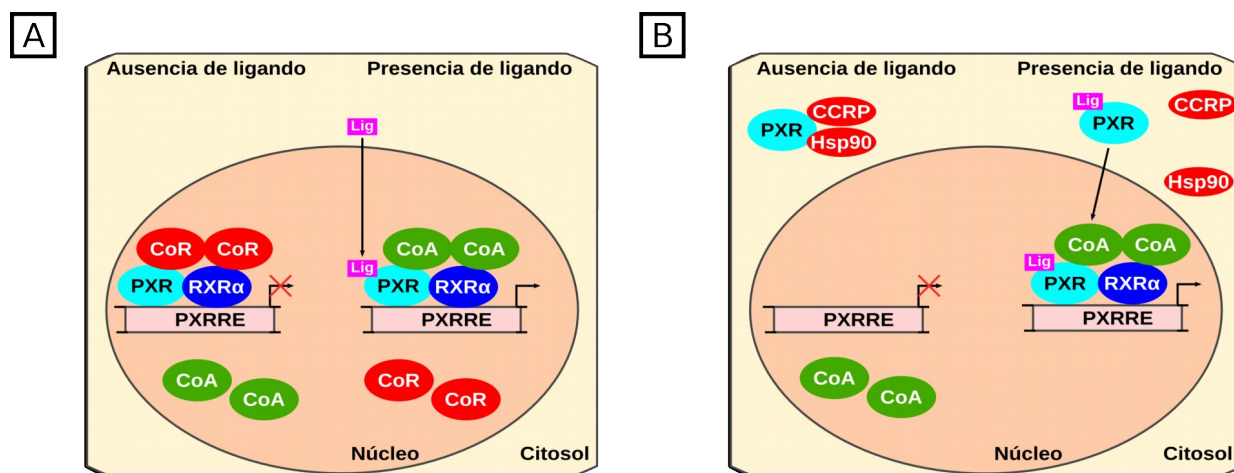


Fig. 6. Modelos de activación de PXR. A. Mecanismo con localización nuclear de PXR e intercambio de correpresores por coactivadores luego del agregado de ligando. B: Mecanismo con localización citoplasmática de PXR y migración al núcleo luego de la activación por ligando. CCRP: proteína de retención citoplasmática de CAR, CoA: proteína coactivadora, CoR: proteína correpresora, Hsp90: proteína de choque térmico 90, PXRRE: elemento de respuesta a PXR.

Por otro lado, la función de PXR es sensible a distintas modificaciones postraduccionales [92]. También se ha descrito la regulación de PXR por fosforilación por las proteinquinasas A y C [120,121] y por la quinasa dependiente de ciclina 2 [122]. PXR también puede experimentar acetilación, sumolización y ubiquitinación [123,124], permitiendo la integración de distintas señales sobre la regulación de la expresión génica por xenobióticos.

Otro receptor nuclear que participa en la regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por xenobióticos es el receptor constitutivo de androstanos (CAR, NR1I3). Sin embargo, hasta el momento, se conocen muy pocos fármacos capaces de regular la expresión génica a través del mismo (ácido valproico, fenobarbital) [125]. El receptor X de farnesoides α (FXR α , NR1H4), el receptor X hepático α (LXR α , NR1H3) y el receptor de vitamina D (VDR, NR1I1) también participan en la regulación de sistemas metabolizadores y transportadores de drogas. Entre sus agonistas

se cuentan fundamentalmente, y a diferencia de PXR, compuestos endógenos [126-128].

3.2.3. Regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por fármacos a nivel transcripcional. Rol de PXR

3.2.3.1. Regulación de sistemas de fase I

Los sistemas enzimáticos de fase I fueron los primeros sistemas estudiados en cuanto a su regulación por PXR. La proteína más estudiada es CYP3A4, debido a su abundancia y fundamentalmente a sus implicancias farmacológicas. Incluso antes del descubrimiento de PXR, se había observado la inducción de la expresión del CYP3A4 en hepatocitos humanos por RIF [129]. Luego sobrevino el descubrimiento de PXR y su activación por RIF lo que permitió estudiar el mecanismo de la inducción previamente observada [90,91]. Mediante ensayos de regulación de genes reporteros, se lograron caracterizar tres regiones implicadas en la regulación de la expresión de CYP3A4 de origen humano vía PXR. Estas son: una región en el promotor proximal, una región en un *enhancer* distal ubicado a aproximadamente -8 kpb y una región ubicada en un *enhancer* lejano ubicado a -11,5 kpb del codón de iniciación. La región proximal alberga una repetición evertida imperfecta separada por 6 nucleótidos (ER6), la región distal alberga una repetición directa también imperfecta separada por 3 nucleótidos (DR3) y la región lejana alberga también una ER6 al igual que el promotor proximal, pero en este caso se trata de una repetición perfecta (Fig. 7A). Las secuencias descritas eran similares a las ya conocidas que mediaban los efectos de otros receptores nucleares [89], eran necesarias para la activación de un gen reportero por RIF en condiciones de sobreexpresión de PXR en forma independiente de su orientación y unían al heterodímero PXR/RXR α [130,131]. De esta manera se logró trazar la ruta que sigue la señal generada por el tratamiento con RIF sobre la expresión del CYP3A4. Actualmente, puede integrarse lo anterior con lo descubierto posteriormente acerca del mecanismo de activación de PXR (sección 3.2.2) y así tener un panorama completo del mecanismo de transducción de la señal.

Otros fármacos capaces de inducir la expresión de sistemas de fase I se encuentran detallados en la tabla 5 [99,111,132-136].

3.2.3.2. Regulación de sistemas de fase II

Para los sistemas de fase II se han descrito diversos casos de inducción por fármacos, muchos de ellos también ligandos de PXR, algunos de los cuales se detallan en la tabla 5 [137-142]. Si bien se logró demostrar la mediación de PXR en el efecto observado, aún no se cuenta con información que vincule al efecto con secuencias reguladoras específicas de los genes blancos como sí se logró realizar para el CYP3A4.

3.2.3.3. Regulación de proteínas transportadoras

La mayor cantidad de evidencia en cuanto la regulación de proteínas transportadoras por PXR se dispone para las proteínas de eflujo. Para P-gp se observó inducción por RIF en células LS174T derivadas de carcinoma de colon. El efecto es dependiente de un *enhancer* distal ubicado a aproximadamente -8 kpb. Dentro del mismo se encontraron 3 repeticiones directas separadas por 4 nucleótidos (DR4), una repetición directa separada por 3 nucleótidos (DR3) y una repetición evertida separada por 6 nucleótidos (ER6). Por análisis de retraso en gel y *supershift* se observó que la ER6 que incluye en su interior una de las DR4, y otra DR4 independiente de la anterior, unen al heterodímero PXR/RXR α (Fig. 7B) [143]. En un estudio de alcances similares se demostró la inducción de P-gp en linfocitos humanos por carbamazepina y la dependencia del mismo *enhancer* distal descrito anteriormente [144]. De la misma manera, se demostró la inducción de la expresión y, la actividad de P-gp por compuestos naturales presentes en un extracto de *Gingko biloba* en células LS180, también derivadas de un adenocarcinoma de colon. El efecto se exacerbaba en condiciones de sobreexpresión de PXR y cursaba con un aumento en la actividad transcripcional bajo el control del *enhancer* distal ya descrito [145]. Posteriormente Harmsen y col. [103] demostraron la inducción de P-gp por diversas drogas antitumorales (vincristina, vinblastina, tamoxifeno, ciclofosfamida, flutamida y paclitaxel) y la disminución del efecto luego del silenciamiento de PXR en la misma línea celular. El efecto inductor estaba asociado además a la activación de un gen reportero bajo el control de la misma secuencia reguladora descrita con anterioridad. En el caso de P-gp, y a diferencia del mecanismo de regulación de CYP3A4, no se encontraron elementos reguladores en el promotor proximal. Otros casos de inducción de la expresión de P-gp por fármacos se detallan en la tabla 5 [30,99,136,146,147].

Para MRP2 se observó también inducción por RIF en intestino de voluntarios sanos [148] y en células HepG2 [149]. Otros fármacos que inducen la expresión, y

eventualmente la función de MRP2 lo hacen a través de PXR y se enuncian en la tabla 5 [134,136,150-152]. Sin embargo, hasta el momento sólo se conoce la presencia de una secuencia de respuesta a PXR en el promotor proximal del gen de rata. La misma contiene repeticiones del tipo ER8 (Fig. 7C) [153]. Aún no se ha demostrado la presencia de elementos de respuesta a PXR en el promotor de origen humano [154].

En los casos de BCRP y MRP3, no se han encontrado aún elementos de respuesta a PXR [154,155]. No obstante, sí se ha observado una correlación positiva entre la expresión de PXR y de MRP3 en tejido normal y canceroso a nivel del colon. Además, la expresión de MRP3 disminuye luego del silenciamiento de PXR [156]. Similarmente se han observado casos de inducción por fármacos, algunos de ellos ligandos de PXR. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 5 [97,147,157-162].

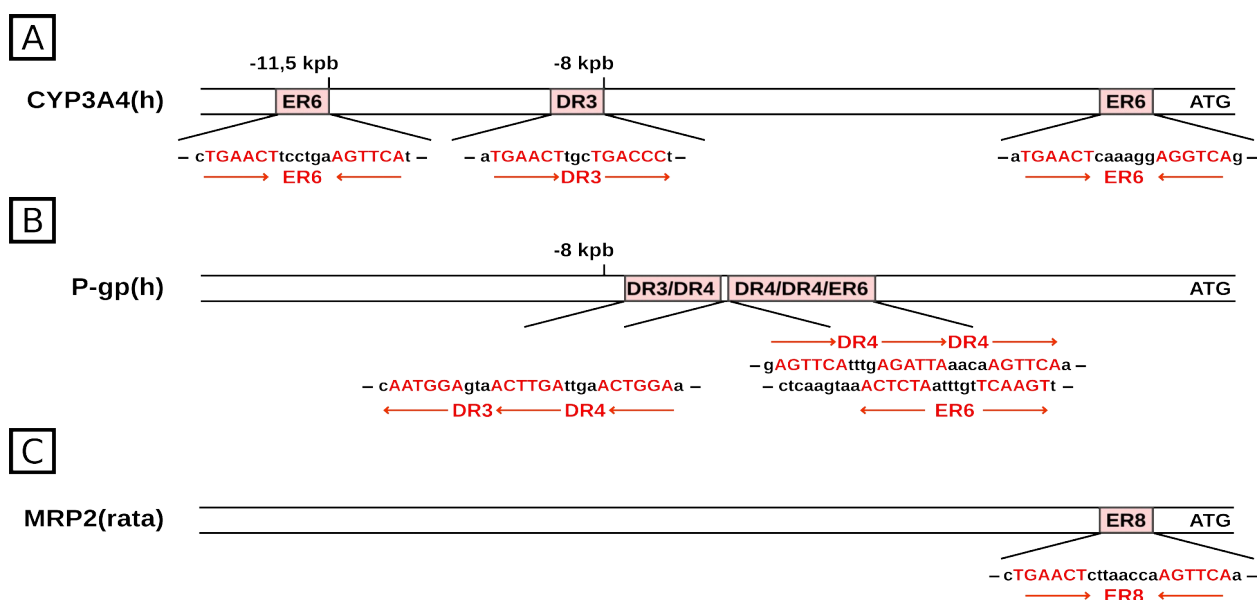


Fig. 7. Elementos de respuesta a PXR descritos en las secuencias 5' reguladoras pertenecientes a sistemas de biotransformación y transportadores de drogas. A: CYP3A4 (humano), B: P-gp (humano), C: MRP2 (rata). DR3: repetición directa separada por 3 nucleótidos; DR4: repetición directa separada por 4 nucleótidos; ER6: repetición evertida separada por 6 nucleótidos; ER8: repetición evertida separada por 8 nucleótidos.

PROTEÍNA	FÁRMACO	¿ VÍA PXR ?	MODELO
CYP2B6	Oltipraz	Sí	Hepatocitos (h)
CYP3A1	PCN	Sí	Hepatocitos (rata)
CYP3A4	Bosentán	Sí	Células HEC-1 (h)
	Cisplatino	Sí	Células HEC-1 (h)
	Espironolactona	Sí	Hígado (rata)
	Hiperforina	Sí	Células LS174T (h)
	Paclitaxel	Sí	Células HEC-1 (h)
	Rifampicina	Sí	Hepatocitos (h)
		Sí	Células HepG2 (h)
	Rilpivirina	Sí	Células LS180 (h)
Tadalafil	Sí	Células LS180 (h)	
GST α	Espironolactona	Sí	Yeyuno (rata)
		Sí	Hígado (ratón)
	PCN	Sí	Hígado (rata)
GST μ	Espironolactona	Sí	Yeyuno (rata)
	PCN	Sí	Hígado (rata)
GST π	Espironolactona	Sí	Hígado (rata)
	PCN	Sí	Hígado (rata)
	Rifampicina	Sí	BHE (ratón humanizado)
UGT1A1	Rifampicina	Sí	Intestino (h)
	Rilpivirina	Sí	Células LS180 (h)
UGT1A3	Espironolactona	Sí	Hígado (rata)
UGT1A5	Espironolactona	Sí	Hígado (ratón)
P-gp	Acetaminofeno	No	Hígado (rata)
		No	Células HepG2 (h)
	Bosentán	Sí	Células LS180 (h)
	Cisplatino	Sí	Células HEC-1 (h)
	Espironolactona	Sí	Intestino (rata)
	Rifampicina	Sí	Células HepG2/Caco-2 (h)
Tadalafil	Sí	Células LS180 (h)	

Tabla 5. Inducción de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por fármacos. La dependencia de PXR se demostró por ensayos de ARN de interferencia, sobreexpresión de PXR en el modelo en estudio, unión de PXR a secuencias reguladoras del gen blanco, activación de PXR o se sugirió por ser el fármaco en cuestión ligando de PXR. h: origen humano, BHE: barrera hematoencefálica, PCN: pregnenolona-16 α -carbonitrilo.

PROTEÍNA	FÁRMACO	¿ VÍA PXR ?	MODELO
MRP2	2-AAF	SÍ	Hígado (ratón)
	Bosentán	SÍ	Células LS180 (h)
	Cisplatino	SÍ	Hepatocitos (rata)
	Espironolactona	SÍ	Hígado (rata)
	Rifampicina	SÍ	Hepatocitos (h)
	PCN	SÍ	Hepatocitos (rata)
BCRP	Bosentán	SÍ	Células LS180 (h)
	Espironolactona	SÍ	Hígado (ratón)
	Hiperforina	SÍ	BHE (cerdo)
	Oltipraz	SÍ	Hepatocitos (h)
	Rifampicina	SÍ	Hepatocitos (h)
	Tadalafil	SÍ	Células LS180 (h)
MRP3	Mifepristona	SÍ	Células Huh7 (h)
	Oltipraz	SÍ	Hepatocitos (h)
	Omeprazol	No	Hígado (h)
	Rifampicina	SÍ	Hepatocitos (h)

Tabla 5. Inducción de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por fármacos (continuación). 2-AAF: 2-acetilaminofluoreno, PCN: pregnenolona-16 α -carbonitrilo.

4. Interacciones droga-droga

La regulación de la expresión y/o actividad de los sistemas de biotransformación y transportadores de drogas puede afectar la absorción, la distribución, el metabolismo y/o la excreción de aquellos fármacos que sean sustratos de los mismos. Esto puede afectar al mismo fármaco responsable del efecto y también a otros fármacos coadministrados. En el segundo caso, se dice que existe una interacción droga-droga. Como consecuencia, pueden presentarse cambios en la respuesta terapéutica y/o toxicidad. Las interacciones pueden ser tanto deseadas o beneficiosas como también no deseadas o perjudiciales. Se pueden dividir en interacciones de carácter farmacocinético, que por lo general implican un simple desplazamiento en la curva dosis-respuesta, o interacciones de carácter farmacodinámico cuando además implican un cambio en la forma de la curva dosis-respuesta [163].

Los cambios en la expresión y/o actividad de las proteínas responsables del metabolismo y la excreción de drogas observados en estudios *in vitro* o *in vivo* en

animales permiten sugerir potenciales interacciones droga-droga. Por ejemplo, la inducción de P-gp intestinal por espironolactona en ratas, disminuye la absorción de digoxina [164]. La corroboración definitiva se obtiene mediante pruebas clínicas. En el caso de cotratamientos que emplean RIF, se han descrito diversas interacciones en estudios clínicos, debido fundamentalmente a su rol inductor sobre varios sistemas de biotransformación y excreción de xenobióticos. Entre los fármacos cuya depuración es inducida por RIF pueden mencionarse: ciclofosfamida, ciclosporina, digoxina, erlotinib, etinilestradiol, ifosfamida, imatinib, lamotrigina, midazolam, morfina, propafenona, verapamilo, warfarina y zidovudina. [19,165-171]. Las observaciones se asociaron a inducciones en la expresión de CYP3A4, UGT y P-gp, entre otras proteínas. Un efecto similar se observó en la administración de fenitoína con imatinib, irinotecán, metotrexato, paclitaxel, tenipósido y topotecán [170]. Lo mismo se observó luego del empleo de preparados de bálsamo de San Juan conteniendo el antidepresivo de origen natural hiperforina. En este caso se registró una mayor depuración de ciclosporina, seguida del rechazo de órganos trasplantados, y de indinavir [172,173]. Para ciertos compuestos, como ciclofosfamida, la inducción de su metabolismo como se describió en un paciente cotratado con fenitoína, no sólo disminuye la concentración de la droga original sino que puede aumentar la concentración de metabolitos de mayor toxicidad [174].

Las interacciones droga-droga también pueden, por otro lado, implicar una menor depuración de fármacos coadministrados, por lo general debido a la inhibición de una o más proteínas involucradas en tal proceso. Existen diversos ejemplos de interacciones que se registran ante la coadministración de un inhibidor del CYP3A4 con un sustrato del mismo. Vale recordar que el CYP3A4 es el responsable del metabolismo de aproximadamente el 50% de las drogas empleadas en la práctica clínica [12]. Por ejemplo se ha observado que mibefradil inhibe CYP3A4, y en cierta medida también P-gp, y de esa manera aumenta la concentración en el organismo de ciclosporina, digoxina, simvastatina y tacrolimus [175]. De la misma manera se observó una menor depuración de midazolam ante la coadministración con voriconazol o ritonavir, ambos inhibidores de CYP3A4 [176]. Otros inhibidores del CYP3A4 que pueden modificar el metabolismo de drogas coadministradas son amprenavir, claritromicina, diltiazem, eritromicina, fluoxetina, ketoconazol, saquinavir y tamoxifeno [12].

5. Benznidazol

5.1. Generalidades

El benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, BZL) (Fig. 8) es un fármaco que pertenece a la familia de los nitroimidazoles. Junto con el nifurtimox son los fármacos de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas siendo el BZL el de mayor disponibilidad en las áreas endémicas.

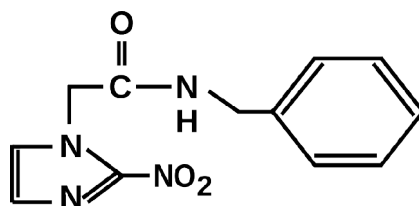


Fig. 8. Estructura química del Benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, BZL).

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el agente *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), fue descubierta en 1909 y actualmente afecta a aproximadamente 8 millones de personas en América Latina. Además, se calcula que 100 millones de habitantes de las áreas endémicas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad. El método más frecuente de infección es a través de la picadura de insectos infectados con el agente causante. En las áreas subamazónicas, el vector más frecuente es *Triatoma infestans* [177]. También puede transmitirse en forma vertical de madre a hijo, por transfusiones sanguíneas y transplantes de órganos infectados, siendo esta forma de diseminación más común en áreas no endémicas, principalmente debido a los flujos migratorios provenientes de Latinoamérica [178].

La enfermedad cursa a través de dos fases definidas. En primer lugar, la fase aguda se inicia aproximadamente 2 semanas luego de la exposición al agente causante, dura entre 4 y 8 semanas y se caracteriza por la presencia del parásito en sangre. La parasitemia luego declina por acción del sistema inmune dando curso a la fase crónica de la enfermedad en la que el parásito se localiza en los tejidos. La fase crónica puede permanecer asintomática en lo que se denomina forma indeterminada (más recientemente denominada fase crónica temprana) o bien, por lo general después de 10-30 años evolucionar hacia la fase crónica tardía caracterizada por complicaciones cardíacas y digestivas. Los mecanismos de daño tisular también son controversiales. Entre las distintas posibilidades se postularon al daño inflamatorio ocasionado por la

presencia del parásito como así también a mecanismos autoinmunes [179,180]. Durante el curso de la fase crónica puede también tener lugar una reactivación de la enfermedad en su forma aguda, por ejemplo, en el caso de inmunosupresión.

5.2. Mecanismo de acción

El BZL funciona como prodroga, por lo que debe activarse para poder ejercer su función. Al igual que para otros compuestos nitroheterocíclicos, la activación implica la reducción del grupo nitro catalizada por una nitroreductasa. En ciertos organismos, como en el caso de los mamíferos, se postuló que la nitroreducción del BZL por acción de nitroreductasas de tipo II daría como resultado la formación de compuestos como el radical nitro y del radical superóxido con el consecuente daño oxidativo sobre la célula. Empleando otros nitroimidazoles como el misonidazol se postuló también la generación de especies reactivas del oxígeno y otros derivados electrofílicos. Consecuentemente se presentarían alteraciones en distintas vías metabólicas y macromoléculas [181]. En el caso del *T. cruzi*, la activación es catalizada por una nitroreductasa de tipo I, ausente en mamíferos, mediante dos reacciones sucesivas que dan como resultado 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 mediando de esta manera los efectos tóxicos del BZL [182-186].

Tanto los mamíferos como los parásitos poseen mecanismos de defensa contra los intermediarios electrofílicos y contra el glioxal formado por activación del BZL. En el caso de los mamíferos, el sistema de las glutatión-S-transferasas (GSTs) y el de las glioxalidas se cuentan entre las defensas contra las mencionadas especies reactivas. En los mamíferos las glioxalidas utilizan glutatión y zinc como cofactores, mientras que en el caso del parásito utilizan tripanotiónina y níquel [187,188]. Además, algunos parásitos carecen de glioxalidas con funciones de detoxificación, lo que representaría un factor que determina la sensibilidad del mismo a la droga [186]. Por el contrario, la deficiencia de nitroreductasas de tipo I sería un factor de resistencia [189].

5.3. Esquema de tratamiento y farmacocinética del BZL

La administración de BZL se encuentra indicada en todos los casos de enfermedad aguda, congénita, pacientes con reactivación de la enfermedad y niños con la forma crónica temprana de la enfermedad [177]. La dosificación empleada en pediatría llega a 10 mg/kg de peso por día durante 60 días por vía oral. En el caso de adultos, la dosis

empleada es de 5 mg/kg de peso por día durante 60 días, también por vía oral. La administración de BZL o nifurtimox durante la fase aguda da como resultado la cura de la enfermedad en el 60 a 85% de los casos [190].

Aún no existe consenso acerca de la administración de BZL en la fase crónica más tardía de la enfermedad. La mayoría de los estudios clínicos finalizados hasta el momento suelen presentar debilidades que impiden obtener conclusiones definitivas o arrojan resultados contradictorios. Como resultado de estudios no aleatorizados se postuló que la administración de BZL prevendría la aparición de síntomas de daño cardíaco asociados a la enfermedad. No obstante, también existen otros estudios que indican lo contrario. En estudios aleatorizados, se observó que los pacientes que recibían BZL durante la fase crónica mostraban una mayor frecuencia de negativización de la serología después de 1-4 años que aquellos pacientes que no recibieron el tratamiento. Sin embargo, existen debilidades en lo que concierne al método de detección empleado, el cual podría haber arrojado un alto porcentaje de falsos negativos. Años atrás, se lanzó el estudio multicéntrico BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) que planeaba reclutar 3000 pacientes. El seguimiento se planeaba realizar durante 5 años a fin de determinar si la terapia antitripanocida con BZL reduce la mortalidad y el daño cardíaco asociado a la enfermedad, y paralelamente si reduce la presencia de otros síntomas o logra eliminar la presencia del parásito [191,192]. Hasta el momento no se encuentran publicados en la literatura resultados definitivos del estudio.

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 3-4 h de la toma y resultó en promedio 2,54 $\mu\text{g/mL}$. 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. El porcentaje de unión a proteínas es en promedio 44,1% y el volumen de distribución relativo es en promedio 0,56 L/kg. En cuanto a la eliminación de la droga, el 60-67% de la dosis administrada se elimina en orina. El 19% de la dosis total se elimina sin modificar [193].

En otro estudio empleando múltiples dosis se emplearon dosis crecientes hasta 7 mg/kg por día durante ocho días, y luego 7 mg/kg por día hasta completar 4 semanas, dos veces por día vía oral. La $C_{m\acute{a}x}$ se determinó 3 h después de la dosis de la mañana en los días 10, 15, 20 y 25, el máximo resultado obtenido fue de 16,4 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados mostraron que la $C_{m\acute{a}x}$ tiende a disminuir con el transcurso del tratamiento en los sujetos varones, siendo luego de 25 días de tratamiento, en promedio, un 20% inferior que la $C_{m\acute{a}x}$

luego de 10 días de tratamiento [194].

En un estudio con ratones, se administró BZL intraperitonealmente empleando 3 dosis distintas (26, 78 y 650 mg/kg). Para las dos dosis más bajas se observaron picos de concentraciones entre los 15 y 30 min de la administración y $t_{1/2}$ de 93 y 96 min independientes de la dosis respectivamente. Para la dosis de 650 mg/kg, la concentración máxima se alcanzó luego de 60 min y permaneció constante por 6 h y luego disminuyó de manera más lenta que para las dosis inferiores. Como parte del mismo estudio, se llevó a cabo la administración por vía intravenosa de BZL a perros. Esto permitió calcular el volumen de distribución, el cual resultó 0,53 L/kg [195].

La administración de BZL se encuentra asociada a efectos secundarios. El más frecuente de los mismos es la dermatitis, pero también se han registrado casos de intolerancia digestiva, depresión de la médula ósea y neuropatías. En todos los casos, la frecuencia de efectos adversos es mayor durante los primeros 30 días de tratamiento [196,197]. Además, el BZL tiene demostradas propiedades mutagénicas [198]. En ratas, se observó que la administración de BZL a ratas preñadas, resultaba en la activación del mismo a metabolismos reactivos y la unión a proteínas maternas y fetales [199].

Más allá de los procesos de nitroreducción que experimentaría el BZL, hasta el momento se carece de información adicional acerca de los mecanismos de biotransformación que experimenta en los tejidos humanos. De la misma manera se desconoce el rol del BZL como sustrato de proteínas transportadoras de drogas que puedan mediar su excreción a nivel biliar y/o renal, y/o limitar su absorción a nivel intestinal. La caracterización del BZL como sustrato de alguno/s de estos sistemas permitiría identificar potenciales espectros de interacción con otros fármacos.

5.4. Efectos del BZL sobre sistemas de biotransformación y transportadores de drogas

Al presente, se conoce que drogas con actividad antiparasitaria muestran efectos reguladores sobre los sistemas en estudio. Por ejemplo, quinina y albendazol inducen la expresión de distintas isoformas del citocromo P450 en células HepG2 [200]. De la misma manera, la artemisina induce la expresión de sistemas de fase I y de P-gp en cultivo primario de hepatocitos humanos y en la línea celular derivada de cáncer de colon LS174T [201]. Sin embargo existe escasa 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 inhibitor sobre proteínas de la familia del citocromo P450. A principios de la década del 80, se describió un efecto potenciador de BZL en la respuesta antitumoral por lomustina [202]. Una interacción similar se observó también en un estudio clínico [203]. El mecanismo sería a través de la inhibición de la hidroxilación de la lomustina por BZL [204]. 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 [205]. La coadministración de compuestos conteniendo grupos tioles (cisteína, N-acetilcisteína, penicilamina, glutatión) produce una reversión del efecto [206]. No obstante, se desconocen los efectos a nivel de la expresión de las isoformas más importantes del citocromo P450 como así también sobre la expresión y actividad de otros sistemas de biotransformación y transporte.

6. Objetivos

El BZL es el fármaco de elección en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Hasta el momento se desconocen sus efectos sobre la expresión y actividad de sistemas de biotransformación y excreción de drogas, y de xenobióticos en general, en modelos humanos. Asimismo, se carece totalmente de información acerca de la/s proteína/s transportadora/s que participaría/n en el transporte del BZL al exterior celular, mediando de esta manera su depuración del organismo. Dado que el BZL puede ser coadministrado con otros fármacos, resulta factible la aparición de interacciones droga-droga que podrían llevar a cambios en la depuración de drogas coadministradas y del propio BZL que pueden asociarse a cambios en el efecto terapéutico alcanzado y, por otro lado, en la toxicidad.

Los objetivos del presente Trabajo de Tesis son:

1.1. Establecer el efecto del tratamiento con BZL sobre la expresión y actividad de sistemas de biotransformación de fase I (CYP3A4), sistemas de biotransformación de fase II (GST y UGT) y proteínas transportadoras de drogas (P-gp, MRP2, BCRP y MRP3).

1.2. Establecer el/los mediadores moleculares del efecto estudiado en el punto anterior. Particularmente se estudiará la participación del receptor de pregnanos X (PXR) por ser un receptor nuclear de elevada promiscuidad, que media los efectos de un gran número de fármacos sobre los sistemas de biotransformación y transporte. De confirmarse la mediación por PXR, se estudiará la activación del receptor nuclear por BZL, lo que serviría de indicio para confirmar el rol del BZL como ligando del mismo.

2. Estudiar el/los transportadores de eflujo responsables del transporte de BZL al exterior celular y cómo el pretratamiento con BZL afecta su propia excreción.

7. Hipótesis del Trabajo de Tesis Doctoral

La regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas en epitelios de relevancia farmacológica por los propios fármacos sustratos de los mismos es un acontecimiento frecuente. Por lo tanto, es de esperar un efecto de BZL sobre la expresión y/o actividad de tales sistemas en células HepG2, representativas del hepatocito humano. Dada la naturaleza hidrofóbica del BZL es de esperar que actúe como activador de receptores nucleares. Teniendo en cuenta su promiscuidad en lo que respecta a la activación por múltiples fármacos, PXR podría ser el mediador de los efectos de BZL. Los cambios en la expresión, y por ende en la actividad, de los sistemas a estudiar, permitirían sugerir cambios en la farmacocinética de drogas que sean coadministradas con BZL.

Por otro lado, dada su estructura química, el eflujo de BZL podría estar mediado por una proteína transportadora. Teniendo en cuenta que el BZL presenta una estructura anfipática, P-gp podría ser un transportador probable. De confirmarse su participación, representaría otro nivel en el cual pueden darse interacciones farmacológicas entre el BZL y fármacos coadministrados. De la misma manera el BZL, de regular P-gp, podría afectar su propia depuración.

1. Reactivos generales y materiales

Benznidazol (BZL), albúmina sérica bovina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB), dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG), ácido ditionitrobenzoico (DTNB), rifampicina (RIF), rodamina-123 (R123) y verapamilo (VER) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Dimetilsulfóxido (DMSO), cloroformo, alcohol isobutílico, etanol absoluto, isopropanol y el reactivo de Folin-Cicolteau fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, HE, Alemania). El probenecid (PRO) fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). Todos los demás reactivos empleados fueron de calidad analítica.

El material descartable empleado para cultivo celular fue adquirido a Boeco (Hamburg, HA, Alemania) y Greiner Bio One (Frickenhausen, BW, Alemania).

2. Cultivo celular

2.1. Células HepG2

La línea celular HepG2 deriva de un hepatocarcinoma celular humano y conserva diversas propiedades bioquímicas, morfológicas y fisiológicas de los hepatocitos lo que junto con más de dos décadas de empleo experimental la convierte en un modelo adecuado para estudiar la regulación de proteínas hepáticas humanas. Entre otras propiedades, las células HepG2 retienen la polaridad observada en los hepatocitos con una membrana apical delimitando un pseudocanalículo y una membrana basolateral, conservando cada una de ellas la expresión de la mayoría de las proteínas de las correspondientes membranas del hepatocito humano [207-210]. La expresión de los principales sistemas de biotransformación presentes en el hepatocito también se encuentra conservada en la línea celular HepG2 [30,211,212].

Las células HepG2 fueron mantenidas a 37°C en incubador gaseado con una atmósfera de 5% de CO₂. A excepción de los ensayos con ARN de interferencia, las células fueron mantenidas y tratadas en un medio de cultivo conteniendo DMEM/F12 en proporción 1:1 suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA, Pasching, Austria), 2 mM de glutamina (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.), penicilina (0,05 mg/mL), estreptomycin (0,05 mg/mL) y neomicina (0,10 mg/mL) suplementados a partir de una mezcla 100X (Gibco) e insulina 1 µg/µL (Gibco). El medio de cultivo fue renovado a intervalos de 2-3 días. Los pasajes de células para su mantenimiento al igual que la siembra de las mismas para los distintos tratamientos se llevaron a cabo previa tripsinización. Para tal fin, las células fueron lavadas 2 veces con una solución isotónica de PBS y tratadas con una

solución de tripsina ($0,01 \text{ mg/cm}^2$ de superficie de cultivo) y EDTA ($4 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de superficie de cultivo) (Gibco) durante 10 minutos a fin de lograr la separación de las células. La tripsinización fue detenida por agregado de medio de cultivo, procediéndose luego a la homogeneización de la suspensión celular. La densidad celular se determinó por conteo en Cámara de Neubauer (Boeco).

2.2. Células LS180

Las células LS180, derivadas de un adenocarcinoma de colon humano, fueron utilizadas únicamente para el estudio de activación de PXR por BZL (sección 8.3). Se cultivaron en un medio de cultivo compuesto de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA), 2 mM de glutamina (Gibco), penicilina (0,05 mg/mL) y estreptomycin (0,05 mg/mL) suplementadas a partir de una mezcla 100X (Gibco) y aminoácidos no esenciales 1% a partir de una solución comercial (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BY, Alemania). Para los fines del mantenimiento y del subcultivo de las células para su tratamiento, las mismas fueron lavadas 2 veces con una solución isotónica de PBS e incubadas por 5 minutos con una solución de tripsina ($0,01 \text{ mg/cm}^2$ de superficie de cultivo) y EDTA ($4 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ de superficie de cultivo) (Gibco) durante 5 minutos a fin de lograr la separación de las células. La tripsinización se detuvo por agregado de medio de cultivo y la densidad celular de la suspensión resultante se cuantificó empleando un equipo Casy Cell Counter + Analyzer System (Roche Applied Science, Mannheim, BW, Alemania) [213].

3. Tratamientos con Benznidazol

En primer lugar y a fin de determinar una concentración de BZL para el resto de los estudios, se realizó una curva concentración-respuesta de la expresión de los transportadores de drogas P-gp, MRP2, BCRP y MRP3 luego del tratamiento con distintas concentraciones de BZL (0; 2; 20; 200 y 1000 μM) por 48 horas. Para tal fin, se sembraron 5×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Veinticuatro horas luego de la siembra se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo BZL en las distintas concentraciones agregado a partir de una solución madre 2000X en DMSO. Las células controles fueron expuestas al mismo volumen de DMSO. Todas las células fueron incubadas por 48 horas renovándose el medio de cultivo cada 24 horas (Fig. 9A).

La viabilidad celular luego del tratamiento se verificó mediante el ensayo de MTT. El mismo se basa en la conversión del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazolio (MTT) en su formazán catalizada por la enzima succinato deshidrogenasa de las células viables [214]. Para tal fin se sembraron 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se expusieron a distintas concentraciones de BZL por 48 h como fue descrito en el párrafo anterior. Finalizado el tratamiento se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo MTT (0,50 mg/mL) y se incubó por 2 h a fin de permitir la formación de los cristales de formazán, siendo ésta proporcional a la viabilidad celular. Luego de la incubación se retiró el medio de cultivo y los cristales de formazán se disolvieron en 200 μ L de DMSO. La absorbancia a 530 nm corregida respecto de la absorbancia de referencia a 630 nm se determinó empleando un equipo LD-400 (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.) y es una medida de la viabilidad celular.

Una vez determinada la mínima concentración de BZL capaz de producir una inducción en la expresión proteica de los transportadores (200 μ M), el resto de los estudios se llevó a cabo empleando esta única concentración. Para los demás estudios de expresión proteica, expresión a nivel de ARNm y ensayos de actividad se sembraron 5×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se expusieron posteriormente a BZL (200 μ M) o DMSO por 48 horas renovándose el medio de cultivo cada 24 horas (Fig. 9B). Para los ensayos de silenciamiento con ARN de interferencia se sembraron 5×10^4 (silenciamiento de PXR) o 1×10^5 células/pocillo (silenciamiento de P-gp) en placas de 24 pocillos procediéndose a continuación a la transfección de las mismas.

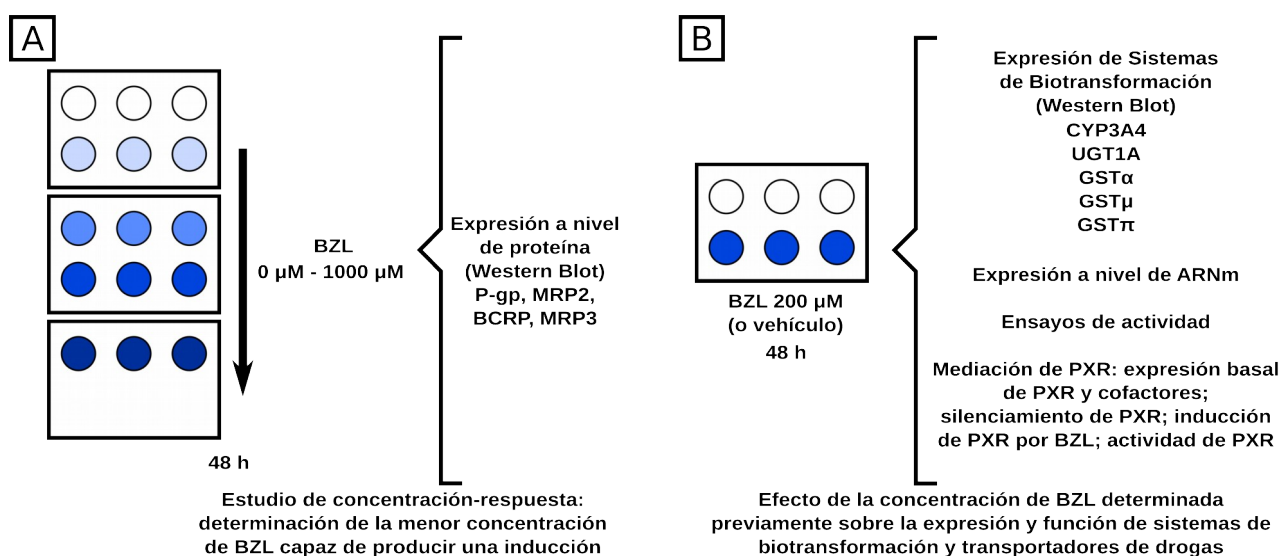


Fig. 9. Esquema de tratamiento de células HepG2. A: estudio concentración-respuesta de BZL sobre la expresión de transportadores de drogas. B: estudio del efecto del tratamiento con BZL (200 μ M) sobre la expresión y función de sistemas de biotransformación, estudios funcionales y de sistemas reguladores.

4. Estudios de expresión a nivel de proteína

El efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión proteica de los sistemas de biotransformación y los transportadores estudiados se determinó por inmunocuantificación sobre muestras previamente separadas por electroforesis seguida de electrotransferencia a membrana de PVDF (Fig. 10).

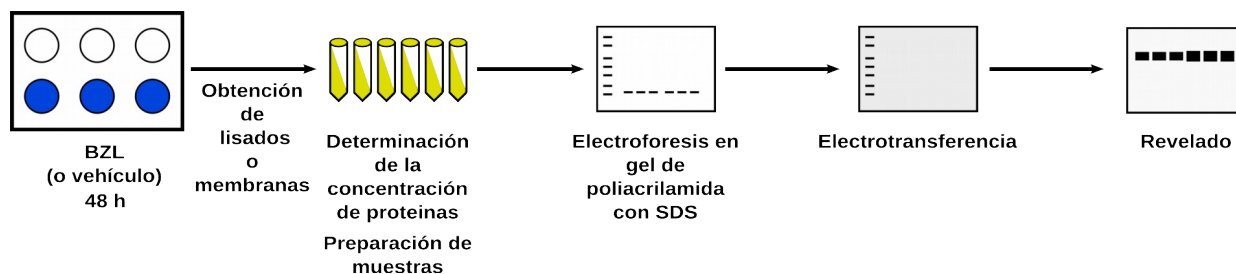


Fig. 10. Procedimiento para la cuantificación de la expresión proteica en respuesta al tratamiento con BZL en células HepG2.

4.1. Obtención de lisados celulares

Finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas 2 veces con una solución isotónica de PBS. El lisado celular se preparó incubando las células durante 5 minutos en *buffer* RIPA (Tris-HCl 25 mM pH 7,60; NaCl 150 mM; Triton X-100 1% (v/v); desoxicolato de sodio 1% (p/v); SDS 0,10% (p/v)) suplementado con fenilmetilsulfonilfluoruro (17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y leupeptina (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) como inhibidores de proteasas. La suspensión se pasó 20 veces por una aguja de 25G a fin de facilitar el lisado y la homogeneización. Se utilizaron 300 μL de *buffer* RIPA para las placas de 6 pocillos y 50 μL para las placas de 24 pocillos. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en frío. A continuación se determinó la concentración de proteínas.

4.2. Obtención de preparaciones de membranas plasmáticas

A fin de determinar la expresión de proteínas transportadoras en la superficie celular, donde normalmente se localizan, se obtuvieron membranas plasmáticas según el método descrito por Kubitz y col. [215]. Las células fueron recolectadas en un *buffer* compuesto de Tris 20 mM, sacarosa 250 mM, EGTA 5 mM y MgCl_2 1 mM suplementado también con fenilmetilsulfonilfluoruro (17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y leupeptina (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) como inhibidores de proteasas. La lisis celular se llevó a cabo mediante 20 pasajes por una aguja de 25G. Los lisados

obtenidos se centrifugaron a 1000 g (5 min, 4°C) separándose de esta manera las membranas plasmáticas (*pellet*) y el resto de las membranas y el citosol (sobrenadante). Los *pellets* fueron resuspendidos en el mismo *buffer* de recolección de las células y se utilizaron para determinación de proteínas y posterior electroforesis.

4.3. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de cada muestra se cuantificó mediante el método de Lowry y col. [216]. Se realizó una preincubación de la muestra (2 µL) de 15 minutos en un medio de reacción conteniendo 200 µL de agua destilada y 750 µL de una solución de sulfato de cobre 1% (p/v), tartrato de sodio y potasio 2% (p/v) y Na₂CO₃ 2% (p/v) en NaOH 0,10 M. Seguidamente se agregaron 75 µL de reactivo de Folin-Cicolteau (Merck) incubándose por 45 minutos. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. La concentración de proteínas se cuantificó mediante medida de absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 2S (Perkin Elmer, Überlingen, BW, Alemania) utilizando una solución testigo de albúmina sérica bovina de 8 µg/µL.

4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Las muestras fueron disueltas en un *buffer* 4X de Tris-HCl 1 M pH 6,80 suplementado con SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,005% (p/v), glicerol 10% (v/v) y DTT 0,40 M.

Según la proteína a detectar y la preparación de partida, se sembraron entre 2 y 15 µg de proteína por calle. Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS de carácter discontinuo en un equipo Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) en *buffer* de corrida de pH 8,60 compuesto por Tris 0,30 % (p/v), glicina 1,44% (p/v) y SDS 0,10% (p/v). Para la separación de P-gp, MRP2, MRP3, BCRP y p300 se empleó un gel de separación al 8%. Para la separación de CYP3A4, GSTα, GSTµ, GSTπ, PXR, RXRα y UGT1A se empleó un gel de separación al 12%. En ambos casos se utilizó un gel superior de concentración al 4% (tabla 6) [217].

	Geles		
	Concentración (4%)	Separación (8%)	Separación (12%)
Agua destilada	2,45 mL	1,90 mL	1,50 mL
Tris 0,50 M pH 6,80	0,50 mL	-	-
Tris 1,50 M pH 8,80	-	1,05 mL	1,05 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30% (p/v)	0,40 mL	1,10 mL	1,70 mL
SDS 10% (p/v)	42 μ L	42 μ L	42 μ L
Persulfato de amonio 10% (p/v)	60 μ L	63 μ L	63 μ L
TEMED	3 μ L	2,10 μ L	2,10 μ L

Tabla 6. Composición de los geles de poliacrilamida para separación de proteínas (cantidades para la preparación de un gel).

4.5. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas

Finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (Perkin Elmer) previamente activada con metanol durante 5 minutos. La transferencia se efectuó a intensidad de corriente constante (350 mA) durante 70 minutos en un *buffer* compuesto por Tris 0,32% (p/v), glicina 0,70% (p/v) y SDS 0,05% (p/v) en metanol 20% (v/v) [218]. La homogeneidad de la transferencia en toda la dimensión de la membrana se verificó por tinción con rojo Ponceau S.

Las membranas de PVDF fueron bloqueadas durante 1 h con una solución de leche descremada en polvo al 10% (p/v) en *buffer* de lavado PBS-Tween (PBS con 0,30% (v/v) de Tween-20). Seguidamente, las membranas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo primario durante 1 hora (β -Actina) o toda la noche (demás anticuerpos) en las condiciones detalladas en la tabla 7.

Luego de la incubación con el anticuerpo primario las membranas fueron lavadas 4 veces durante 7 minutos con el *buffer* de lavado descrito anteriormente e incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Los anticuerpos secundarios empleados fueron: Goat anti-mouse IgG H+L conjugado con peroxidasa (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) 1:5000; Donkey anti-rabbit IgG H+L conjugado con peroxidasa (Thermo Scientific) 1:5000 y Donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz) 1:2500. Todos los anticuerpos se diluyeron en *buffer* de lavado suplementado con leche descremada en polvo al 0,30% (p/v) y todas las incubaciones fueron de 1 h.

Proteína	Anticuerpo	Fabricante	Dilución
β -Actina	A-2228	Sigma-Aldrich	1:3000
BCRP	BXP-21	Santa Cruz	1:100
CYP3A4	AB-1254	Millipore	1:1000
GAPDH	FL-335	Santa Cruz	1:1000
GST α	GS-09	Oxford Biochemicals	1:1000
GST μ	GS-23	Oxford Biochemicals	1:1000
GST π	ADI-MSA-102-E	Enzo Life Science	1:1000
MRP2	M2III-6	Enzo Life Science	1:1000
MRP3	M3II-21	Sigma-Aldrich	1:1000
p300	C-20	Santa Cruz	1:300
P-gp	H-241	Santa Cruz	1:500
PXR	N-16	Santa Cruz	1:200
RXR α	D-20	Santa Cruz	1:1000
UGT1A	UGT1A	Shin Ichi Ikushiro	1:1000

Tabla 7. Anticuerpos primarios empleados en inmunocuantificación. La obtención del anticuerpo anti UGT1A se describió en Ikushiro y col. [219].

Las membranas incubadas con el anticuerpo secundario fueron lavadas 4 veces (7 min/vez) con PBS-Tween y a continuación 2 veces (5 min/vez) con PBS y reveladas por quimioluminiscencia. Para ello se empleó el kit comercial ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). La densidad óptica de las bandas fue cuantificada utilizando el software Image J (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.). La densidad óptica de β -actina o GAPDH (en los experimentos de silenciamiento) fue utilizada como control de carga. La expresión de la proteína de interés se cuantificó como la relación entre su densidad óptica y la densidad óptica de la proteína empleada como control de carga. En todos los casos, los resultados se expresan como 100% de la expresión en las células controles.

En aquellos casos en los que se reveló más de una proteína en la misma membrana, la misma se lavó luego del primer revelado durante 10 minutos con una solución de NaOH 0,20 N. Finalizado el lavado se realizaron 2 lavados (5 min/vez) con PBS y repitió el proceso de bloqueo, incubación con anticuerpos y detección.

5. Estudios de expresión a nivel de ARNm

Se cuantificó la expresión a nivel de ARNm de aquellos genes cuyos productos proteicos exhibieron un cambio en respuesta al tratamiento con BZL. Los estudios se llevaron a cabo a la menor concentración capaz de producir una inducción de la proteína.

Para tal fin se aislaron muestras de ARN total que fueron posteriormente sometidas a retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real (Fig. 11).

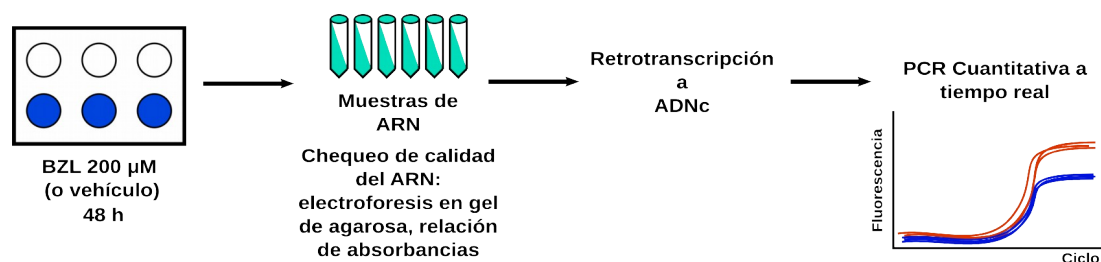


Fig. 11. Procedimiento para la cuantificación de la expresión a nivel de ARNm en respuesta al tratamiento con BZL (200 μ M, 48 h) en células HepG2.

5.1. Purificación de ARN total y control de calidad

El ARN total de células HepG2 se aisló con el reactivo comercial Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se precipitó con isopropanol según las instrucciones del fabricante. Los precipitados de ARN fueron resuspendidos en agua libre de RNAsas. La concentración y pureza del ARN purificado se determinó por espectrofotometría UV (Perkin Elmer). Las muestras se diluyeron 1:200 en agua destilada y se registraron las absorbancias a 260 y 280 nm. La concentración de ARN total en μ g/ μ L se obtuvo de multiplicar el valor de absorbancia a 260 nm obtenido por 8 según las instrucciones del fabricante del reactivo de purificación. La pureza se consideró aceptable en las muestras con una relación de absorbancias 260 nm/280 nm mayor o igual a 1,60. La integridad del ARN purificado se verificó por corrida en gel de agarosa al 1,20% en *buffer* TAE preparado a partir de una solución madre 50X de Tris 2 M, ácido acético glacial 1 M y EDTA 0,05 M. La detección del ARN se llevó a cabo por tinción con bromuro de etidio del gel de agarosa y posterior observación en transiluminador UV. La calidad de las purificaciones se verificó mediante la integridad de las bandas correspondientes al ARN ribosomal 5S, 18S y 28S.

5.2. Retrotranscripción a ADN complementario (RT-PCR)

El ADN complementario (ADNc) correspondiente a cada muestra de ARN total se obtuvo por PCR con transcriptasa reversa. Las reacciones se llevaron a cabo empleando 1 μ g de ARN total en volumen final de 20 μ L. En primer lugar se realizó una preincubación del mismo (5 min, 65°C) con una mezcla de dNTPs y oligonucleótidos aleatorios (*random*

primers) (Invitrogen) con la finalidad de eliminar la estructura terciaria del ARN (tabla 8).

ARN total	1 µg
Oligonucleótidos aleatorios	1 µL
dNTPs 10 mM	3 µL
Agua tratada con DEPC	c.s.p. 13,50 µL

Tabla 8. Composición del medio de preincubación en la RT-PCR.

A continuación, la reacción se enfrió por incubación en hielo durante 1 minuto y se agregaron 6,50 µL por muestra de una mezcla conteniendo la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen) con su correspondiente *buffer* de reacción 5X, DTT y el inhibidor recombinante de RNAsas RNaseOUT (Invitrogen) (tabla 9). Esta mezcla se incubó por 5 min a 25°C, seguido de una incubación de 60 min a 50°C finalizándose la reacción mediante una incubación de 15 min a 70°C.

<i>Buffer</i> de reacción 5X	4 µL
DTT 0,10 M	1 µL
Inhibidor de RNasa	1 µL
Transcriptasa reversa	0,50 µL

Tabla 9. Composición de la mastermix conteniendo la transcriptasa reversa en la RT-PCR.

5.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La reacción se llevó a cabo en un equipo Mx3000p (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.) con detección por SYBR Green, el cual emite fluorescencia exclusivamente cuando se encuentra unido a ADN doble cadena. Se utilizó la enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) con el correspondiente *buffer* provisto por el fabricante y como muestra de ADNc de partida se utilizó una dilución 1/10 de los productos de la reacción de RT-PCR. El volumen final del medio de reacción fue de 20 µL y la composición del mismo se detalla en la tabla 10. La secuencia de los cebadores se detalla en la tabla 11. Todos fueron diseñados de forma que unan en el límite intrón-exón y no formen estructura terciaria estable a las temperaturas de trabajo. La expresión del ARNr 18S fue utilizada como normalizador.

Muestra de ADNc	2 μ L
Buffer de reacción 10X	2 μ L
MgCl ₂ 50 mM	1,20 μ L
dNTPs 10 mM	3 μ L
SYBR Green 25X	0,80 μ L
Platinum Taq (5 U/ μ L)	0,10 μ L
Cebadores (50 μ M)	0,40 μ L cada uno
Agua MQ	c.s.p. 20 μ L

Tabla 10. Composición del medio de reacción en la qPCR.

Gen	Cebador F	Cebador R
CYP3A4	5'GTGGGGCTTTTATGATGGTCA3'	5'GCCTCAGATTTCTCACCAACACA3'
GST π	5'TATTTCCCAGTTCGAGGCCG3'	5'TGGTACAGGGTGAGGTCTCC3'
MRP2	5'AGGTTTGCCAGTTATCCGTG3'	5'AACAAAGCCAACAGTGTCCC3'
P-gp	5'CCAAAGACAACAGCTGAAA3'	5'TACTTGGTGGCACATAAAC3'
18 S	5'CGCCGCTAGAGGTGAAATTC3'	5'TTGGCAAATGCTTTCGCT3'

Tabla 11. Secuencia de los cebadores empleados en la qPCR.

El perfil térmico empleado fue:

- Desnaturalización inicial: 2 min, 95°C
- 40 ciclos:
 - 15 s, 95°C
 - 30 s, 55°C
 - 30 s, 72°C

La lectura de fluorescencia de punto final en cada ciclo se realizó a 72°C. La presencia de un único amplicón se verificó por posterior curva de disociación con lectura continua de fluorescencia entre 55°C y 95°C.

El efecto del tratamiento se calculó mediante el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [220]. Los supuestos del modelo se verificaron mediante una curva de eficiencia empleando distintas diluciones de la muestra de partida considerándose aceptable una eficiencia entre 90 y 110%.

6. Actividad de proteínas transportadoras de drogas

6.1. Actividad de P-gp

La actividad de P-gp luego del tratamiento con BZL se determinó mediante el método de acumulación del fluoróforo rodamina123 (R123). El mismo difunde en forma pasiva del medio de reacción al interior celular siendo luego transportado en forma activa por P-gp. La actividad de P-gp se determinó en forma inversa cuantificando la cantidad de R123 remanente en el interior celular por espectrofluorimetría (Fig. 12) [221].

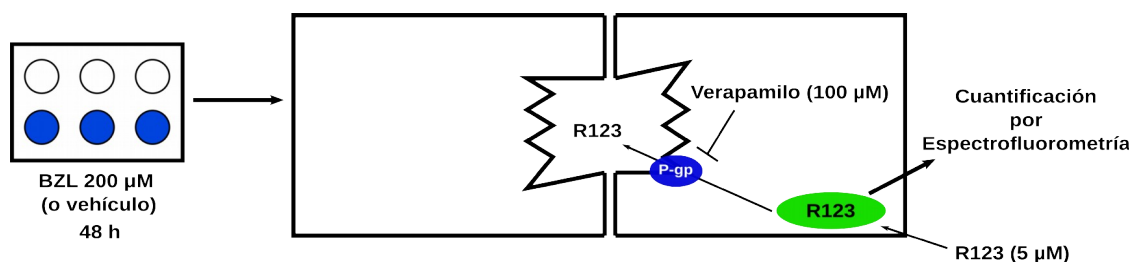


Fig. 12. Determinación de la actividad de P-gp en células HepG2 tratadas con BZL.

Finalizado el tratamiento con BZL, las células fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas por 2 h en medio de cultivo adicionado con R123 (5 µM). A fin de confirmar la participación de P-gp, el experimento se llevó a cabo en presencia o ausencia de verapamilo (VER, 100 µM, inhibidor de P-gp [222]).

Luego de la incubación las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, levantadas en una solución de sacarosa 0,30 M y lisadas por sonicación (3 pulsos de 5 s, 30% de amplitud). La R123 intracelular se determinó por espectrofluorimetría ($\lambda_{\text{excitación}} = 485$ nm; $\lambda_{\text{emisión}} = 535$ nm) en un lector de microplacas Multimode Detector DTX-880 (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, EE.UU.). La acumulación en las células controles (expuestas a DMSO por 48 h) fue considerada 100%.

6.2. Actividad de MRP2

La actividad de MRP2 en respuesta al tratamiento con BZL se determinó midiendo el eflujo de dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG). El mismo es sintetizado intracelularmente a partir de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) por conjugación espontánea con glutatión (GSH) y transportado predominantemente por MRP2 [223] (Fig. 13).

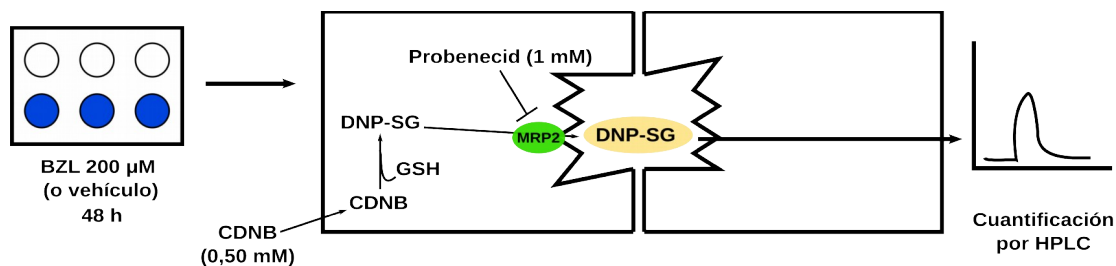


Fig. 13. Determinación de la actividad de MRP2 en células HepG2 tratadas con BZL.

Luego de las 48 h de tratamiento con BZL, las células fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas en medio de cultivo con CDNB (0,50 M, 30 min) a 10°C a fin de permitir el ingreso de CDNB y su conjugación espontánea con GSH para formar DNP-SG. En estas condiciones de incubación a baja temperatura, se minimiza la conjugación enzimática de forma de independizar los resultados de la actividad de las glutatión-S-transferasas. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron a 37°C en *buffer* de Hanks (HBSS) pH 7,40 (CaCl₂ 1,26 mM; KCl 5,36 mM; KH₂PO₄ 0,44 mM; MgSO₄ 0,81 mM; NaCl 136 mM; Na₂HPO₄ 0,42 mM; HEPES 20 mM; glucosa 6,10 mM). Luego de 60 minutos de incubación se tomaron alícuotas de sobrenadante celular y se cuantificó DNP-SG por HPLC. Para tal fin las muestras fueron en primer lugar centrifugadas a 300 g (3 min, 4°C). Luego, los sobrenadantes de la primera centrifugación fueron tratados con HClO₄ concentrado a una concentración final en la muestra de 10% (v/v) y centrifugados a 14000 g (2 min, 4°C) a fin de precipitar las proteínas. La cantidad de DNP-SG en los desproteinizados fue determinada por HPLC [224].

El experimento se llevó a cabo en presencia o ausencia de probenecid (PRO, 1 mM, inhibidor de las MRPs) [225].

La detección se llevó a cabo por espectroscopía UV a 365 nm en un equipo Waters 600 (Waters, Milford, MA, EE.UU.) dotado de una columna Luna 5 µ C18 (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.). Las muestras fueron sometidas a elución isocrática con una fase móvil de acetonitrilo y H₃PO₄ 0,10% en una relación 1:3 (v/v) a una velocidad de flujo de 1 mL/min.

También se determinó el contenido intracelular inicial de DNP-SG (luego de los 30 minutos de carga) en células controles y tratadas con BZL a fin de descartar un posible efecto de la cantidad inicial en la excreción. Las células fueron lisadas por sonicación (3 pulsos de 5 s, 30% de amplitud) en *buffer* HBSS. Los lisados resultantes fueron procesados de manera similar a las muestras de sobrenadante obtenidas para cuantificar

el DNP-SG excretado al medio de incubación.

El glutathion reducido (GSH) participa en la conjugación del CDNB para formar DNP-SG y además es transportado por MRP2. El contenido intracelular de GSH se determinó para descartar un posible efecto del mismo sobre la excreción de DNP-SG. Para ello, finalizado el tratamiento con BZL, un grupo de células fue lavado dos veces y lisado por sonicación (3 pulsos de 5 s, 30% de amplitud) en *buffer* PBS pH 7,50 suplementado con EDTA (6,30 mM). Las muestras fueron desproteinizadas por agregado de ácido sulfosalicílico 10% (p/v) en una relación 1:2 (v/v) y centrifugación a 10000 rpm (5 min, 4°C). Los sobrenadantes fueron recuperados y divididos en dos partes para la determinación de glutathion total y de glutathion oxidado respectivamente. El glutathion se cuantificó mediante el método de Tietze modificado por Griffith [226,227] que se basa en la formación de un derivado coloreado del DTNB catalizada por el glutathion. Las muestras para la determinación de glutathion oxidado fueron sometidas a un proceso de derivatización a fin de eliminar el glutathion reducido del medio de reacción. Para ello fueron incubadas durante 1 hora (30°C) con 2-vinilpiridina (3 µL/100 µL de desproteinizado) y trietanolamina (5 µL/100 µL de desproteinizado). Posteriormente fueron utilizadas para la determinación de glutathion oxidado. Para la determinación de glutathion total, se utilizaron los desproteinizados sin ningún procesamiento adicional. La determinación se llevó a cabo midiendo la velocidad de formación de DTNB reducido por espectrofotometría a 412 nm en un medio de reacción conteniendo β-NADPH (700 µL, 0,30 M), DTNB (100 µL, 6 mM), glutathion reductasa (0,50 unidades), muestra (2 µL para glutathion total y 20 µL para glutathion oxidado) y *buffer* PBS pH 7,50 suplementado con EDTA (6,30 mM) en c.s.p. 1 mL. La cuantificación absoluta se realizó por comparación con una curva de calibración. La cantidad intracelular de GSH (masa de GSH/10⁶ células) se determinó por diferencia entre la cantidad total de glutathion medida experimentalmente (incluye oxidado y reducido) y la cantidad intracelular de glutathion oxidado medida también experimentalmente.

7. Actividad de enzimas de biotransformación

7.1. Actividad de CYP3A4

La actividad de CYP3A4 fue determinada empleando el *kit* comercial P-450-Glo CYP3A4 Assay con luciferina-IPA como sustrato específico (Promega, Mannheim, BW, Alemania). El mismo es un derivado difusible de la luciferina de *Photinus pyralis* [ácido

(4S)-4,5-dihidro-2-(6'-hidroxi-2'-benzotiazolil)-4-tiazolcarboxílico] que por acción del CYP3A4 localizado intracelularmente es convertido en D-luciferina, la cual es detectada por emisión de luminiscencia luego del agregado de un reactivo de detección (Fig. 14).

Las células (2×10^4 células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos y se trataron con BZL (200 μ M, 48 h). Finalizado el tratamiento, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con PBS suplementado con 2% de SFB y luego durante 60 minutos a 37°C en medio de cultivo suplementado con proluciferina-IPA (3 μ M). A continuación se procedió a la detección de la luciferina formada mezclando volúmenes iguales de sobrenadante celular y el reactivo de detección provisto por el fabricante. Las lecturas se llevaron a cabo en un equipo Glomax 96 Microplate Luminometer (Promega).

Como control positivo de inducción de la actividad de CYP3A4, las células fueron tratadas con RIF (20 μ M, 48 h) [91].

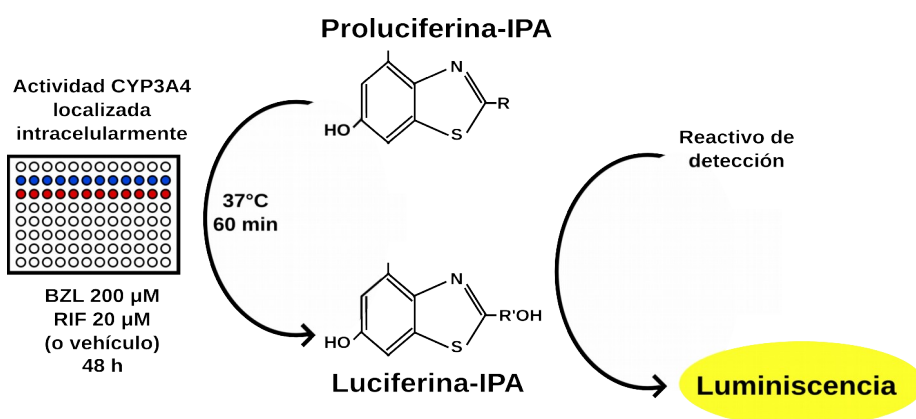


Fig. 14. Procedimiento para la determinación de la actividad de CYP3A4 en células HepG2 tratadas con BZL.

7.2. Actividad de GST

La actividad de GST se determinó según el método de Habig y col. midiendo la conjugación del CDNB con GSH catalizada por la GST (Fig. 15). La cinética de formación del producto DNP-SG fue monitoreada por espectroscopia UV y es una medida de la actividad global de GST [228].

Finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, levantadas en PBS pH 6,50 y lisadas por sonicación (3 pulsos de 5 s, 30% de amplitud). Los lisados fueron centrifugados a 10000 g (20 min, 4°C). Los *pellets* fueron descartados y los

sobrenadantes se utilizaron para determinación de la concentración de proteínas según el método de Lowry y col. [216] (como se describiese en la sección 4.3) y para la determinación de la actividad GST. Para ello se utilizaron alícuotas de sobrenadante (30 μ L por muestra) en un medio de reacción a 37°C conteniendo PBS pH 6,50 y CDNB 1 mM. Luego de largada la reacción con GSH (1 mM), se registró la absorbancia a 340 nm en forma continua durante 90 s siendo la pendiente una medida de la velocidad de formación de DNP-SG y ésta una medida de la actividad de GST. La conjugación espontánea (formación de DNP-SG en medio de reacción sin muestra) fue descontada en cada muestra.

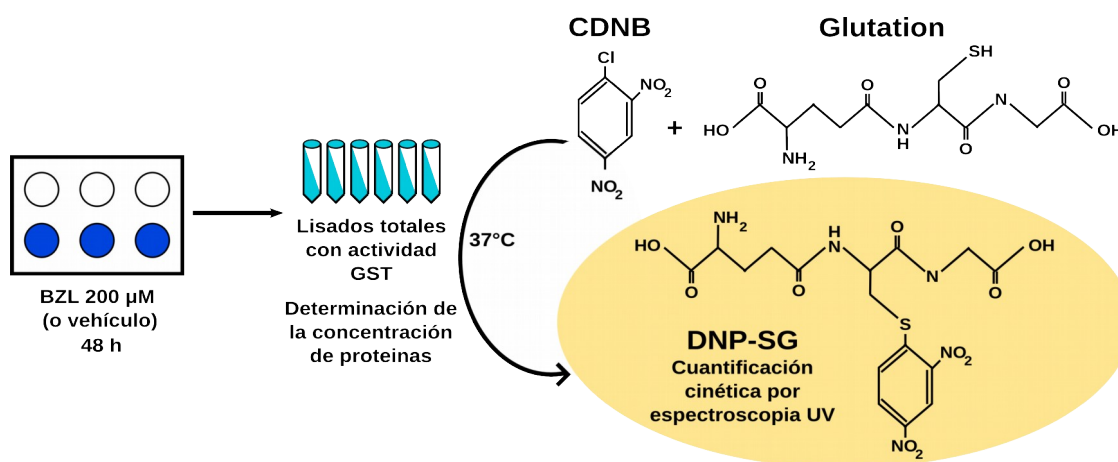


Fig. 15. Determinación de la actividad de GST en células HepG2 tratadas con BZL.

8. Participación de PXR en la regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas. Mediación de los efectos del BZL por PXR.

8.1. Sobreexpresión de PXR

A fin de obtener los primeros indicios sobre la participación de PXR en la regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas en el modelo de trabajo (células HepG2), se procedió a su sobreexpresión para el posterior análisis de la expresión de distintos genes *target* en esa condición. Las células fueron transfectadas con el plásmido pSG5-hPXR que expresa el receptor nuclear de origen humano bajo el control de un promotor constitutivo. El mismo fue cedido por los Dres. D.J. Mangelsdorf y S. Kliewer (Howard Hughes Medical Institute, EE.UU.) (Fig. 16B) [90]. Alternativamente y como control, las células fueron transfectadas con el plásmido pSG5 (Agilent) sin el

inserto que codifica PXR. El mismo fue cedido por la Dra. Patricia Elizalde (Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Buenos Aires, Argentina) (Fig. 16A).

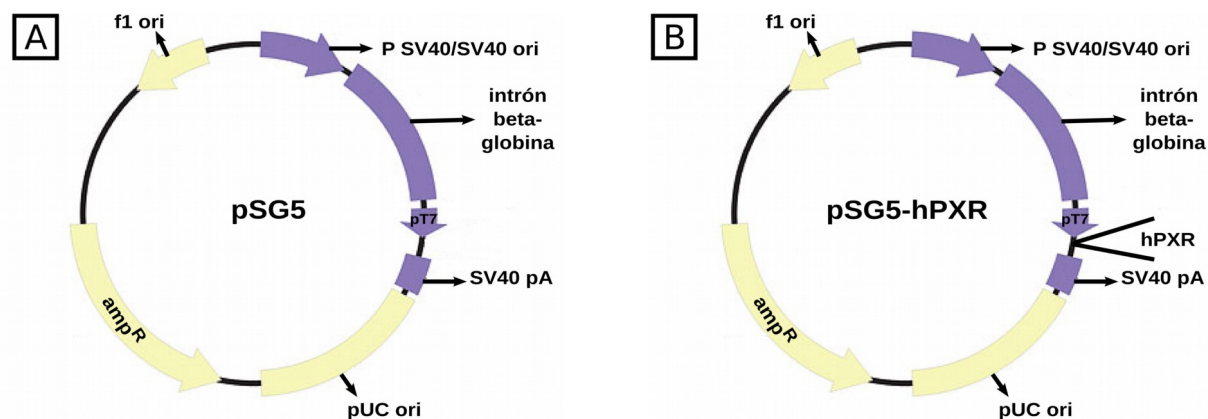


Fig. 16. Plásmidos pSG5 (panel A) y pSG5-hPXR (panel B) empleados para la transfección de células HepG2.

Los plásmidos fueron replicados por transformación en la cepa *Escherichia coli* DH5 α mediante el método del CaCl₂ y choque térmico [229]. Para ello se cultivaron bacterias en medio LB líquido (peptona 1% (p/v); extracto de levadura 0,50% (p/v); NaCl 1% (p/v)) hasta una densidad óptica a 650 nm de 0,400 - 0,600. A continuación las bacterias se centrifugaron en alícuotas de 1,50 mL a 5000 rpm (5 min, temperatura ambiente) y se lavaron con agua destilada. Seguidamente las bacterias se lavaron con una solución de CaCl₂ 0,10 M (4°C), se centrifugaron y se resuspendieron en una mezcla de CaCl₂ 0,10 M con 25 ng de ADN plasmídico y se incubaron por 1 hora en hielo. A continuación se efectuó un choque térmico a 42°C (90 seg) y posteriormente se enfrió en hielo durante 2 minutos. Finalmente, las bacterias se resuspendieron las bacterias en 1 mL de medio LB líquido y se incubaron durante 1 hora (37°C), se plaquearon en medio LB sólido (peptona 1% (p/v); extracto de levadura 0,50% (p/v); NaCl 1% (p/v); agar 1,50% (p/v)) suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) y se cultivaron *overnight* (37°C).

El plásmido se aisló mediante repique de colonias individuales en medio LB líquido suplementado con ampicilina, cultivo *overnight* y posterior purificación con el EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, NRW, Alemania). La concentración y la pureza del plásmido purificado se cuantificaron a partir de la medida de las absorbancias a 260 y a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 2S (Perkin Elmer) [229].

Para la transfección, las células se sembraron en placas de 6 pocillos (5x10⁵ células/pocillo), se cultivaron por 24 h y se transfectaron mediante incubación durante 24

h en medio de transfección. Para la preparación del medio de transfección se diluyeron 4,80 µg de plásmido en 250 µL de Optimem (Gibco)/pocillo, y por otro lado 12 µL de Lipofectamina2000 (Invitrogen) en 250 µL de Optimem/pocillo. Ambas mezclas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente procediéndose luego a la mezcla de las mismas seguida de incubación por 20 minutos. Finalmente se agregó medio de cultivo en cantidad suficiente para 2 mL y agregó al pocillo correspondiente. Luego de finalizada la transfección, las células fueron cultivadas por 48 h y utilizadas para la preparación de muestras.

8.2. Silenciamiento de PXR

A fin de confirmar la participación de PXR, el silenciamiento de PXR goza de una ventaja respecto de la sobreexpresión dado que en este último caso podría haber una limitación de cofactores que restringiría la respuesta.

Las células fueron transfectadas con un ARN pequeño de interferencia (siRNA). El mismo se une a las moléculas de ARNm del gen *target*, en este caso PXR, marcándolas para su degradación [230]. Como control se utilizó un siRNA no complementario a ningún ARNm humano. En estas condiciones se repitieron los tratamientos con BZL (200 µM, 48 h). Se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos en un medio de cultivo sin suplementar con antibióticos. Las células fueron cultivadas por 24 h luego de las cuales se reemplazó el medio de cultivo por la mezcla de transfección. Para la preparación de la misma se mezclaron Optimem (Santa Cruz) (20 µL/pocillo) con 5 µL/pocillo de PXR siRNA (h) (Santa Cruz, sc-44057) en el caso de las células con PXR silenciado (PXR⁻) o bien de Control siRNA-A (siRNA no silenciante, Santa Cruz, sc-37007) en el caso de las células con expresión normal de PXR (PXR⁺). Esta mezcla se dejó reposar durante 5 minutos luego de los cuales se agregó Optimem (50 µL/pocillo) suplementado con el reactivo de transfección Dharmafect4 (0,50 µL/pocillo, Dharmacon, Lafayette, CO, EE.UU.) y se incubó por 25 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se llevó a volumen final de 0,50 mL/pocillo con medio de cultivo libre de antibióticos obteniéndose así la mezcla final de transfección (siRNA 100 nM, Dharmafect4 1:1000 v/v) que fue agregada a las células.

Veinticuatro horas luego del agregado de la mezcla final de transfección se adicionó BZL (200 µM) o su vehículo y se incubó por otras 24 h luego de las cuales se retiró la mezcla de transfección y se reemplazó por medio de cultivo aún libre de antibiótico suplementado con BZL o vehículo con el cual se incubaron las células por otras 24 h luego de las cuales se procedió a la preparación de lisados celulares según se

describiere en la sección 4.1.

8.3. Ensayo de activación de PXR por BZL

La activación de PXR por BZL se verificó empleando células LS180 transfectadas de manera estable con un gen reportero codificando la Firefly Luciferasa aislada de *Photinus pyralis* bajo el control de una secuencia reguladora conteniendo dos elementos de respuesta a PXR. La activación de PXR por un ligando (ej. RIF) induce la expresión del gen reportero que es detectada mediante emisión de luminiscencia (Fig. 17).

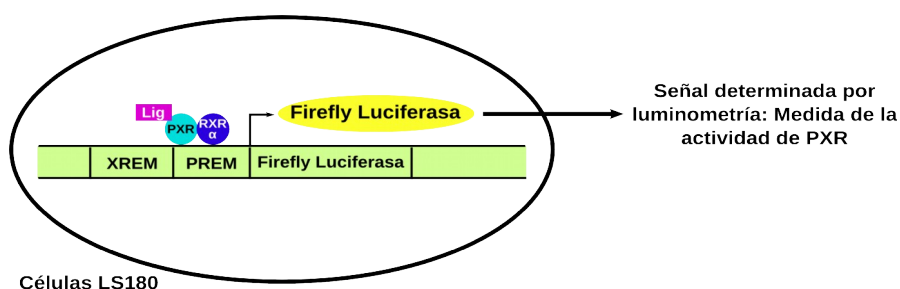


Fig. 17. Procedimiento para la determinación de la activación de PXR.

8.3.1. Generación de la línea estable codificando el sistema reportero

Los elementos de unión a PXR de aquellos genes sujetos a regulación por PXR se caracterizan por la presencia de repeticiones directas y repeticiones invertidas conservadas en los promotores y *enhancers* distales de los mismos. La inserción de estas secuencias reguladoras de un gen *target* típico de PXR, como ser el de CYP3A4, a 5' de un gen reportero se encuentra aceptada como sistema para la determinación de la actividad de PXR [91,125].

La línea LS180 codificando el sistema reportero se generó por transfección estable con el plásmido pGL4.21-PXRRE. El mismo fue cordialmente cedido por la Dra. Johanna Weiss (Universitätsklinikum, Heidelberg, BW, Alemania). El plásmido se construyó por clonado de dos secuencias 5' reguladoras del gen que codifica el CYP3A4 humano conteniendo módulos de respuesta a PXR, particularmente el elemento de respuesta proximal (PREM, -362/+53) y el elemento de respuesta a xenobióticos (XREM, -7836/-7208) [231] corriente arriba del gen de la luciferasa en el plásmido pGL4.21 (Promega) [147]. Ambos elementos de respuesta fueron aislados a partir de ADN genómico humano purificado a partir de sangre periférica mediante reacción en cadena de

la polimerasa de alta fidelidad con la enzima Pfu (Agilent). La correcta ligación de los fragmentos se verificó mediante secuenciación.

El plásmido fue replicado por transformación en cepas competentes de *Escherichia coli* empleando el *kit* TransformAid (Fermentas, Rockford, IL, EE.UU.). La suspensión celular se sembró en medio de cultivo LB sólido suplementado con ampicilina (100 µg/mL). El plásmido se aisló mediante repique de colonias individuales en medio LB líquido suplementado con ampicilina, cultivo *overnight* y posterior purificación con el Nucleospin Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, NRW, Alemania). La concentración y la pureza del plásmido purificado se cuantificaron a partir de la medida de las absorbancias a 260 y a 280 nm en un equipo BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, HA, Alemania) [229].

Las células LS180 fueron cultivadas en las condiciones descritas en la sección 2.2. La transfección se llevó a cabo mediante electroporación con el programa T-020 del equipo Nucleofector (Lonza, Colonia, NRW, Alemania). La composición de las mezclas de transfección correspondientes a las células controles y a las células transfectadas se detalla en la tabla 12.

	Controles	Transfectadas
Células LS180	2x10 ⁶	2x10 ⁶
Solución V (Lonza)	82 µL	82 µL
Aditivo (Lonza)	18 µL	18 µL
pGL4.21-PXRE	-	2 µg

Tabla 12. Composición de las mezclas de transfección de células LS180.

Luego de aplicado el pulso eléctrico se agregó inmediatamente 0,40 mL de medio de cultivo a la cubeta de electroporación transvasándose luego todo el contenido a un tubo conteniendo 1,50 mL de medio de cultivo. La suspensión resultante se sembró en una placa de 6 pocillos y se cultivó por 24 h luego de las cuales se reemplazó el medio de cultivo por un medio de selección suplementado con puromicina (10 µM). Las células se cultivaron y se repicaron periódicamente siempre en medio conteniendo puromicina hasta lograr una total negativización de los cultivos controles (sin plásmido), momento en el cual se dispuso de las células transfectadas (de ahora en más células LS180-PXRRE) para los estudios de activación de PXR.

8.3.2. Incubación de las células LS180-PXRRE con BZL

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (3×10^4 células/pocillo) en medio completo suplementado con puromicina y se cultivaron por 24 h luego de las cuales se retiró el medio y se reemplazó por medio suplementado con BZL (0; 2; 20; 100; 200; 500 y 1000 μM) o RIF como control positivo de activación de PXR (0; 0,50; 2; 5; 20; 50 y 100 μM). Las células se cultivaron por 24 h luego de las cuales se llevó a cabo la medida de la actividad de luciferasa empleando el kit Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega). Para ello se retiró el medio de cultivo y se agregó una mezcla de reactivo Steady-Glo y medio de cultivo fresco (1:1). Luego se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se cuantificó la emisión de luminiscencia en un equipo Glomax 96 Microplate Luminometer (Promega).

9. Transporte y metabolismo de BZL en células HepG2

9.1. Metabolismo de BZL en células HepG2

Para estimar si BZL es metabolizado en las condiciones de cultivo de las células HepG2, se determinó la proporción de BZL que sufre metabolización llevando a cabo un balance de masas entre el BZL agregado a las células y el BZL (sin modificar) remanente en el sistema luego de 2 h de incubación.

Las células HepG2 se sembraron en placas de 6 pocillos (5×10^5 células/pocillo) y se cultivaron por 72 h. Luego se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco suplementado con BZL 100 μM para cargar las células (o su vehículo). Inmediatamente luego del agregado se procedió a la preparación de muestras de las células correspondientes a tiempo 0. Las células restantes se cultivaron por 2 h procediéndose luego a la preparación de muestras. Las muestras obtenidas corresponden a los sobrenadantes celulares (medio de cultivo) y lisados celulares totales preparados por sonicación en *buffer* PBS (3 pulsos de 5 s, 30% de amplitud). El BZL presente en las muestras se extrajo con una mezcla de acetonitrilo:DMSO (1:1 v/v) seguida de desproteinización con TCA 10% (p/v). La concentración de BZL en los desproteinizados se cuantificó por HPLC acoplada a detección UV a 324 nm empleando un equipo Waters 600 (Waters) con una columna Luna 5 μ C18 (Phenomenex). Se llevó a cabo una elución isocrática con una fase móvil de acetonitrilo:agua en una relación 2:3 (v/v) a una velocidad de 1 mL/min. El balance de masa se realizó comparando los nmoles de BZL presentes en el sobrenadante y en el espacio intracelular luego de las 2 h de incubación con los

presentes en las muestras en el tiempo inicial (Fig. 18). Es de esperar que en caso de tener lugar una metabolización del BZL en el tiempo estudiado, el o los metabolitos resultantes exhibirán un tiempo de elución y/o longitud de onda de absorción distintos a los del BZL sin modificar, de forma que se observaría una disminución en el área del pico de BZL detectado por HPLC a 2 h con respecto al pico observado en la misma muestra a $t = 0$.

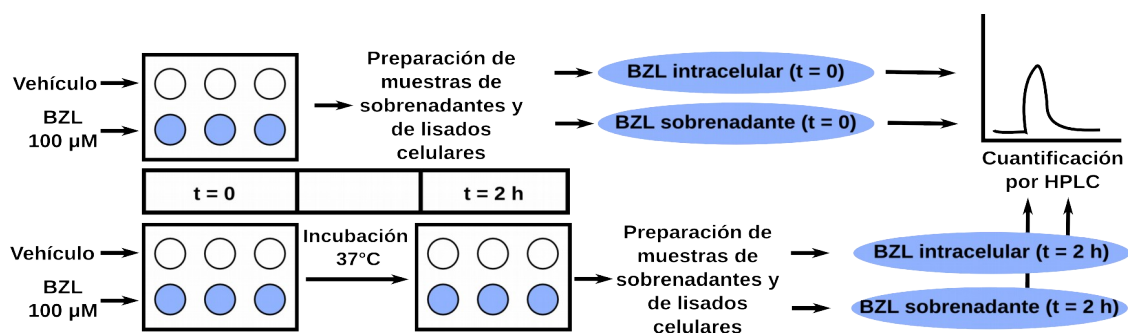


Fig. 18. Procedimiento para la estimación de la metabolización del BZL en células HepG2.

9.2. Transporte de BZL en células HepG2

9.2.1. Ensayos con inhibidores

En una primera aproximación para la determinación de el/los transportador/es involucrados en la extrusión del BZL al exterior celular se procedió a la determinación de BZL intracelular remanente en presencia de inhibidores de distintos transportadores (Fig. 19).

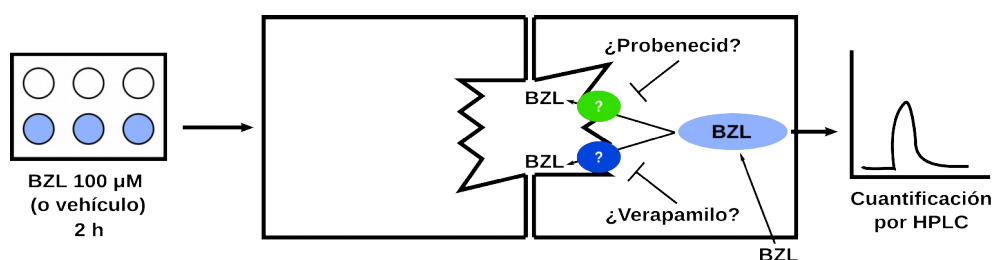


Fig. 19. Primera aproximación para la determinación de el/los transportador/es involucrados en el transporte de BZL.

Las células (5×10^5 células/pocillo) se sembraron y se cultivaron por 72 h luego de las cuales se incubaron con 100 μM de BZL por 2 h en presencia de probenecid (PRO, 1 mM, inhibidor de las MRPs) [225], verapamilo (VER, 100 μM , inhibidor de P-gp) [222] o el vehículo. Finalizada la incubación se obtuvieron lisados celulares por sonicación y se determinó la concentración de BZL en los mismos por HPLC como se describiese en la

sección 9.1. Una mayor concentración intracelular de BZL en las células coincubadas con un dado inhibidor indicaría que el transportador que es inhibido por el mismo sería responsable, al menos en parte, del transporte de BZL.

9.2.2. Silenciamiento de P-gp

Para confirmar el rol de P-gp en el transporte de BZL se disminuyó experimentalmente su expresión en células HepG2 mediante silenciamiento con un ARN de interferencia.

Las células (1×10^5 células/pocillo) se sembraron en placas de 24 pocillos en un medio de cultivo sin suplementar con antibióticos. Las células fueron cultivadas por 24 h luego de las cuales se reemplazó el medio de cultivo por una mezcla de transfección. Para la preparación de la misma se mezclaron Optimem (Santa Cruz) ($20 \mu\text{L/pocillo}$) con $5 \mu\text{L/pocillo}$ de P-gp siRNA (h) (Santa Cruz, sc-29395) en el caso de las células con silenciamiento de P-gp (P-gp⁻) o bien de Control siRNA-A (siRNA no silenciante, Santa Cruz, sc-37007) en el caso de las células con expresión normal de P-gp (P-gp⁺). Se dejó reposar durante 5 minutos luego de los cuales se agregó a la mezcla de transfección Optimem ($50 \mu\text{L/pocillo}$) suplementado con el reactivo de transfección Dharmafect4 ($0,50 \mu\text{L/pocillo}$, Dharmacon, Lafayette, CO, EE.UU.) y se incubó por 25 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se llevó a volumen final de $0,50 \text{ mL/pocillo}$ con medio de cultivo libre de antibióticos obteniéndose así la mezcla final de transfección (siRNA 100 nM , Dharmafect4 $1:1000 \text{ v/v}$) con la que las células fueron incubadas por 48 h. Finalizada la transfección las células fueron cultivadas por 24 h en medio fresco libre de antibióticos y se dispusieron para el ensayo de acumulación de BZL. Las células P-gp⁺ y P-gp⁻ se cargaron con BZL ($100 \mu\text{M}$) determinándose a continuación la concentración intracelular de BZL como se describiese en la sección 9.1. (Fig. 20).

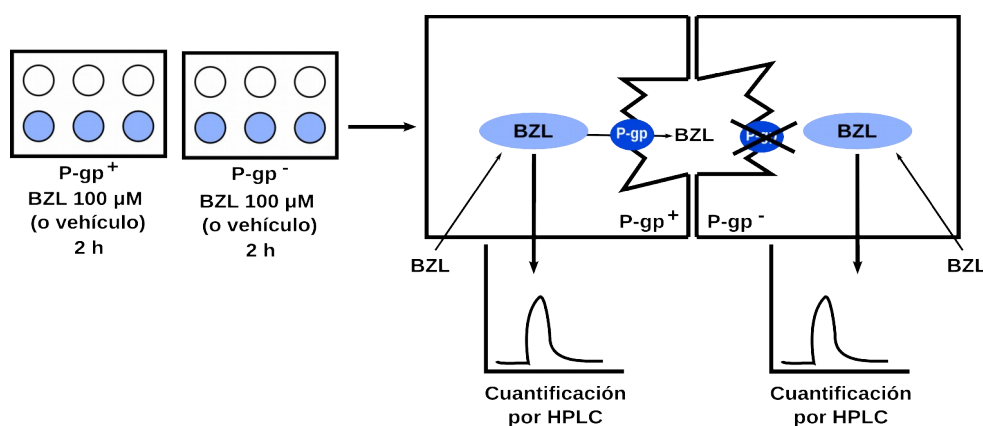


Fig. 20. Determinación de la acumulación de BZL en células P-gp⁺ y P-gp⁻.

9.2.3. Efecto del pretratamiento con BZL sobre su acumulación intracelular

Teniendo en cuenta que BZL puede inducir sistemas transportadores de drogas y que BZL puede ser transportado por estos sistemas, se determinó el efecto del pretratamiento con BZL (200 μM , 48 h) sobre la acumulación intracelular de BZL luego de una carga del mismo. Para ello se trataron las células en las condiciones descritas en la sección 3. Finalizado el tratamiento, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con BZL (100 μM , 2 h). Finalizada la incubación se llevó a cabo la lisis celular y se determinó la concentración intracelular de BZL en células controles y pretratadas con BZL por HPLC como fue descrito en la sección 9.1. Para verificar el rol de P-gp en el efecto observado se realizó la incubación de 2 h en presencia o ausencia de VER (100 μM) como inhibidor de P-gp (Fig. 21).

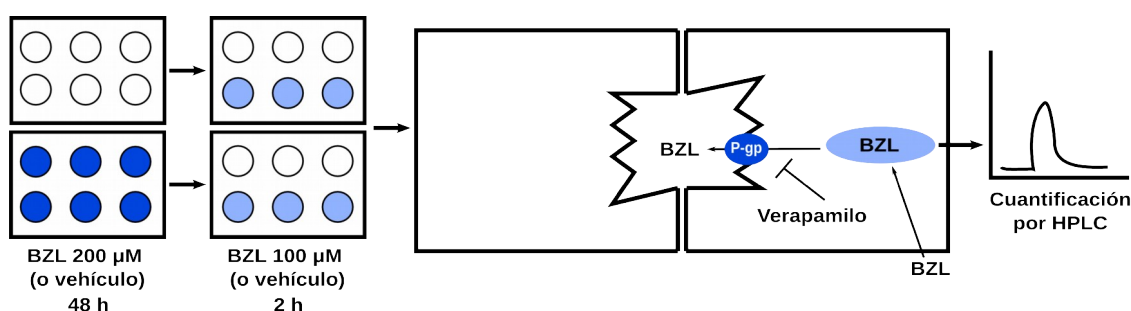


Fig. 21. Determinación de la acumulación de BZL en células pretratadas con BZL (200 μM , 48 h).

10. Estudios estadísticos

Todos los experimentos se realizaron con al menos $n = 3$. Las comparaciones de dos grupos experimentales se llevaron a cabo empleando el *test* de la *t* de Student para muestras no apareadas. Para comparaciones de más de dos grupos se llevó a cabo un análisis de la variancia seguido del *test* de Newman-Keuls. En todos los casos se consideraron significativas aquellas diferencias que arrojaron un valor de $p < 0,05$.

En el ensayo de activación de PXR, los puntos se ajustaron mediante regresión sigmoidea obteniéndose el valor de EC_{50} , concentración a la cual la activación de PXR es el 50% de la máxima. Los valores de r^2 siempre se mantuvieron por encima de 0,95. Todos los estudios estadísticos se utilizaron empleando el software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.).

1. Estudios de expresión a nivel de proteína

1.1. Expresión de transportadores de drogas en lisados celulares

En primer lugar se realizó un estudio concentración-respuesta de la expresión proteica de los transportadores canaliculares de drogas P-gp, MRP2 y BCRP y del transportador basolateral MRP3 en lisados de células HepG2 tratadas con BZL (48 h). Se observó una inducción significativa de P-gp por BZL 200 y 1000 μM (160 ± 27 y $282 \pm 94\%$ respectivamente vs C = $100 \pm 7\%$) (Fig. 22A). Un patrón similar se observó en la expresión de MRP2 (175 ± 15 y $491 \pm 5\%$ para 200 y 1000 μM de BZL respectivamente vs C = $100 \pm 14\%$) (Fig. 22B). BCRP y MRP3 no mostraron diferencias significativas a ninguna de las concentraciones estudiadas (Fig. 22C y D).

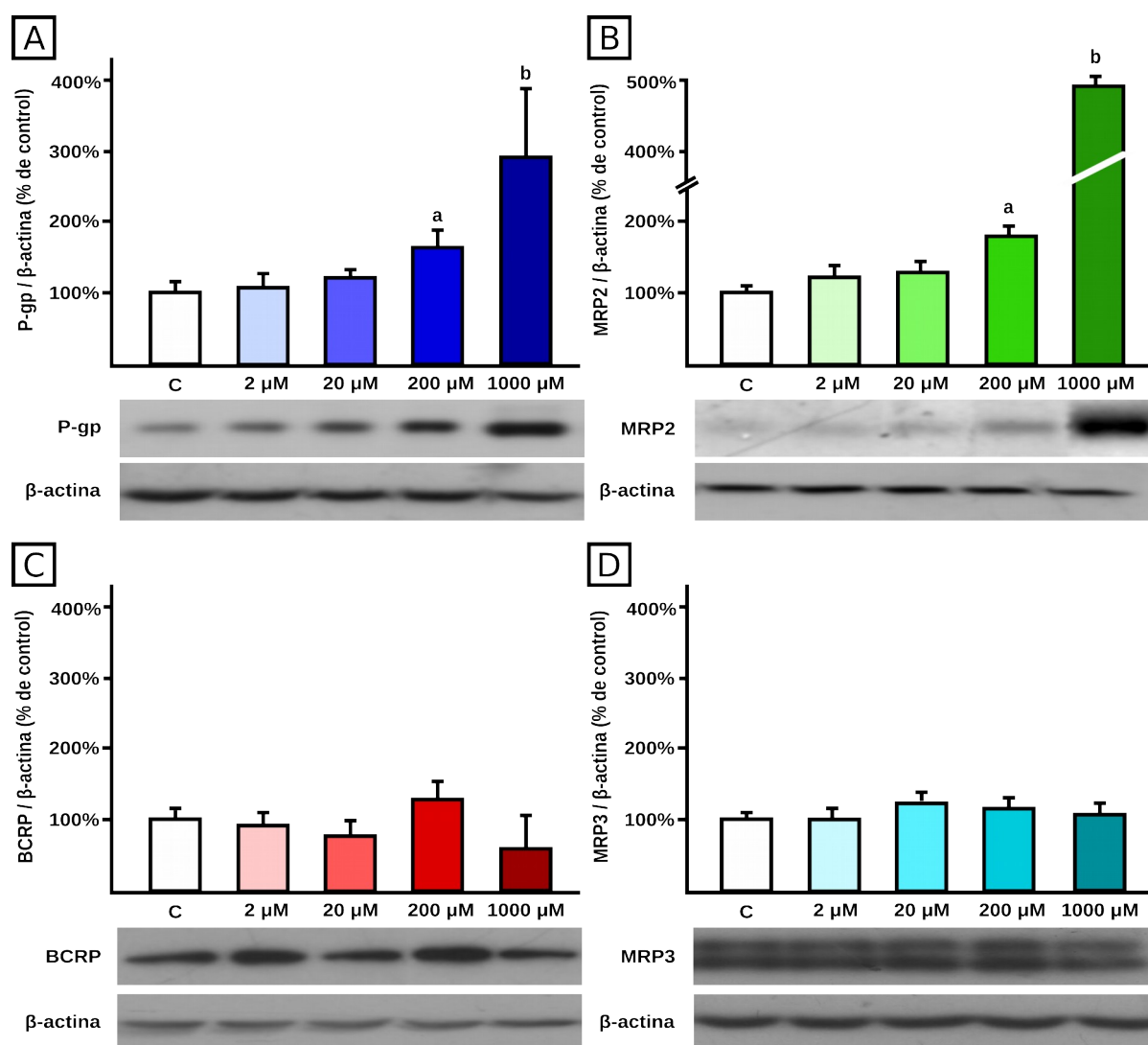


Fig. 22. Expresión proteica de P-gp (panel A), MRP2 (panel B), BCRP (panel C) y MRP3 (panel D) en lisados de células HepG2 tratadas con BZL. La D.O. de las proteínas respecto de la de β -actina se expresa como porcentaje de la relación en controles (C). a: distinto de C, b: distinto de BZL 200 μM ($p < 0,05$; $n = 3$).

La viabilidad celular se verificó mediante el ensayo de MTT para todas las concentraciones de BZL estudiadas. No se observaron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones, lo que independizaría los resultados obtenidos de posibles efectos de la viabilidad del cultivo (Fig. 23).

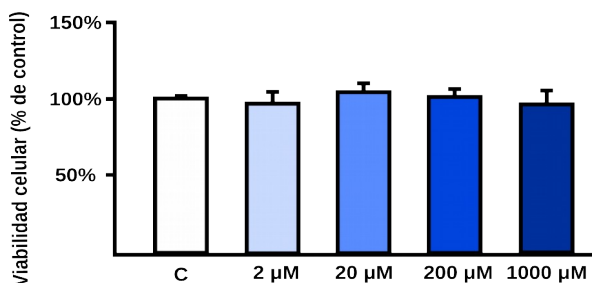


Fig. 23. Viabilidad de células HepG2 expuestas a distintas concentraciones de BZL (0-1000 µM, 48 h, n = 4).

Si bien la mayor respuesta a nivel de expresión proteica en P-gp y en MRP2 se observó a 1000 µM, esta concentración nunca se alcanza en condiciones farmacológicas por lo que se decidió llevar a cabo los estudios posteriores empleando 200 µM de BZL.

1.2. Expresión de P-gp y MRP2 en membrana plasmática

Utilizando preparaciones de membrana plasmática se corroboró una inducción significativa en respuesta al tratamiento con BZL 200 µM para P-gp y MRP2 (238 ± 76 vs C = 100 ± 28% y 250 ± 50 vs C = 100 ± 50% para P-gp y MRP2 respectivamente) como se había observado en lisados totales. Esto es indicativo de que los transportadores están localizados apropiadamente (Fig. 24, A y B respectivamente).

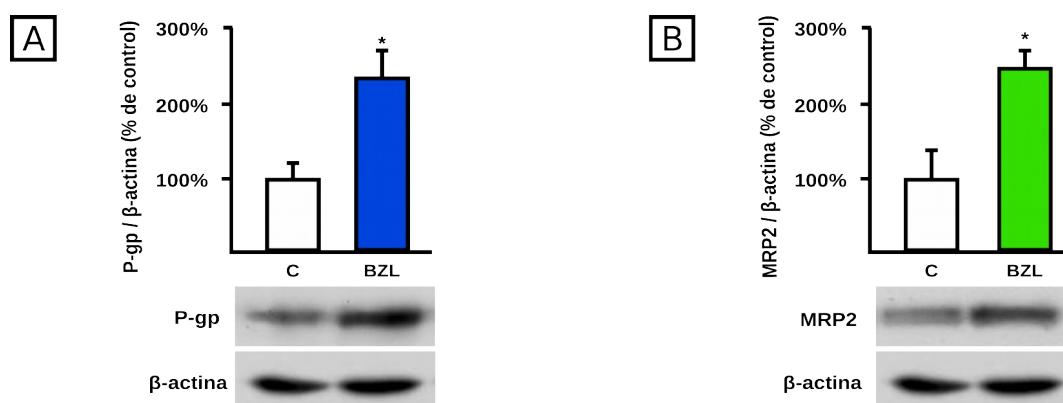


Fig. 24. Expresión proteica de P-gp (panel A) y MRP2 (panel B) en membrana plasmática de células HepG2 tratadas con BZL (200 µM, 48 h). La D.O. de P-gp y MRP2 respecto de la D.O. de β-actina se expresa como porcentaje de la relación obtenida en las células controles (C). * distinto de C (p < 0,05; n = 3).

1.3. Expresión de sistemas de biotransformación

Como sistema de fase I se analizó la expresión de CYP3A4. Los resultados mostraron una inducción en las células tratadas con respecto a las controles (143 ± 1 vs $100 \pm 22\%$) (Fig. 25).

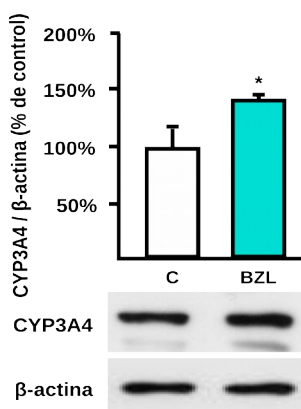


Fig. 25. Expresión proteica de CYP3A4 en células tratadas con BZL. La D.O. de CYP3A4 respecto de la de β-actina se expresa como porcentaje de la relación en células controles (C). * distinto de C ($p < 0,05$; $n = 3$).

Con respecto a fase II se observó inducción en GSTπ (175 ± 12 vs $100 \pm 35\%$) sin cambios en GSTα (93 ± 15 vs $100 \pm 14\%$), GSTμ (113 ± 25 vs $100 \pm 25\%$) ni UGT1A (72 ± 25 vs $100 \pm 21\%$) (Fig. 26).

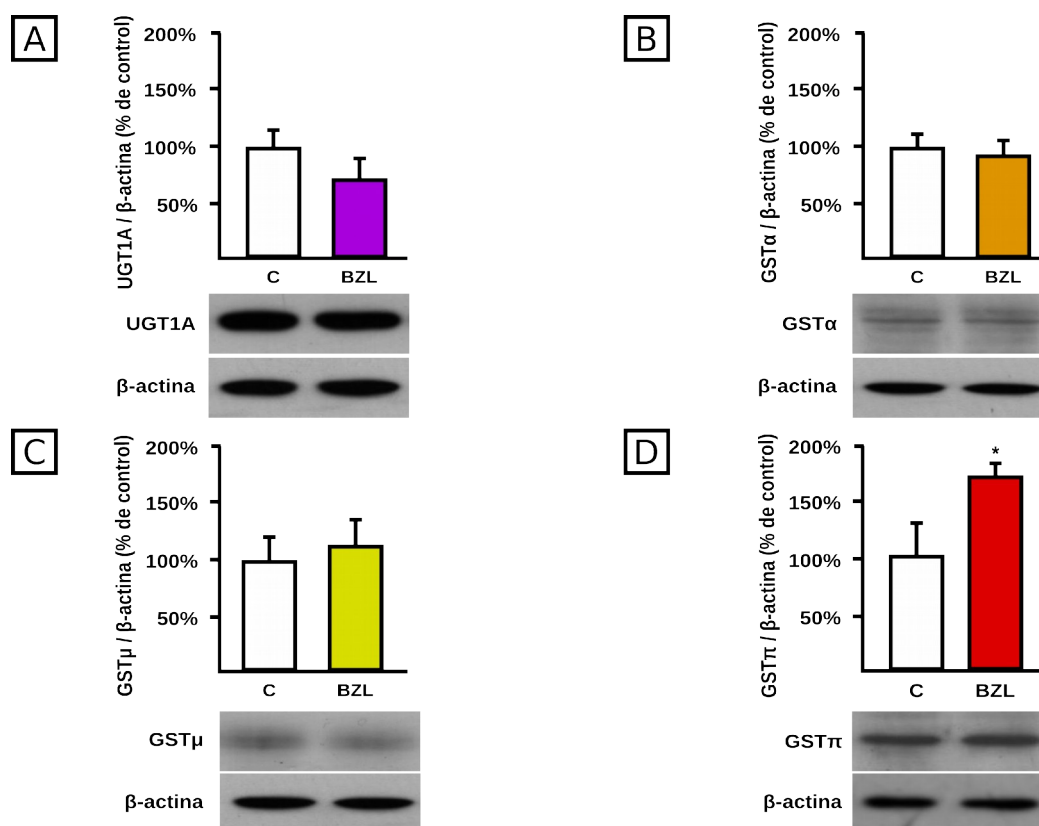


Fig. 26. Expresión proteica de UGT1A (panel A), GSTα (panel B), GSTμ (panel C) y GSTπ (panel D) en HepG2 tratadas con BZL. La D.O. de las proteínas respecto de la de β-actina se expresa como porcentaje de la relación en cél. controles (C). * distinto de C ($p < 0,05$; $n = 3$).

2. Estudios de expresión a nivel de ARNm

La expresión a nivel de ARNm de aquellos genes cuyos productos proteicos exhibieron una modificación en la expresión luego del tratamiento con BZL fue estudiada mediante qPCR.

En el caso de los sistemas de biotransformación se observó una inducción a nivel de ARNm para CYP3A4 (150 ± 23 vs $100 \pm 21\%$, Fig. 27A) y GST π (178 ± 94 vs $100 \pm 11\%$, Fig. 27B).

En el caso de los transportadores de drogas también se observa en ambos casos una inducción a nivel de ARNm en respuesta al tratamiento con BZL (200 μ M, 48 h) que se correlaciona con la inducción a nivel proteico de P-gp y MRP2. Concretamente la expresión fue de 332 ± 151 vs $100 \pm 69\%$ en el caso del mensajero de P-gp (Fig. 28A) y 293 ± 137 vs $100 \pm 57\%$ en el caso de MRP2 (Fig. 28B).

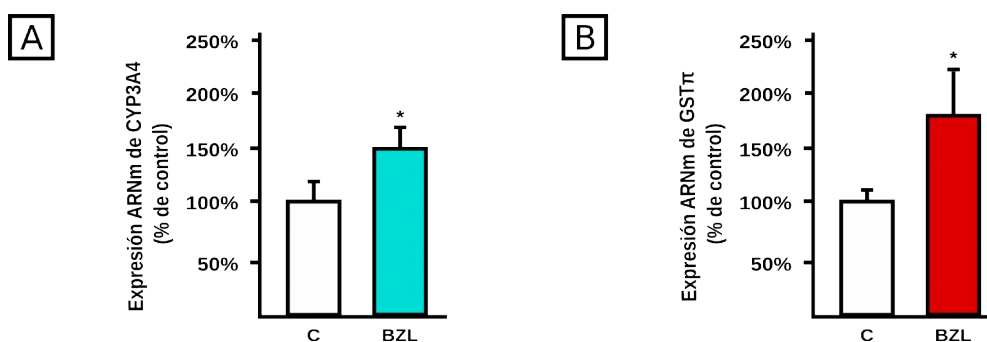


Fig. 27. Expresión a nivel de ARNm de CYP3A4 (panel A) y GST π (panel B) en células HepG2 tratadas con BZL (200 μ M, 48 h). La expresión de los correspondientes ARNm se normalizó con respecto a la expresión del ARNr 18S. * distinto de control (C) ($p < 0,05$; $n = 4-7$).

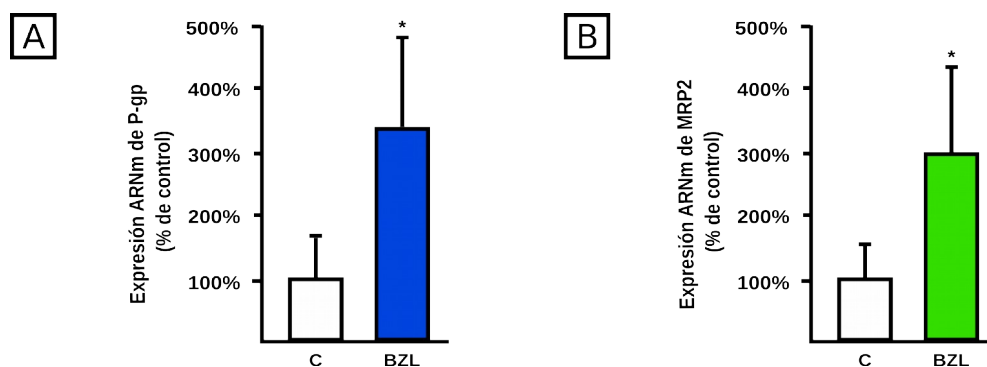


Fig. 28. Expresión a nivel de ARNm de P-gp (panel A) y MRP2 (panel B) en células HepG2 tratadas con BZL (200 μ M, 48 h). La expresión de los correspondientes ARNm se normalizó con respecto a la expresión del ARNr 18S. * distinto de control (C) ($p < 0,05$; $n = 6$).

3. Estudios de actividad

A fin de verificar la consecuencia funcional de la inducción observada en la expresión de distintos sistemas de biotransformación y proteínas transportadoras de drogas se cuantificó la actividad para cada uno en particular mediante ensayos específicos luego del tratamiento con BZL.

3.1. Actividad de sistemas de biotransformación

3.1.1. Actividad de CYP3A4

La actividad de CYP3A4 exhibió una disminución significativa en las células tratadas con BZL con respecto a las células controles (58 ± 6 vs $100 \pm 4\%$) (Fig. 29) indicando una inhibición de la actividad aún cuando se había observado una inducción de la expresión.

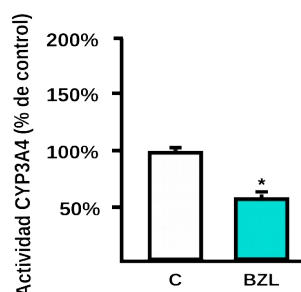


Fig. 29. Actividad de CYP3A4 en células HepG2 tratadas con BZL ($200 \mu\text{M}$, 48 h). La actividad en las células tratadas se expresa como porcentaje de la actividad registrada en las células controles (C). * distinto de control ($p < 0,05$; $n = 3$).

3.1.2. Actividad de GST

Se observó un incremento en la actividad de GST total (204 ± 32 vs $100 \pm 7\%$) en las células tratadas con BZL con respecto a las células controles (Fig. 30) hallándose un correlato funcional de la inducción en la expresión de GST π previamente observada.

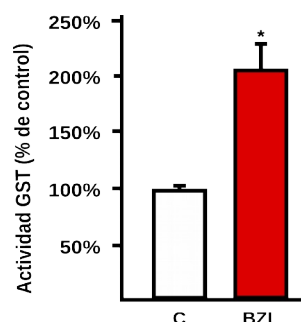


Fig. 30. Actividad de GST en células HepG2 tratadas con BZL ($200 \mu\text{M}$, 48 h). La actividad en las células tratadas se expresa como porcentaje de la actividad registrada en las células controles (C). * distinto de control ($p < 0,05$; $n = 3$).

3.2. Actividad de transportadores de drogas

3.2.1. Actividad de P-gp

En las células tratadas con BZL se observó una acumulación significativamente menor de R123 con respecto a las células controles (85 ± 2 vs $100 \pm 6\%$) (Fig. 31). Esto puede deberse a un mayor eflujo de R123 vía P-gp por la inducción observada en la expresión del transportador. El uso de VER (100 μ M) como inhibidor de P-gp confirma este supuesto.

La diferencia que se observó cuando las células controles y tratadas con BZL se coincubaron con VER (131 ± 3 y $116 \pm 8\%$ con respecto a las células controles en ausencia de VER, consideradas como 100%) se debería a la presencia de un proceso de transporte o metabolización que esta siendo modificado por BZL y no es inhibible por VER.

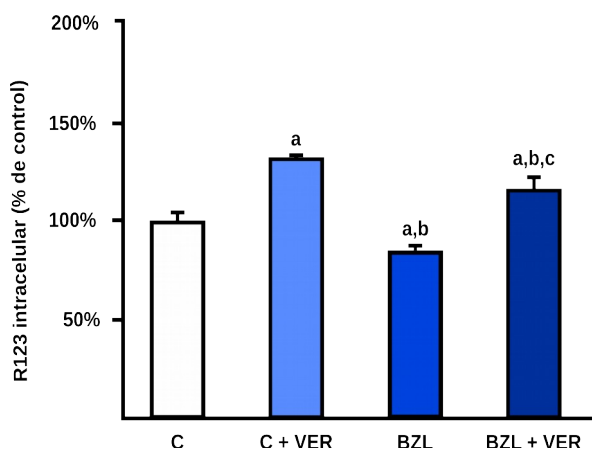


Fig. 31. Actividad de P-gp en células HepG2 tratadas con BZL (200 μ M, 48 h). Se determinó la cantidad de R123 acumulada intracelularmente. La actividad se expresa como porcentaje de la actividad en las células controles (C). a: distinto de C, b: distinto de C + VER, c: distinto de BZL 200 μ M ($p < 0,05$; $n = 3$).

3.2.2. Actividad de MRP2

La actividad de MRP2 se determinó midiendo la cantidad del sustrato modelo DNP-SG excretado acumulativamente luego de 60 minutos. Se observó un incremento significativo en la cantidad excretada por las células tratadas con BZL con respecto a las células controles (181 ± 1 vs $100 \pm 7\%$). No se observó diferencia entre grupos ante el agregado de PRO (1 mM) confirmando la participación de un transportador de la familia MRP en el efecto observado (75 ± 1 y $81 \pm 6\%$ en las células controles y tratadas con BZL

respectivamente cuando éstas son coincubadas con PRO con respecto a las células controles en ausencia de PRO) (Fig. 32).

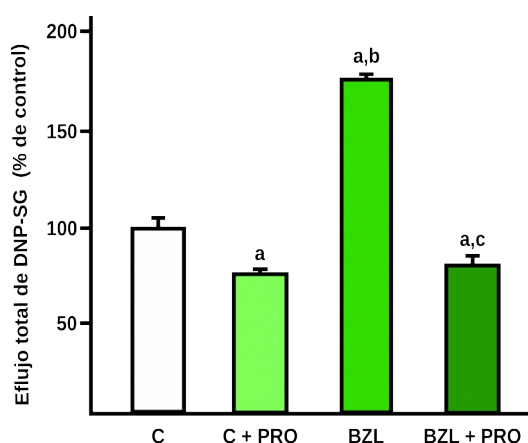


Fig. 32. Actividad de MRP2 en células HepG2 tratadas con BZL (200 μ M, 48 h). Se determinó el eflujo de DNP-SG luego de 60 minutos. La actividad se expresa como porcentaje de la actividad en las células controles (C). a: distinto de C, b: distinto de C + PRO, c: distinto de BZL 200 μ M ($p < 0,05$; $n = 3$).

Como control, se evaluó la cantidad de DNP-SG intracelular formada luego de la incubación con CDNB previo al eflujo. No se observaron diferencias significativas en las células tratadas con BZL con respecto a las controles (106 ± 4 vs $100 \pm 3\%$) (Fig. 33).

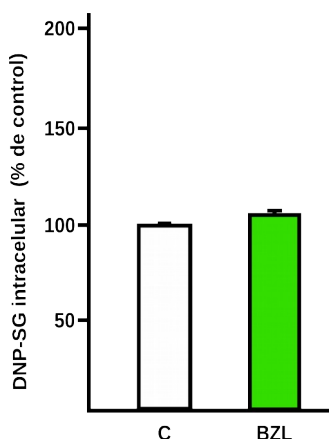


Fig. 33. Cantidad de DNP-SG intracelular en células HepG2 tratadas con BZL (200 μ M, 48 h) e incubadas con CDNB 0,50 M (30 min). La cantidad de DNP-SG se expresa como porcentaje de la cantidad en las células controles (C).

Los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH) se determinaron a fin de descartar una potencial influencia de los mismos en la secreción de DNP-SG. No se observaron cambios en las células tratadas con BZL respecto a las células controles (116 ± 12 vs $100 \pm 10\%$) (Fig. 34).

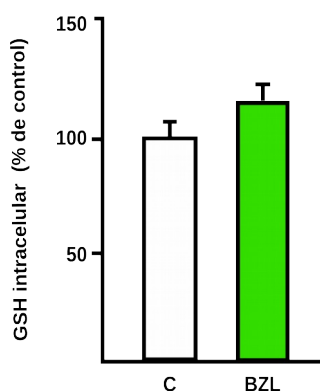


Fig. 34. Cantidad de GSH intracelular en células HepG2 tratadas con BZL (200 μ M, 48 h). La cantidad de GSH se expresa como porcentaje de la cantidad en las células controles (C).

4. Expresión de PXR y cofactores en la línea celular HepG2

A fin de caracterizar el mecanismo de acción del BZL en el modelo empleado, se procedió en primer lugar a la determinación de la expresión basal de PXR, su *partner* RXR α y el coactivador p300 en el clon de la línea celular HepG2 presente en nuestro laboratorio. Para las tres proteínas se detectó expresión proteica significativa (Fig. 35) representando un primer control de la validez del estudio de vías reguladoras dependientes de PXR en el presente modelo.



Fig. 35. Expresión proteica de PXR (panel A), RXR α (panel B) y p300 (panel C) en la línea celular HepG2.

5. Rol de PXR en el efecto de BZL sobre sistemas de biotransformación y transportadores de drogas

Para evaluar la mediación de un dado receptor nuclear en una respuesta biológica existen dos estrategias:

a- sobreexpresar el receptor nuclear: permite sugerir la intervención del receptor nuclear en la regulación de los genes blanco.

b- silenciar el receptor nuclear: permite confirmar definitivamente la participación del receptor nuclear en la regulación de los genes blanco por un ligando.

5.1. Experimentos de sobreexpresión de PXR

Si bien se logró corroborar la expresión de RXR α y p300 en el modelo en estudio, la

función de PXR y su efecto regulador sobre genes *target* (ej. sistemas de biotransformación y excreción de xenobióticos) depende de un concierto de proteínas correguladoras que excede a las anteriores. La expresión y función de las mismas varía entre los distintos tipos celulares, podría variar entre clones de líneas celulares y por ende modificar la regulación génica vía PXR [118,232,233]. Por lo tanto, resultó pertinente corroborar la sensibilidad de genes blanco de PXR a niveles variables del mismo en el presente modelo. Como genes testigo se emplearon los que codifican P-gp, MRP2, BCRP y MRP3. Un cambio en sus niveles de expresión en respuesta a variaciones en los niveles de PXR (muestra de sensibilidad a PXR) indicaría integridad de la vía de regulación dependiente de PXR en el modelo empleado. De verificarse lo anterior se habilitaría el uso del presente modelo para el estudio de la regulación por BZL.

5.1.1. Sobreexpresión de PXR en células HepG2

La sobreexpresión de PXR se estableció transfectando las células con el plásmido pSG5-hPXR, que codifica el receptor nuclear de origen humano bajo el control de un promotor constitutivo. Las células que se utilizaron como control se transfectaron con el vector vacío (pSG5).

La expresión de PXR en células transfectadas con el pSG5-hPXR se determinó por inmunocuantificación. Se observó, tal cual se esperaba, una sobreexpresión de PXR en las células transfectadas con el pSG5-hPXR (375 ± 28 vs $100 \pm 11\%$ en las células transfectadas con el vector vacío) (Fig. 36A). Como control se verificó que la transfección no modifica la expresión de RXR α , *partner* obligado de PXR (92 ± 25 vs $100 \pm 5\%$ en las células transfectadas con el pSG5) (Fig. 36B).

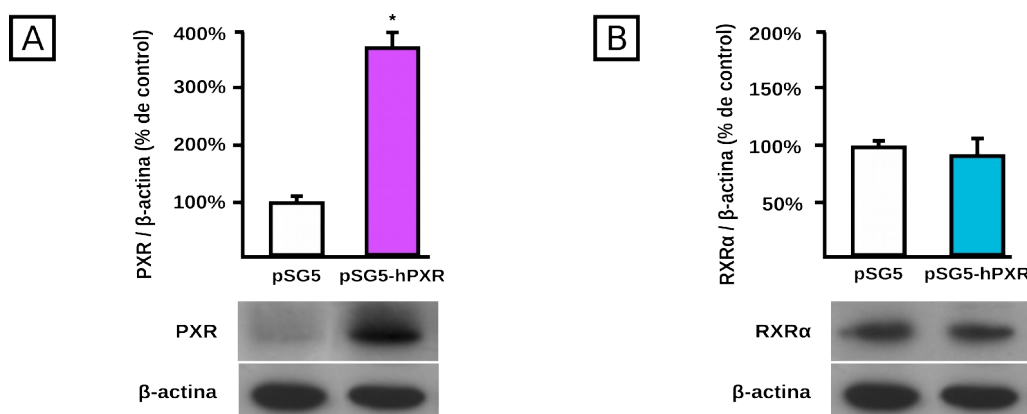


Fig. 36. Expresión proteica de PXR (panel A) y RXR α (panel B) en células HepG2 transfectadas con el pSG5 o con el pSG5-hPXR. La D.O. de los receptores nucleares respecto de la de β -actina se expresa como porcentaje de la relación en las células transfectadas con el pSG5. * distinto de pSG5 ($p < 0,05$; $n = 3$).

5.1.2. Expresión de genes blanco en condiciones de sobreexpresión de PXR

Una vez establecida la sobreexpresión de PXR, se cuantificó la expresión de P-gp, MRP2, BCRP y MRP3, como ejemplo de genes blanco de PXR, en condiciones basales (células transfectadas con el pSG5) y de sobreexpresión de PXR (células transfectadas con el pSG5-hPXR).

Los resultados mostraron en los cuatro casos una inducción significativa del respectivo transportador en respuesta al aumento en la expresión de PXR. La expresión con respecto a las células transfectadas con el vector no codificante pSG5 resultó 129 ± 4 vs $100 \pm 6\%$ para P-gp (Fig. 37A), 173 ± 5 vs $100 \pm 11\%$ para MRP2 (Fig. 37B), 156 ± 16 vs $100 \pm 8\%$ (Fig. 37C) y 180 ± 8 vs $100 \pm 2\%$ para MRP3 (Fig. 37D). De esta manera se corroboró la inducibilidad de los genes estudiados por PXR. Estos resultados indican que el receptor nuclear es funcional en el modelo empleado aún en ausencia de un ligando exógeno.

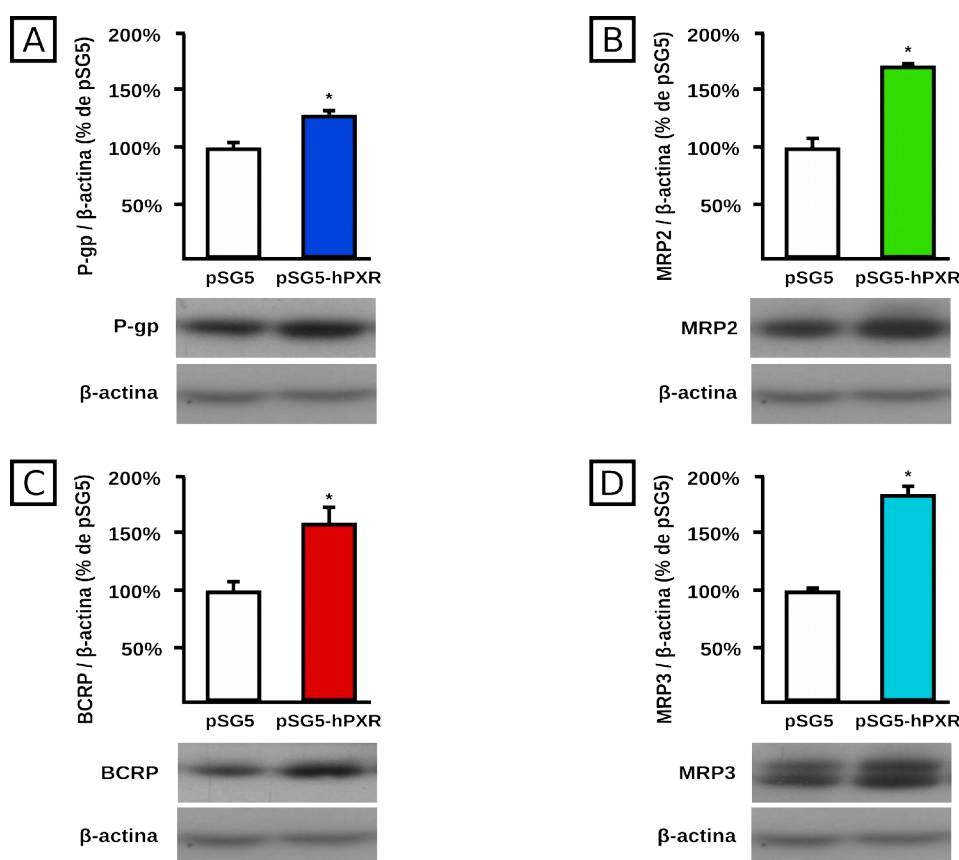


Fig. 37. Expresión proteica de P-gp (panel A), MRP2 (panel B), BCRP (panel C) y MRP3 (panel D) en lisados de células HepG2 transfectadas con el plásmido pSG5 (barras blancas) o con el pSG5-hPXR (barras coloreadas). La D.O. de los transportadores con respecto a la D.O. de β -actina se expresa como porcentaje de la relación obtenida en células transfectadas con el pSG5. * distinto de pSG5 ($p < 0,05$; $n = 3$).

De estos experimentos, donde se corrobora la factibilidad de una regulación de los genes específicos aquí estudiados vía PXR, la mejor estrategia para evaluar si PXR es el mediador de los efectos de BZL (Resultados I, secciones 1 y 2) resultó ser el silenciamiento del receptor nuclear. Una disminución experimental de la cantidad de PXR disponible resultaría también en una menor cantidad de PXR activado por BZL, que no sería suficiente para evocar respuesta.

5.2. Experimentos de silenciamiento de PXR

5.2.1. Silenciamiento de PXR en células HepG2

El silenciamiento de la expresión de PXR en las células HepG2 se llevó a cabo por transfección con un ARN pequeño de interferencia (siRNA) específico dirigido contra PXR humano (células PXR⁻) obteniéndose un silenciamiento a nivel de proteína del 74% respecto de las células PXR⁺ (26 ± 21 vs $100 \pm 20\%$) (Fig. 38).

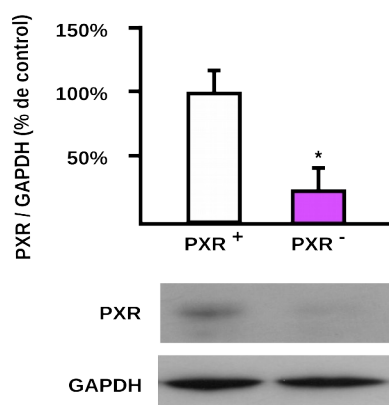


Fig. 38. Expresión proteica de PXR en lisados de células HepG2 transfectadas con un siRNA contra PXR (PXR⁻) y con un siRNA control no silenciante (PXR⁺). La D.O. de PXR con respecto a la D.O. de GAPDH se expresa como porcentaje de la relación obtenida en las células PXR⁺. * distinto de PXR⁺ ($p < 0,05$; $n = 3$).

5.2.2. Efecto del silenciamiento de PXR sobre la inducción de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por BZL

Para corroborar la mediación de PXR en los efectos de BZL (200 μ M, 48 h) se repitió el tratamiento en células PXR⁺ y PXR⁻. Para P-gp se observó una inducción por BZL en células PXR⁺ (186 ± 23 vs $100 \pm 31\%$) sin inducción significativa en las células PXR⁻ (111 ± 22 vs $100 \pm 19\%$) (Fig. 39A). Un resultado similar se observó para MRP2 con una

inducción en las células PXR⁺ (188 ± 27 vs $100 \pm 38\%$) sin cambios significativos en las células PXR⁻ (90 ± 35 vs $100 \pm 4\%$) (Fig. 39B).

En los sistemas de biotransformación se observó una inducción de CYP3A4 en las células PXR⁺ (268 ± 73 vs $100 \pm 48\%$) sin cambios significativos en las células PXR⁻ (61 ± 22 vs $100 \pm 33\%$) (Fig. 39C). En GST π se observó una inducción en las células PXR⁺ (131 ± 6 vs $100 \pm 15\%$) sin cambios en las células PXR⁻ (104 ± 28 vs $100 \pm 21\%$) (Fig. 39D).

La ausencia de efecto de BZL en las células PXR⁻ indica la mediación de PXR en el mismo.

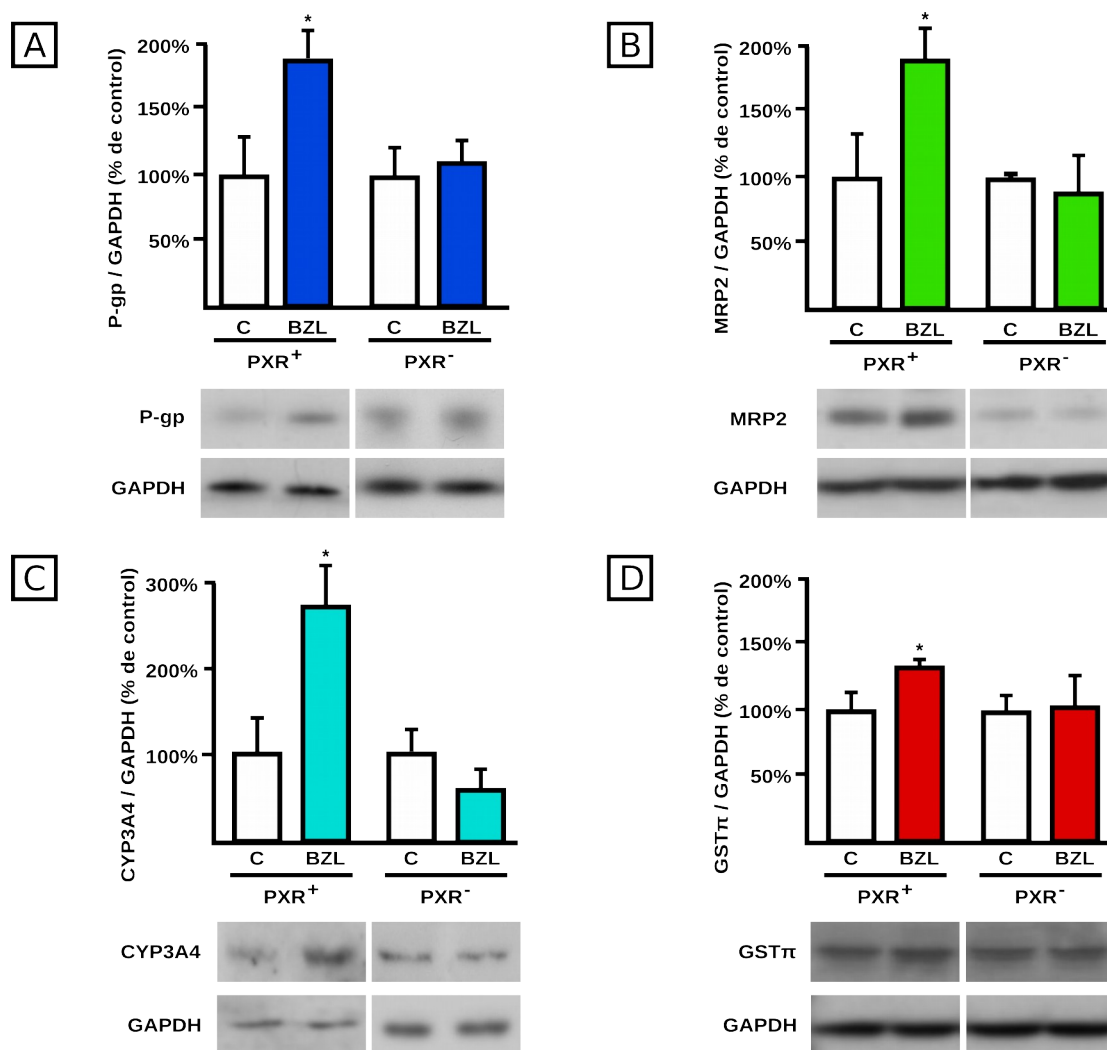


Fig. 39. Expresión proteica de P-gp (panel A), MRP2 (panel B), CYP3A4 (panel C) y GST π (panel D) en lisados de células HepG2 PXR⁺ y PXR⁻. La D.O. de cada proteína con respecto a la D.O. de GAPDH se expresa como porcentaje de la relación obtenida en las células controles (C). * distinto de control ($p < 0,05$; $n = 3$).

Luego de confirmarse la participación de PXR en la regulación de P-gp, MRP2, CYP3A4 y GST π por BZL se decidió profundizar sobre el mecanismo de la inducción. Existen dos posibilidades:

1. Que BZL induzca la expresión de PXR (y/o de su *partner* RXR α) y de esta manera regule la expresión de los genes aquí estudiados.
2. Que BZL sea sólo activador/ligando de PXR (sin modificar su expresión) y provoque una inducción de los genes estudiados como ocurre para la mayoría de los inductores previamente estudiados [91,92].

Alternativamente, ambas posibilidades podrían ocurrir simultáneamente.

5.3. Efecto de BZL sobre los niveles de expresión de PXR y RXR α

A fin de verificar si el mecanismo de inducción por BZL involucra un aumento en la expresión de PXR (y/o de su *partner* RXR α) se determinaron los niveles de ambos receptores nucleares.

No se observaron cambios significativos en la expresión de PXR ni en la expresión de RXR α en las células tratadas con BZL con respecto a las células controles (99 ± 18 vs $100 \pm 25\%$ y 93 ± 8 vs $100 \pm 13\%$ para PXR y RXR α respectivamente) (Fig. 40). De esta manera se descarta la inducción de la expresión de los receptores nucleares como mecanismo de inducción de los sistemas de biotransformación y excreción previamente mostrada (Resultados I, secciones 1 y 2).

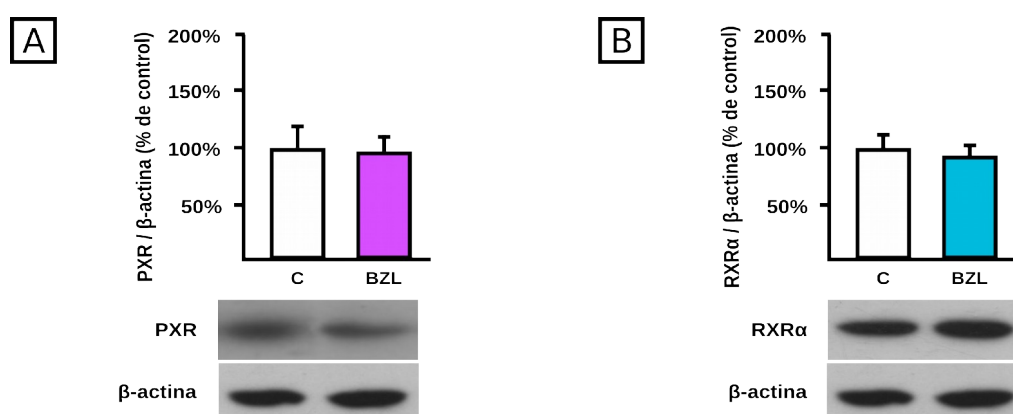


Fig. 40. Expresión proteica de PXR (panel A) y RXR α (panel B) en células HepG2 tratadas con BZL (200 μ M, 48 h). La D.O. de las proteínas con respecto a la de β -actina se expresa como porcentaje de la relación en las células controles (C). * distinto de C ($p < 0,05$; $n = 3$).

5.4. Activación de PXR por BZL

A fin de determinar si el mecanismo por el cual PXR media el efecto de BZL consiste en una activación del mismo, se determinó la actividad del receptor nuclear en presencia de distintas concentraciones de BZL. Para ello se utilizaron células LS180-PXRRE que expresan en forma estable un gen reportero sensible a la activación de PXR. Empleando estas células se construyó una curva de activación de PXR por BZL verificándose el rol de BZL como activador del receptor nuclear. Por regresión sigmoidea se obtuvo un valor de EC_{50} de $259 \pm 38 \mu\text{M}$ (Fig. 41A). Como control positivo de activación de PXR se empleó RIF corroborándose la activación esperada de PXR con un valor estimado por regresión sigmoidea de EC_{50} de $19 \pm 3 \mu\text{M}$ (Fig. 41B).

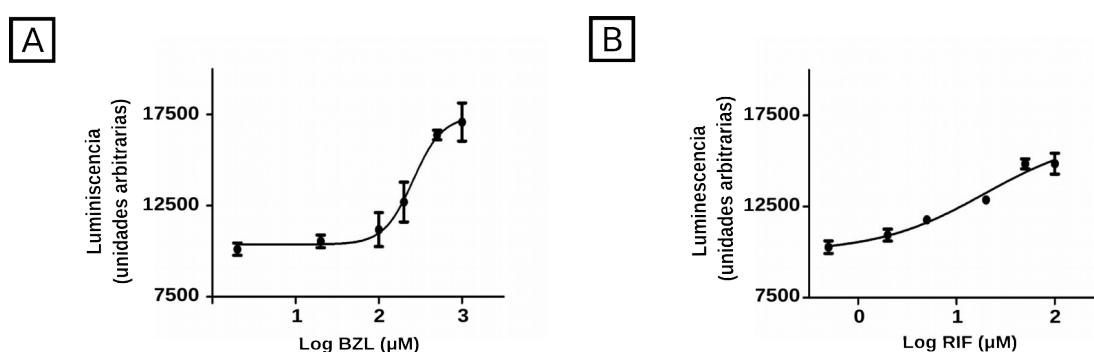


Fig. 41. Activación de PXR en respuesta a BZL (panel A) y RIF (panel B) en células LS180-PXRRE. Las medidas de luminiscencia se expresan en unidades arbitrarias y fueron ajustadas por regresión sigmoidea obteniéndose el valor de EC_{50} ($n = 3$).

1. Metabolismo de BZL en células HepG2

Para estimar si BZL es metabolizado en las condiciones de cultivo de las células HepG2, se realizó un balance de masas luego de 2 h de incubación a fin de detectar una posible disminución en la cantidad de BZL sin modificar.

Las cantidades recuperadas inicialmente ($t = 0$) fueron $2,20 \pm 0,13$ y $31,92 \pm 1,36$ nmoles de BZL en el espacio intracelular y en el sobrenadante respectivamente, obteniéndose una sumatoria en todo el sistema de $34,12 \pm 1,37$ nmoles de BZL. Mientras que luego de 2 h de incubación las cantidades recuperadas fueron $0,89 \pm 0,14$ y $33,72 \pm 1,00$ nmoles de BZL en el espacio intracelular y el sobrenadante respectivamente con una sumatoria en todo el sistema de $34,61 \pm 1,01$ nmoles de BZL (Fig. 42).

En el presente diseño experimental no se observaron cambios en la cantidad total de BZL (intracelular + sobrenadante) luego de 2 h de incubación con BZL ($100 \mu\text{M}$). Sin embargo, una disminución significativa se observó en la cantidad de BZL intracelular con respecto a la cantidad intracelular inicial. Este resultado indicaría que, luego de una difusión rápida, se produce la extrusión de la droga por acción de un sistema transportador. Por otro lado, no hay cambios en la cantidad de BZL recuperada del sobrenadante celular (medio de cultivo).

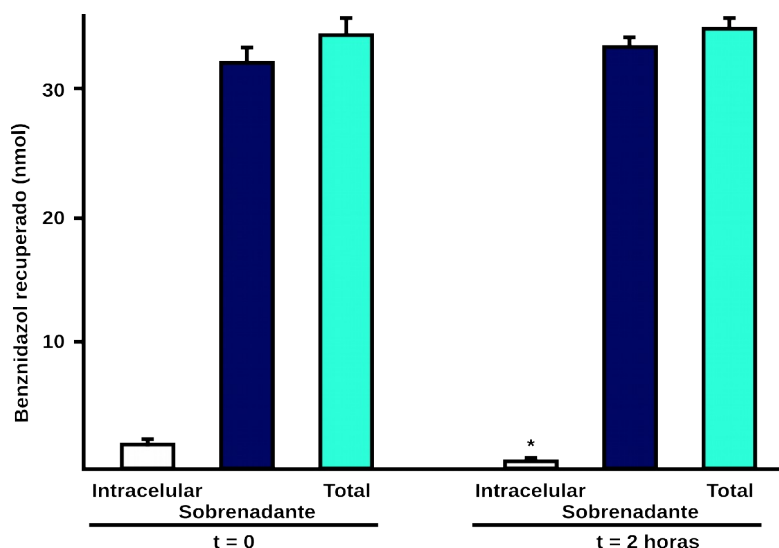


Fig. 42. Cantidades de BZL (nmoles) recuperadas luego del agregado de BZL $100 \mu\text{M}$ a tiempo 0 (panel izquierda) y luego de 2 h de incubación (panel derecha). * distinto de intracelular a tiempo 0 ($p < 0,05$, $n = 3$).

2. Efecto de inhibidores de transportadores de drogas sobre la acumulación de BZL

Habiéndose corroborado la ausencia de metabolización durante las primeras 2 h de incubación con BZL, se procedió a realizar una primera aproximación para determinar el/los transportador/es involucrado/s en la extrusión de BZL de células HepG2. Para ello se coincubaron las células con BZL (100 μ M, 2 h) y PRO (1 mM) o VER (100 μ M) como inhibidores del transporte determinándose la cantidad de BZL retenido luego de la incubación.

Se observó una acumulación significativamente mayor en las células coincubadas con VER respecto de las células controles no expuestas a ningún inhibidor (128 \pm 16 vs 100 \pm 3%) sugiriendo la dependencia del transporte de BZL, al menos en parte, de P-gp. No se observaron cambios significativos en la acumulación de BZL en las células coincubadas con PRO (88 \pm 8 vs 100 \pm 3%) (Fig. 43).

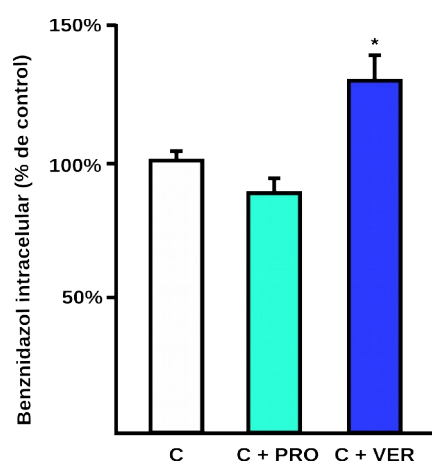


Fig. 43. BZL retenido intracelularmente luego de la incubación con BZL (100 μ M, 2 h) en presencia o ausencia de PRO (1 mM) y VER (100 μ M) como inhibidores del transporte. *distinto de control ($p < 0,05$, $n = 3$).

3. Efecto del silenciamiento de P-gp sobre la acumulación de BZL

3.1. Silenciamiento de P-gp

A fin de confirmar la participación de P-gp en el transporte de BZL en células HepG2 se procedió a su silenciamiento mediante transfección con un siRNA. En estas condiciones se logró una disminución significativa de la expresión proteica de P-gp en las células transfectadas con el siRNA específico contra el mensajero de P-gp humano (P-gp⁻) con respecto a las células transfectadas con el siRNA control no silenciante (P-gp⁺)

(50 ± 12 vs $100 \pm 7\%$) (Fig. 44).

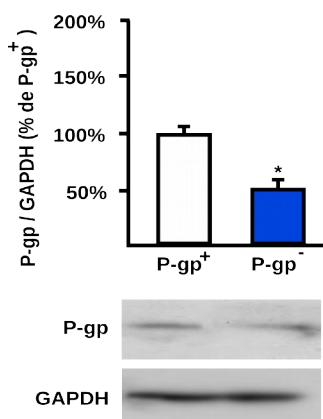


Fig. 44. Expresión proteica de P-gp en lisados de células HepG2 P-gp⁻ y P-gp⁺. La D.O. de P-gp con respecto a la D.O. de GAPDH se expresa como porcentaje de la relación obtenida en las células P-gp⁺. * distinto de P-gp⁺ ($p < 0,05$; $n = 3$).

3.2. Acumulación de BZL en células PXR⁺ y células PXR⁻

Al repetir el experimento detallado en el punto 2 de la presente sección empleando células P-gp⁺ y P-gp⁻ se observó una acumulación significativamente mayor de BZL en células P-gp⁻ que en células P-gp⁺ (115 ± 2 vs $100 \pm 3\%$) confirmando la participación de P-gp en el transporte de BZL (Fig. 45).

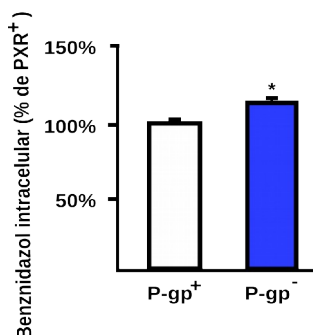


Fig. 45. BZL retenido intracelularmente luego de la incubación con BZL ($100 \mu\text{M}$, 2 h) en células P-gp⁺ y células P-gp⁻. * distinto de P-gp⁺ ($p < 0,05$, $n = 3$).

4. Acumulación de BZL en células pretratadas con BZL

Teniendo en cuenta que P-gp participa en el transporte de BZL y que el pretratamiento con BZL induce la expresión de P-gp, es esperable que el pretratamiento con BZL modifique su propia concentración intracelular. Para corroborar esta hipótesis se repitió el experimento de acumulación de BZL ($100 \mu\text{M}$, 2 h) en células pretratadas con BZL (con inducción de P-gp) y en células controles (no tratadas). Se observó una

acumulación significativamente menor de BZL en las células que fueron pretratadas por 48 h con el fármaco respecto de aquellas células controles que fueron expuestas al vehículo durante 48 h (73 ± 15 vs $100 \pm 2\%$). El efecto desaparece ante el agregado de VER durante la incubación de 2 h, donde la acumulación en células controles y pretratadas con BZL no difiere estadísticamente (120 ± 4 y $115 \pm 5\%$ respectivamente, Fig. 46).

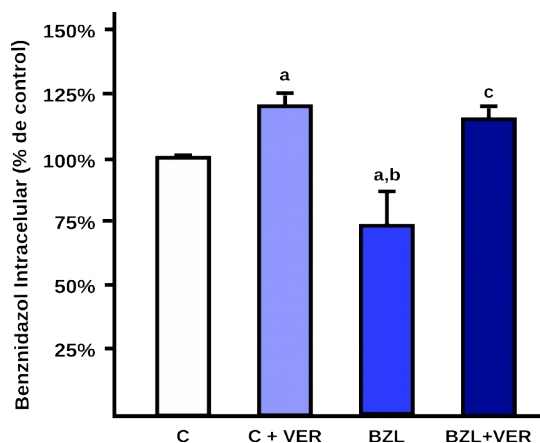


Fig. 46. BZL retenido intracelularmente luego de la incubación con BZL ($100 \mu\text{M}$, 2 h) en células controles y pretratadas con BZL ($200 \mu\text{M}$, 48 h). La acumulación se expresa como porcentaje de la acumulación en las células controles (C). a: distinto de C, b: distinto de C + VER, c: distinto de BZL ($p < 0,05$; $n = 3$).

1.1. Efecto del tratamiento con BZL sobre la expresión y actividad de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas

La expresión y la actividad de los sistemas de biotransformación y transportadores de drogas suelen ser reguladas por endo- y xenobióticos. Entre los xenobióticos se encuentran tóxicos ambientales, compuestos de la dieta y, fundamentalmente, fármacos. Si bien existen estudios que vinculan al tratamiento con compuestos antiparasitarios con una inducción en la expresión de proteínas de la familia del citocromo P450 y transportadores de drogas [200,201], se dispone de escasa información acerca de los efectos del BZL sobre tales sistemas.

En el presente Trabajo de Tesis, se demostró un efecto inductor de BZL sobre la expresión (y eventualmente la actividad) de distintos sistemas de biotransformación y transportadores de drogas en la línea celular HepG2. La misma es utilizada como una aproximación experimental del hepatocito humano [208,209].

En primer lugar, se evaluó el efecto del tratamiento con distintas concentraciones de BZL sobre la expresión de tres proteínas transportadoras de localización canalicular (P-gp, MRP2 y BCRP) y una proteína transportadora de localización basolateral (MRP3). Los resultados mostraron una inducción significativa de P-gp y MRP2 en lisados totales de células HepG2 tratadas con 200 μM de BZL y mayor aún cuando la concentración empleada era de 1000 μM , sugiriendo la presencia de un mecanismo dependiente de la concentración. No se observaron cambios en BCRP ni MRP3. Dado que la concentración de 1000 μM no se alcanza en condiciones farmacológicas, se decidió emplear la concentración de 200 μM para el resto de los estudios.

Dado que la exposición a fármacos o las condiciones de cultivo pueden modificar la localización de los transportadores [85,86], la observación de una inducción en lisados, si bien sirve de aproximación, no garantiza que el transportador esté ubicado donde normalmente se expresa (situación que condiciona su actividad). En el presente estudio, se verificó que la inducción observada para P-gp y MRP2 en lisados totales se reproduce también al llevar a cabo los análisis a nivel de la membrana plasmática de las células HepG2. Si bien la técnica de fraccionamiento empleada no permite discriminar entre membranas canaliculares (apicales) y membranas basolaterales (sinusoidales), la localización de ambas proteínas en hepatocitos es exclusivamente apical [27,50]. Por lo tanto, es altamente probable que la sobreexpresión de ambos transportadores, producto del tratamiento con BZL, esté teniendo lugar a nivel de la membrana canalicular. Esto

sugeriría que el efecto inductor de BZL puede tener una consecuencia en la actividad de ambos transportadores. Para verificarlo, se emplearon ensayos específicos para la cuantificación de la actividad de P-gp y MRP2.

En el caso de P-gp, se empleó R123 como sustrato modelo. Al incubar las células en presencia del sustrato se produce una difusión pasiva del mismo desde el medio de cultivo a través de la bicapa lipídica hacia el interior celular desde donde, también por difusión pasiva, puede volver al medio de cultivo. Adicionalmente, P-gp funciona como un mecanismo adicional de transporte hacia el exterior celular que permite mantener concentraciones inferiores en el interior celular a expensas de un gasto de energía. En el presente Trabajo de Tesis se observó una menor acumulación intracelular de R123 en células tratadas con BZL (200 μ M, 48 h) que en células controles. Teniendo en cuenta que el proceso difusivo no debería ser afectado por el tratamiento, la diferencia en la acumulación se debería a un mayor transporte activo. La participación de P-gp en el mismo se verificó al observarse una acumulación significativamente mayor luego de coincubar las células con VER (100 μ M, inhibidor de P-gp) [222]. Sería de esperar, de ser el transporte vía P-gp el único proceso que media el eflujo no difusivo de R123, que el agregado de VER, y en consecuencia la anulación de la función de P-gp, iguale la acumulación intracelular en células controles y tratadas con BZL. Sin embargo, los resultados muestran, en presencia de VER, una acumulación leve pero significativamente menor en las células tratadas con BZL (grupo BZL + VER) respecto de las células controles en presencia de VER (grupo C + VER). Esto indicaría la presencia de un proceso que favorece la menor acumulación de R123 que es estimulado por BZL y no es inhibible por VER. Además del transporte vía P-gp, se conoce que la actividad de BCRP es responsable, en parte, de la secreción activa de R123 [234] no siendo inhibible por VER [222]. No obstante, dado que BZL no afecta la expresión de BCRP, sería improbable que este transportador sea el responsable de la diferencia observada. Se ha descrito, también, la participación de transportadores OATP y OCT en la captación de R123 [235,236]. La expresión de algunas isoformas de las mismas ha sido demostrada en células HepG2 [237]. En las condiciones del experimento, las células siempre están expuestas a una concentración de R123 mayor que la concentración micelar crítica [235]. De esta manera, se favorecería el fenómeno pasivo por sobre la difusión facilitada. Sin embargo, no puede descartarse totalmente un efecto de BZL sobre la captación de R123. Por otro lado, se ha descrito la acumulación de R123 en mitocondrias y la afectación de su fluorescencia por el potencial de membrana mitocondrial [238]. Tampoco puede

descartarse una acumulación mitocondrial diferencial en células controles y tratadas con BZL. Por último, se ha descrito que R123 puede sufrir cierto grado de metabolización a nivel intracelular para formar rodamina 110. Si bien su espectro de absorción se encuentra desplazado y su rendimiento cuántico es menor respecto del de la R123, la metabolización también podría explicar la diferencia que se observa entre células controles y tratadas con BZL cuando ambos grupos se incuban en presencia de VER.

En el caso de MRP2, se analizó la actividad determinando el eflujo del DNP-SG. Los resultados muestran una secreción significativamente mayor en células tratadas con BZL respecto de las células controles. Dado que el DNP-SG, en las condiciones del ensayo, se forma de manera espontánea a partir de CDNB [223], el efecto no sería atribuible a una mayor actividad de GST. De la misma manera, dado que la cantidad intracelular de glutathione reducido no es afectada por el tratamiento, tampoco sería este un factor que determina la diferencia observada en el tratamiento con BZL. Por el contrario, la reversión del efecto ante el agregado de PRO (inhibidor de las MRPs, [225]), indicaría la participación de un transportador tipo MRP en el fenómeno observado. Las células HepG2 expresan niveles considerables de MRP2 y MRP3, siendo el primero de ellos el que muestra mayor afinidad por los conjugados de glutathione [50]. Dado que, por un lado, la expresión de MRP3 no se modifica en el tratamiento con BZL, y que por otro lado, MRP3 transporta preferentemente conjugados de ácido glucurónico [71], su participación en la secreción de DNP-SG no sería importante y no variaría entre células controles y tratadas con BZL. Por otro lado, la expresión de MRP1, que también transporta conjugados de glutathione, en células HepG2 es muy baja [149]. De la misma manera, existen estudios que demuestran una expresión baja de MRP4 en células HepG2 [150] y, además, su rol en el transporte de DNP-SG aún es controversial [239]. Por lo tanto, la secreción de DNP-SG observada y su aumento observado en células tratadas con BZL serían atribuibles, en gran medida, a MRP2 y a su inducción por BZL respectivamente.

El presente Trabajo de Tesis representa el primer estudio que demuestra un rol inductor de BZL sobre P-gp y MRP2 en un sistema humano. Paralelamente, en otro Trabajo del grupo, se demostró un rol inductor de BZL *in vivo* en hígado de rata que se correlaciona con una mayor excreción de sustratos modelos de cada transportador (Perdomo y col., enviado a publicar). Por otro lado, en estudios clínicos, se observó que sujetos con inducción de P-gp o MRP2 por RIF muestran menor AUC y/o mayor excreción de fármacos coadministrados sustratos de los mencionados transportadores [53,168,169]. De ser BZL capaz de evocar una respuesta similar a la de RIF, se podrían esperar efectos

sobre la depuración de otros fármacos coadministrados sustratos de P-gp y/o MRP2, y por ende, cambios en la respuesta farmacológica y/o toxicológica.

En lo que respecta a la expresión proteica de sistemas de biotransformación, se observó una inducción en CYP3A4 y GST π luego del tratamiento con BZL (200 μ M). La actividad de CYP3A4 se determinó empleando un ensayo específico para esa isoforma en particular, que independizaría los resultados de otras isoformas de menor importancia farmacológica. Los resultados mostraron una inhibición significativa en la actividad de la enzima en las células tratadas con BZL respecto de las células controles. De esta manera, los resultados se encuentran en concordancia con lo descrito décadas atrás por Masana y col. [205] que mostraron una inhibición por BZL de las actividades aminopirina- y etilmorfina N-demetilasa. Ambas actividades son indicadoras de la actividad de CYP3A4 [240,241]. Teniendo en cuenta que el CYP3A4 es el responsable del metabolismo de más del 50% de las drogas empleadas en la práctica clínica [12], la inhibición podría dar lugar a potenciales interacciones droga-droga. De la misma manera que se observó, por ejemplo, una menor depuración de midazolam ante la coadministración con inhibidores de CYP3A4 como voriconazol y ritonavir [176], lo mismo podría llegar a ocurrir en el caso de que el BZL sea administrado con sustratos del CYP3A4. La interacción sería aún de mayor gravedad en el caso de sujetos que ya expresan bajos niveles de CYP3A4 debido a factores etarios, étnicos y/o nutricionales [10,11].

En el caso de la actividad de GST, el ensayo empleado se basa en la conjugación del CDNB, la cual es catalizada por distintas isoformas de la GST [228]. A nivel de las GSTs de origen humano, la actividad con respecto al CDNB es mayor en sentido GST μ > GST π > GST α [14]. Dado que no se observan diferencias en la expresión de GST α ni de GST μ , el incremento medido en la actividad se debería al aumento en la expresión de GST π . La expresión de GST π en hepatocitos normales de rata es indetectable. No obstante, se ha descrito su inducibilidad luego de la exposición a estímulos químicos y en modelos de preneoplasia [242,243]. En hígado humano, GSTP1 es la única isoforma de GST π presente, siendo los ductos biliares el mayor sitio de expresión constitutiva. GST se ha visto implicada en la conjugación de especies electrófilas potencialmente perjudiciales para la célula [14]. La inducción de GST por BZL podría servir para contrarrestar potenciales efectos oxidativos desencadenados por el fármaco, y por otros fármacos coadministrados [181]. Al respecto, se ha observado, que la transfección de la línea celular hepática HEp2A con un vector de expresión de GSTP1 aumenta la resistencia de

las mismas a doxorubicina [244], por lo que no podrían descartarse interacciones entre BZL y fármacos coadministrados que sean sustratos de, o cuyas propiedades sean modificadas por GST π . Las consecuencias podrían implicar la inactivación del fármaco o de sus metabolitos y una mayor excreción del mismo al estar favorecida su conjugación.

Teniendo en cuenta que existe una función coordinada fundamentalmente entre GST y MRP2 en la que MRP2 transporta los conjugados de glutation producto de la actividad de GST, el efecto inductor de BZL estaría teniendo lugar a dos niveles de la vía de excreción. Es decir, se estaría generando una mayor cantidad de sustrato de MRP2 debido a una mayor actividad de GST, y éste se estaría transportando con mayor eficiencia debido a la mayor actividad de MRP2. Esto aporta más evidencia a la existencia de un mecanismo de regulación coordinada para ambas proteínas, la que también podría darse en el caso de CYP3A4 y P-gp [8]. A fin de responder eficientemente a cambios en los niveles de xenobióticos del organismo, el mecanismo regulador debería censar cambios en las concentraciones de los mismos y responder modificando la expresión de los sistemas de biotransformación y transportadores con el fin de eliminar el xenobiótico.

1.2. Participación de PXR en el efecto de BZL sobre sistemas de biotransformación y transportadores de drogas

En el presente Trabajo de Tesis, se demostró la inducción de CYP3A4, GST π , P-gp y MRP2 a nivel de proteína por BZL (200 μ M). Mediante PCR cuantitativa a tiempo real se demostró, además, una inducción en los niveles de los ARN mensajeros que codifican las cuatro proteínas. Por consiguiente, podría postularse un mecanismo de regulación a nivel transcripcional o postranscripcional. Es decir, BZL estaría desencadenando un proceso que culmina en un aumento en la velocidad de transcripción de los genes blanco, o bien, de ser un mecanismo postranscripcional, estaría teniendo lugar un aumento en la estabilidad del ARNm de los genes blanco en forma dependiente de BZL.

Si bien se han observado casos de regulación postranscripcional de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas [74,76,77], se trata de un mecanismo poco frecuente. Además, aún no se conoce un mecanismo de regulación postranscripcional que permita responder a un gran número de estímulos farmacológicos y toxicológicos como lo es el mecanismo en el que participa PXR. Teniendo en cuenta las características estructurales del BZL (hidrofobicidad), un mecanismo dependiente de receptores nucleares sería el más probable para mediar los efectos sobre los sistemas estudiados.

Dentro de los receptores nucleares, PXR sería un buen candidato, lo cual considerando su modo de acción exclusivamente a nivel transcripcional [92], permitiría descartar la presencia de mecanismos postranscripcionales.

En hígado normal, se ha observado una elevada expresión constitutiva de PXR. No obstante, la expresión de sistemas de biotransformación, proteínas transportadoras y factores de transcripción puede variar entre una célula normal del organismo, una línea celular e incluso entre distintos clones de la misma línea celular [210,245-248]. En el caso particular de PXR, Kauffmann y col. [149] muestran expresión del receptor nuclear en dos clones distintos de HepG2, siendo suficiente para observar inducción de un gen blanco como MRP2 luego del tratamiento con el agonista RIF. Otros autores, por su parte, postulan que los niveles de expresión basales en células HepG2 serían bajos para asegurar una función de detoxificación adecuada [249]. Las discrepancias pueden surgir tanto de los niveles de expresión de PXR, como de la expresión de coactivadores y/o correpresores. Para corroborar la validez de nuestro modelo para estudiar un mecanismo de regulación vía PXR, se evaluó la expresión del mismo, como así también la de RXR α cuya heterodimerización con PXR es fundamental para la función de este receptor nuclear [90]. Además se verificó la expresión del factor de transcripción p300, el cual exhibe actividad decompactadora de la cromatina y participaría en la cascada de señalización luego de la activación de PXR [116]. Tanto para PXR, como para RXR α y p300 se observó una expresión significativa que habilitó la realización de estudios posteriores. No obstante, si bien la expresión de PXR y los cofactores analizados representa un punto de partida, la función del receptor nuclear es dependiente de un concierto de coactivadores, correpresores y factores generales de la transcripción que también puede verse alterada en el modelo, dificultando de esta manera el estudio de la regulación a través de PXR [92].

La funcionalidad de un receptor nuclear puede probarse de distintas maneras, por ejemplo, mediante la activación de un gen reportero bajo el control de uno o más elementos de respuesta a ese receptor nuclear [162]. En el caso de PXR, su elevada promiscuidad [91-93] implicaría que podría activarse por diversos compuestos endógenos, como así también por compuestos presentes en el medio de cultivo o en el suero fetal bovino que se utiliza como suplemento del mismo, aún en ausencia de los activadores de PXR caracterizados [8,92]. De esta manera, empleando un medio de incubación constante durante el experimento, la sobreexpresión del receptor nuclear sería suficiente

para aumentar la cantidad de PXR activado y de esta manera la transcripción de genes blanco. Para corroborar la hipótesis, se transfectaron las células con el plásmido pSG5-hPXR a fin de provocar una sobreexpresión del receptor nuclear. Al analizar la expresión de P-gp, MRP2, MRP3 y BCRP como genes blanco de PXR [108,143,153,156,160,250], se observó un aumento en la expresión proteica en las células transfectadas con el pSG5-hPXR (con sobreexpresión de PXR) con respecto a las transfectadas con el vector vacío (pSG5, con expresión basal de PXR). De esta manera, los resultados muestran que las células HepG2 empleadas conservan la capacidad de responder a niveles variables en PXR habilitando, por ende, su empleo para el estudio de la participación de PXR en la regulación de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por BZL.

A fin de confirmar definitivamente la participación de PXR en la inducción de CYP3A4, GST π , P-gp y MRP2 por BZL, una estrategia hubiera sido repetir los ensayos de inducción en células transfectadas con el pSG5-hPXR o bien con el pSG5 y comparar los resultados en función del plásmido empleado. En este caso, una mayor inducción en células con sobreexpresión de PXR respecto de la inducción observada en células transfectadas con el vector vacío (con expresión basal de PXR) hubiera sido indicadora de un rol de PXR en el efecto de BZL. No obstante, podía ocurrir que ante un estímulo como podría ser el agregado de un agonista, los niveles de coactivadores resulten limitantes. En este caso, no se podría transducir eficientemente la señal. Es decir, la sobreexpresión de PXR no alcanzaría para aumentar la magnitud de la inducción de los genes blanco en respuesta a BZL respecto de la inducción observada en condiciones basales de expresión de PXR. Por lo tanto, se decidió hacer uso del silenciamiento de PXR. El mismo consiste en disminuir experimentalmente la expresión de PXR, esperando observar de esta manera una disminución en la inducción luego del tratamiento con BZL. La transfección con un ARN de interferencia específico contra PXR humano (células PXR⁻) resultó en un silenciamiento del 74% en la expresión proteica del receptor nuclear. En estas condiciones, se repitieron los tratamientos con BZL (200 μ M) y se cuantificó nuevamente la expresión de CYP3A4, GST π , P-gp y MRP2, ahora en células PXR⁻ y en células PXR⁺. En las células PXR⁺, se volvió a observar la inducción por BZL previamente descrita; mientras que en las células PXR⁻ no se observaron cambios significativos en las células tratadas con BZL respecto de las células controles. Los resultados confirman la participación de PXR como mediador necesario del efecto de BZL sobre la expresión de los genes blanco analizados.

En el caso particular de CYP3A4, en las células PXR⁻ tratadas con BZL se observa una expresión menor que en las células controles, aunque sin alcanzar significancia estadística. En presencia de PXR, el efecto represor de otras proteínas podría verse enmascarado por la activación mediada por PXR lo que cobra importancia recién ante el silenciamiento de PXR. En el caso de las células PXR⁺, los niveles significativamente menores de PXR dejarían acceso a otros factores de transcripción alternativos cuya modulación y/o activación por BZL no puede ser descartada. Adicionalmente, los sitios de respuesta a PXR se encuentran compartidos con otros receptores nucleares [251], algunos de los cuales podrían afectar negativamente la expresión de CYP3A4. En estudios con otros genes de expresión hepática, se ha descrito, por ejemplo, un rol inhibitorio del receptor X de farnesoides α (FXR α) y de RXR α sobre la expresión génica [252,253]. Teniendo en cuenta que las células HepG2 empleadas expresan también FXR α , no puede descartarse una intervención de estos factores.

El mecanismo propuesto de activación de la expresión génica vía PXR varía con la especie, por ejemplo ratón vs humano. En ambos se postula la unión del agonista al bolsillo hidrofóbico de PXR, lo que gatilla alteraciones conformacionales produciendo un cambio en el balance de proteínas coactivadoras y proteínas correpresoras unidas a PXR. Estas proteínas modifican el estado de compactación de la cromatina mediando el reclutamiento de la maquinaria general de la transcripción [115,119]. A fin de corroborar la activación de PXR por BZL, se efectuó un ensayo en células LS180-PXRRE que expresan en forma estable un gen reportero bajo el control de una secuencia de respuesta a PXR. Tanto en el caso del BZL como en el caso de RIF, empleada como control positivo, se observó una activación del gen reportero en forma concentración-dependiente. Cabe aclarar que, si bien las secuencias reguladoras empleadas son sensibles también a activación por CAR, la línea celular empleada no expresa niveles detectables del mismo [254]. Los resultados confirman, de esta manera, un rol del BZL como activador de PXR. De comparar los valores de EC₅₀ (259 ± 38 y 19 ± 3 μ M para BZL y RIF respectivamente), se desprende, no obstante, que BZL exhibe una actividad intrínseca inferior a la de RIF.

A diferencia del receptor CAR, para el cual se ha observado activación por agonistas independientemente de la unión de los mismos al dominio de unión a ligando [255], el método más frecuente de activación de PXR involucra la unión del agonista. De esta manera existe un gran solapamiento entre lo que son los activadores y los ligandos de PXR pudiendo sugerirse al BZL como potencial ligando. Si bien los ligandos de PXR

exhiben estructuras químicas muy diversas, existen ciertos rasgos comunes. Por ejemplo, la presencia de un grupo aceptor de puente de hidrógeno, y eventualmente de dos grupos, al igual que la presencia de grupos capaces de establecer interacciones hidrofóbicas con el receptor nuclear son características conservadas entre muchos ligandos de PXR [256-258]. El BZL en particular posee grupos como el grupo nitro del nitroimidazol y el carbonilo del grupo amida que podrían actuar como aceptores de puente de hidrógeno. De la misma manera el grupo bencilo del BZL podría participar de interacciones hidrofóbicas, como se describiese para otros compuestos, con el residuo de tirosina en la posición 306. En cualquier caso, si bien a partir de su rol activador y a partir de análisis estructurales se puede sugerir el carácter del BZL como ligando de PXR, la confirmación definitiva se obtendría por estudios de competición o cristalografía [91,108].

Hasta el momento se ha descrito que la regulación de la expresión génica vía PXR cursa mediante la unión del heterodímero PXR/RXR α a secuencias reguladoras caracterizadas por repeticiones directas o repeticiones evertidas presentes en la región 5' de los genes blanco [131,143,153]. Aún no existe consenso acerca de si PXR se encuentra permanentemente unido al ADN o si sólo lo hace luego de su activación por ligando. En el caso de modelos celulares de origen humano, existe mayor cantidad de evidencia en favor de la primera alternativa. Particularmente se ha observado localización predominantemente nuclear del receptor [113,114]. Además Geick y col. [143] observaron en un ensayo de retraso en gel, que ya existe interacción entre el receptor nuclear sintetizado *in vitro* y purificado y distintos fragmentos de la secuencia 5' reguladora del gen de P-gp aún en ausencia de ligando. A partir de estos antecedentes, es posible postular que la regulación de CYP3A4 y P-gp por BZL y vía PXR demostrada en el presente Trabajo de Tesis podría estar teniendo lugar a partir de las secuencias reguladoras descritas para CYP3A4 [131] y para P-gp [143].

En el caso particular de MRP2, aún no se ha descrito la presencia de elementos de respuesta a PXR para el gen de origen humano. Más aún, Kauffmann y col. descartaron la presencia de tales elementos dentro de los 5 kpb proximales en dirección 5' del codón de iniciación de MRP2 [149]. Mediante un análisis *in silico* de la secuencia 5' reguladora distal del gen de MRP2 se encontraron 2 sitios posibles de unión de PXR, uno caracterizado por dos repeticiones evertidas separadas por 3 nucleótidos (ER3) a aproximadamente -10 kpb y otro, caracterizado por dos repeticiones directas imperfectas separadas por 4 nucleótidos (DR4), a aproximadamente -12 kpb (Fig. 47). Si bien

representan los únicos sitios posibles de unión a PXR en los -13 kpb ubicados en dirección 5' del codón de inicio, su participación debería confirmarse por estudios funcionales acoplándolos a un gen reportero y mediante análisis de retraso en gel.

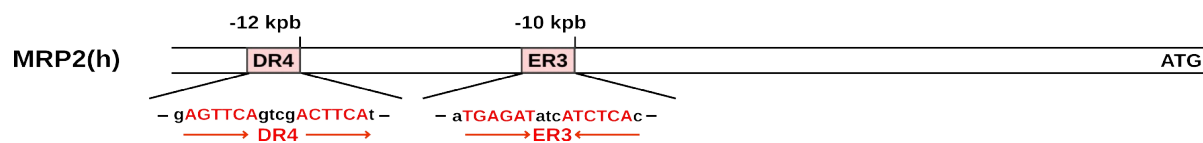


Fig. 47. Elementos de respuesta a PXR hallados por análisis *in silico* de 13 kpb de la secuencia en dirección 5' del codón de inicio del gen de MRP2. DR4: repetición directa separada por 4 nucleótidos; ER3: repetición evertida separada por 3 nucleótidos.

Por lo tanto, se podría postular que en el tratamiento con BZL se produce la unión del mismo a PXR a nivel de elementos de respuesta específicos para PXR. A consecuencia de ello, tiene lugar una liberación de correpresores y la consecuente unión de coactivadores que sirven de nexo entre el ADN y la maquinaria de la transcripción posibilitando de esta manera un aumento en los niveles de ARNm que deriva, acto seguido, en un aumento en los niveles proteicos de CYP3A4, P-gp y MRP2 y, en los dos últimos casos, en el consecuente aumento de la actividad (Fig. 48).

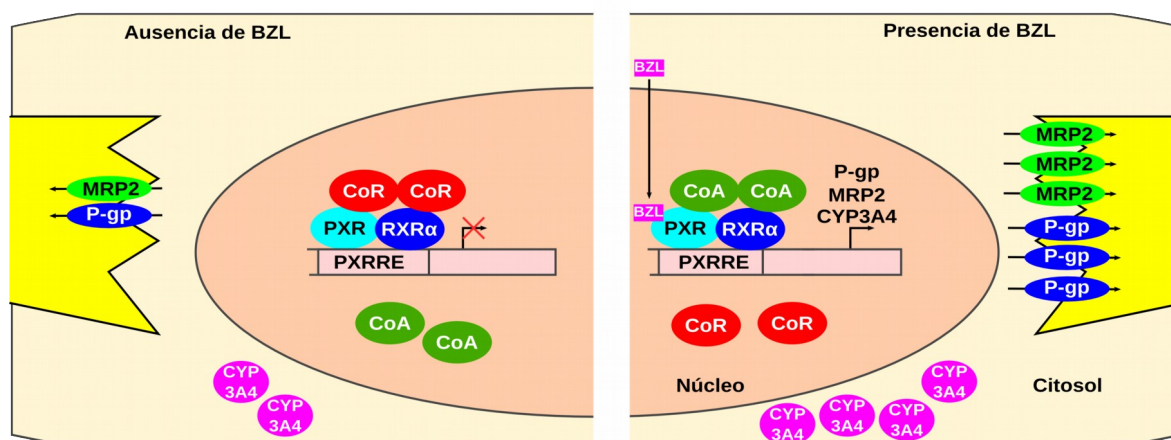


Fig. 48. Mecanismo propuesto de activación de la expresión de CYP3A4, P-gp y MRP2 por BZL. En el panel izquierdo se esquematiza la situación en ausencia de BZL o de cualquier otro ligando de PXR. En el panel de la derecha se esquematiza la situación en presencia de BZL. PXRRE: elemento de respuesta a PXR, consiste en regiones ER6 y DR3 en el caso de CYP3A4, regiones DR3, DR4 y ER6 en P-gp y podría consistir en regiones DR4 y ER3 en el caso de MRP2.

En el caso del gen codificante de GSTP1, única isoforma de GSTπ en humanos, el análisis de los 8 kpb en dirección 5' del codón de inicio no mostró sitios posibles de respuesta a PXR. Por otro lado, sí se demostró la presencia de elementos de respuesta

antioxidante (ARE) y sitios de unión al factor nuclear κ B (NF κ B) [259,260].

Los elementos de respuesta antioxidante (ARE) son secuencias reguladoras ubicadas en los promotores o *enhancers* de diversos genes. Por lo general, ante un estímulo oxidativo o farmacológico, se produce la activación del factor nuclear relacionado al factor eritroide 2 (Nrf2) y su migración al núcleo donde activa la expresión de distintos genes, fundamentalmente antioxidantes, a través de la unión a los sitios ARE [160,261]. En el caso de GST π se ha descrito, por ejemplo, la inducción por curcumina y extractos de *Gingko biloba* en forma dependiente de Nrf2 y de sitios ARE [260,262]. En el presente estudio, podrían postularse dos modelos para explicar la regulación de GST π vía PXR a través de sitios ARE. Por un lado, se ha demostrado la activación de un gen reportero fusionado a secuencias reguladoras del promotor de una isoforma de GST α por ligandos de PXR. La misma se daba en ausencia de sitios de respuesta a PXR y era dependiente de un sitio ARE, sugiriendo la unión directa de PXR al sitio ARE [263]. No se puede descartar un mecanismo similar para GST π . Por otro lado, se podría postular una interacción entre PXR y Nrf2. Particularmente, se ha visto que existen compuestos capaces de regular la expresión génica en forma dependiente tanto de PXR como de Nrf2 [135,262]. Además, en ratones se han observado cambios en la expresión de PXR y de cofactores del mismo en función de la expresión de Nrf2 [264,265], lo que junto con lo anterior, indicaría la presencia de posibles interacciones Nrf2-PXR. Se ha visto, además, que la expresión de GST π puede variar en función de los niveles de expresión de Nrf2 [266]. Resulta posible, por ende, especular que la activación de PXR por BZL podría aumentar la expresión de Nrf2 y, de esa manera, aumentar la sensibilidad de la célula a los metabolitos electrófilos que se podrían generar en el tratamiento con BZL. Existen trabajos en la bibliografía que describen la activación de Nrf2 por tales compuestos [261]. De esta manera, podría haber una mayor cantidad de Nrf2 unido a los sitios ARE y, por ende, una mayor expresión de GST π .

Por otro lado, el NF κ B es un factor de transcripción que puede mediar tanto la inducción como la represión de la expresión génica [267]. En algunos casos, se ha observado inhibición de enzimas de biotransformación como ser CYP3A4 y una isoforma de GST α asociada a la activación del NF κ B, aunque no siempre se demostró la participación de elementos de respuesta al factor en el promotor de los genes blanco [231,268]. Además, se sabe que existen interacciones antagónicas entre la función del NF κ B y la de PXR [269]. Los sitios de respuesta a NF κ B en el promotor del gen que codifica GST π podrían mediar una regulación negativa de su expresión. Teniendo en

cuenta que la activación de PXR antagoniza la función del factor nuclear, podría proponerse un modelo en el que la activación de PXR por BZL inhibe una eventual función represora de NFκB sobre GSTπ. De esa manera, la liberación de la represión de la transcripción de GSTπ llevaría a un aumento en sus niveles de ARNm, en consecuencia en los niveles de proteína y finalmente conllevaría un aumento en los niveles de actividad.

Considerando la promiscuidad de PXR también en lo que respecta al gran número de genes blanco [8, 92], podría esperarse que exista también una inducción a nivel de otros genes no abarcados por el presente Trabajo. Al respecto, Araujo y col. [270] describieron un efecto beneficioso del cotratamiento con BZL y ketoconazol sobre la cura de ratones infectados con *T. cruzi*. Considerando que el ketoconazol en ciertas condiciones se comporta como inhibidor de PXR [271] y que por sí solo no produce cura alguna, se podría postular a la inhibición de PXR como mecanismo subyacente a la interacción. De esta manera, la disminución en la expresión y/o atenuación de la inducción de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas por BZL consecuencia de la inhibición de PXR podría ser responsable de una mayor biodisponibilidad de BZL, al ser este sustrato de alguno/s de esto/s sistemas, y por ende, de un mayor efecto terapéutico.

En conclusión, en el presente Trabajo de Tesis se demostró un rol activador de BZL sobre PXR y la mediación de tal receptor nuclear en los efectos del mismo sobre sistemas de biotransformación y excreción de drogas. Teniendo en cuenta que tales efectos pueden ocasionar interacciones farmacológicas, esta caracterización del mecanismo de acción de BZL sobre tales sistemas permitiría diseñar estrategias terapéuticas con vistas a evitar interacciones perjudiciales y así mejorar la eficacia del BZL y/o de drogas coadministradas.

2. Participación de transportadores de eflujo en la secreción de BZL y efecto del pretratamiento con BZL

Hasta el momento, se desconoce/n el/los transportador/es de membrana involucrados en el eflujo del BZL hacia el exterior celular. Para determinarlo, se emplearon distintas condiciones de inhibición y silenciamiento de transportadores. Previamente, se estudió la presencia o ausencia de procesos de metabolización en las condiciones y

tiempos del experimento. Se espera que un cambio en la estructura química del BZL produzca un corrimiento en el cromatograma o bien un cambio en el espectro de absorción [272] resultando en una disminución del área del pico correspondiente al BZL sin modificar. Dado que no se observaron cambios en el balance de masa de BZL sin modificar con el transcurso del ensayo, se podría concluir que la biotransformación del mismo, en las condiciones de incubación y duración del experimento, sería despreciable. De esta manera, se verifica además que una modificación en la cantidad de BZL intracelular se debería exclusivamente a una modificación en el transporte del mismo y no al proceso de biotransformación. Adicionalmente, del mismo ensayo para detectar metabolización, se desprende también la presencia de dos fenómenos de transporte distintos. Por un lado, un fenómeno de ingreso rápido a la célula y, por otro lado, un fenómeno de eflujo que se establece con el tiempo. Específicamente, el ingreso *quasi*-inmediato del BZL, que se observa en forma de una cantidad detectable de BZL a tiempo 0 (Fig. 42, panel izquierda), es indicador de un proceso pasivo rápido. Si bien, no se conoce la CMC del BZL, el proceso se encontraría facilitado de encontrarse la concentración empleada (100 μM) por encima de la misma. Por otro lado, la disminución significativa de la cantidad de BZL intracelular luego de las dos horas respecto del tiempo inicial (Fig. 42, panel derecha), avala la presencia de un mecanismo de transporte que le confiere a la membrana celular una función de barrera para el influjo del BZL.

En una primera aproximación para determinar el/los transportadores involucrados en el eflujo de BZL, se evaluó el efecto de la coincubación con PRO, inhibidor de las MRPs, o con VER, inhibidor de P-gp. No se observaron cambios en las células coincubadas con PRO, lo que permite descartar la participación de transportadores de la familia de las MRP en el proceso. En concordancia con esto, las MRP transportan por lo general compuestos conjugados [22], los que no se formarían de manera cuantitativamente significativa en las condiciones experimentales.

Por otro lado, la coincubación con VER, inhibidor de P-gp, resultó en un aumento de la cantidad de BZL acumulada intracelularmente, lo que sugeriría la participación de este transportador, al menos parcialmente, en el eflujo de BZL. De todas formas, a fin de obtener una confirmación definitiva de la participación de P-gp, se procedió al silenciamiento de su expresión mediante un ARN de interferencia de forma de obtener células P-gp⁻ (con expresión de P-gp disminuida) y células P-gp⁺ (sin silenciar, con expresión basal de P-gp). Las células P-gp⁻ exhibieron una acumulación significativamente mayor de BZL con respecto a las células P-gp⁺. De esta manera, se

podría proponer un modelo en el cual el BZL ingresa a la célula por difusión pasiva y es secretado al exterior celular por P-gp. Si bien al llegar al estado estacionario existe un flujo difusivo también hacia el exterior, éste tiende solamente a equilibrar las concentraciones del interior con las del exterior celular, es decir no es responsable de un flujo neto hacia el exterior. Adicionalmente, al no existir metabolización significativa, la menor concentración observada intracelularmente se debería exclusivamente al transporte activo, del cual P-gp es un participante clave. Los resultados se encuentran en concordancia con el rol de P-gp como transportador de compuestos anfipáticos con grupos que puedan tomar carga positiva entre los que se encuentran otros nitroimidazoles [22,273].

Por otro lado, se describió un aumento de la expresión de P-gp en hígado de ratas en función de la edad de las mismas [274]. En otro estudio, se observó que las concentraciones plasmáticas alcanzadas luego de una dosis intragástrica de BZL eran menores en el caso de las ratas de mayor edad que en las más jóvenes [275]. Dado que, como se describe en el presente Trabajo, BZL es transportado por P-gp, la mayor expresión de P-gp en las primeras podría ser responsable de una menor absorción y/o mayor excreción de BZL y, por ende, de la menor concentración plasmática observada. Adicionalmente, Workman y col. [195] describieron parámetros farmacocinéticos del tratamiento con BZL en perros. Trabajando con perros cruce de la raza *Collie* y con perros de la raza *Beagle* a los que se le administró BZL en forma oral, se observó que el AUC en la raza *Collie* a los que se le administró una dosis de 25 mg/kg de BZL era similar al AUC en los *Beagle* que recibieron una dosis de 50 mg/kg de BZL. Es decir, en los *Collie*, se requiere la mitad de la dosis que recibieron los *Beagle* con el fin de observar el mismo valor de AUC que los mismos. La raza *Collie* se caracteriza por mutaciones en P-gp que conllevan una menor expresión de la misma, siendo esto responsable, por ejemplo, de una marcada neurotoxicidad en el tratamiento antiparasitario con ivermectina [276]. El transporte de BZL por P-gp, descrito en el presente Trabajo, sumado a la menor expresión de P-gp en la raza *Collie* podría ser una causa de la mayor biodisponibilidad de BZL observada por Workman y col. [195] en tales animales.

La caracterización del BZL como sustrato de P-gp posee distintas implicancias farmacológicas y toxicológicas. Teniendo en cuenta que el BZL suele coadministrarse con otras drogas [277,278], puede darse una competición entre el mismo y otros fármacos coadministrados que sean sustratos del transportador a nivel del eflujo de los mismos. Por

ejemplo, se ha observado que el AUC del BZL tiende a aumentar al ser éste coadministrado con itraconazol, inhibidor de P-gp y de CYP3A4, observándose también un mayor $t_{1/2}$ de BZL [279,280]. En tal caso, no puede descartarse que parte del efecto se deba a una menor eliminación de BZL debido a la inhibición de P-gp por itraconazol, adicional o alternativamente la inhibición de CYP3A4 también podría estar involucrada. Los autores también describen una menor $C_{m\acute{a}x}$ de BZL en la coadministración con itraconazol, sin embargo atribuyen tal observación a modificaciones en la disolución del BZL a nivel del tracto digestivo [280]. En conclusión, los resultados del presente Trabajo de Tesis *in vitro* empleando células HepG2 y los indicios *in vivo* recientemente mencionados sugieren fuertemente que el BZL podría estar siendo transportado por P-gp cuando es empleado en la quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Las implicancias de estos resultados serían de especial importancia en el caso de pacientes polimedicados. En los mismos, BZL podría competir con otras drogas a nivel de la excreción biliar vía P-gp disminuyendo la depuración y aumentando la toxicidad de las mismas. Alternativamente, en los casos en que es coadministrado con inductores de P-gp, la biodisponibilidad del BZL podría verse reducida, y por ende también, su efecto terapéutico.

La concentración intracelular de BZL puede verse afectada por cambios en la actividad de su transportador (P-gp) de la misma manera que se demostró previamente para el sustrato modelo R123. Esto puede ocurrir aún en el tratamiento con BZL, cuando él mismo actúa como inductor. A fin de corroborarlo, se determinó la acumulación de BZL en células pretratadas por BZL en condiciones en las que previamente se observó inducción del transportador (200 μ M, 48 h). Se observó una acumulación significativamente menor de BZL en las células pretratadas, con inducción de P-gp, respecto de las células controles. El efecto revirtió ante el agregado de VER, inhibidor de P-gp, confirmando la participación de P-gp en el fenómeno observado. De esta manera el BZL estaría aumentando no sólo la depuración de otros fármacos coadministrados, sino también su propia depuración. Los resultados obtenidos permitirían explicar distintos hallazgos previos de otros grupos de investigación. Por ejemplo, Raaflaub [194] administró BZL a sujetos sanos dosificado en dos tomas diarias. Sus resultados describen una disminución de la $C_{m\acute{a}x}$ de BZL después de la administración de la dosis de la mañana con el transcurso del tratamiento, lo que bien podría atribuirse a una inducción de la depuración del BZL por el propio BZL, que podría deberse a una inducción de P-gp como

demuestra el presente Trabajo de Tesis en células HepG2.

En otro estudio, se determinó que los efectos colaterales del BZL son más frecuentes durante los primeros 30 días de tratamiento [197]. Teniendo en cuenta que algunos de ellos pueden ser dependientes de la concentración, la desaparición de los mismos más allá de los 30 días de tratamiento podría estar relacionada con el aumento de la depuración ocasionada por el tratamiento con BZL.

La resistencia de *T. cruzi* a drogas es considerada un gran problema en el tratamiento de la enfermedad de Chagas no sólo debido a la existencia de cepas naturalmente al BZL [177] sino también debido a la habilidad de esta droga de inducir resistencia *in vitro* en el parásito. Se describió la expresión de dos proteínas similares a P-gp. La primera en ser descubierta se denominó TcP-gp2 y presenta una alta homología con la P-gp de origen humano. La expresión de su mensajero se describió en amastigotes y epimastigotes de la cepa, no así en tripomastigotes [281]. La segunda proteína en ser descubierta se denominó TcP-gp1, la misma exhibe un menor peso molecular que la P-gp humana debido a la ausencia de 2 de los 6 segmentos transmembrana típicos del segundo dominio de 6 segmentos presente en P-gp y las MRPs. Además, TcP-gp1 estaría más relacionada con proteínas de la familia MRP humana que con P-gp propiamente dicha. Los autores estudian la expresión únicamente en epimastigotes, sin hacer referencia a la expresión en las otras fases del ciclo del parásito [282]. Posteriormente, trabajando con la misma cepa, se describió la adquisición de resistencia a BZL en epimastigotes, que se mantenía con el transcurso de las divisiones como así también en tripomastigotes metacíclicos y amastigotes intracelulares. La resistencia fue asociada a una mayor expresión de TcP-gp1 y de TcP-gp2, a un mayor eflujo de R123 y revertía mediante el tratamiento con VER o ciclosporina A, ambos inhibidores de P-gp [283]. El mecanismo de inducción aún no ha sido estudiado. Sin embargo, la asociación entre las proteínas similares a P-gp del parásito y la resistencia a BZL sigue siendo contradictoria. Por ejemplo, Murta y col. [284] trabajando con 27 cepas del parásito describieron la ausencia de correlación entre la resistencia a BZL o a nifurtimox y la inducción o amplificación génica de los TcP-gp1 y TcP-gp2. En cualquier caso, si bien existen proteínas transportadoras de características similares entre el parásito y las células humanas, las vías de regulación suelen ser distintas. Por lo tanto, si bien puede llegar a existir una inducción de la resistencia del parásito a BZL en respuesta a la exposición al fármaco, los resultados de este Trabajo de Tesis, sugieren como mecanismo adicional de

fracaso en la terapéutica a la disminución de la concentración intracelular de BZL en la célula huésped.

En síntesis, los resultados presentados en este Trabajo de Tesis muestran una participación de P-gp en la disminución de la concentración intracelular de BZL por el propio tratamiento en células HepG2, lo que eventualmente podría llegar a trasladarse a otros tipos celulares del hospedador. Adicionalmente, la inducción de P-gp por otras drogas coadministradas distintas de BZL, también podría aumentar la depuración del BZL reduciendo, por ende, su biodisponibilidad y efecto terapéutico. Esto permitiría eventualmente diseñar estrategias farmacológicas que posibiliten la compensación de tales efecto con vistas a mejorar la eficacia del tratamiento.

1.1. El tratamiento con BZL aumenta la expresión y actividad de GST π , P-gp y MRP2 en células HepG2. Adicionalmente, se observó una inducción en la expresión de CYP3A4, la cual, no obstante, se encuentra asociada a una inhibición de la actividad enzimática, probablemente por unión covalente de metabolitos reactivos del propio BZL. Los cambios en la expresión y actividad de los sistemas anteriores pueden dar lugar a modificación en la biotransformación y excreción de drogas coadministradas. Teniendo en cuenta que el BZL puede administrarse en pacientes polimedicados, lo anterior podría llevar a la aparición o incluso el agravamiento de interacciones droga-droga.

1.2. PXR es un mediador clave de los fenómenos de inducción descritos anteriormente al ser su participación necesaria para la observación del efecto. El mecanismo de transducción de la señal propuesto se inicia con la activación de PXR por BZL, lo que sugeriría que BZL se estaría comportando como ligando del mismo. Seguidamente, tiene lugar la disociación de factores de transcripción correpresores y la unión de factores coactivadores que posibilitan el acoplamiento de la maquinaria de la transcripción a los genes blanco. La unión de los mismos ocurriría, en el caso de P-gp, CYP3A4 y MRP2, a nivel de elementos de respuesta ubicados en el promotor y/o en *enhancers* distales de la secuencia 5' de los genes blanco. En el caso de GST π , no se encontraron elementos de respuesta a PXR, por lo que la respuesta podría estar cursando a través de otros factores de transcripción como ser Nrf2, NF κ B o bien a través de la unión de PXR a otros sitios como ser los sitios ARE. Lo anterior permitiría diseñar estrategias terapéuticas focalizadas en contrarrestar potenciales efectos perjudiciales de BZL y además permitiría prever potenciales efectos sobre otros genes blanco de PXR.

2. P-gp es responsable, al menos en parte, del transporte de BZL. En concordancia con lo anterior, la inducción de P-gp por el tratamiento con BZL induce la depuración del propio BZL, lo que podría ser responsable de la disminución en la $C_{m\acute{a}x}$ observada con el transcurso del tratamiento. En respuesta a esto, se podrían establecer esquemas de combinación de drogas destinados a mejorar la eficacia del BZL, como así también de drogas coadministradas.

El efecto de un fármaco depende de su concentración en su sitio de acción. La misma se encuentra definida por la absorción, la distribución y la depuración del mismo. En el organismo pueden definirse órganos de relevancia farmacológica que cumplen una función importante en los procesos mencionados anteriormente. El hígado y el riñón cumplen un rol clave en la depuración de fármacos. El intestino participa además en la absorción de compuestos administrados en forma oral. Tanto en la limitación de la absorción a nivel intestinal como en la excreción en todos los tejidos mencionados intervienen sistemas de biotransformación y transportadores de drogas, proteínas que modifican químicamente los fármacos llevando en la mayoría de los casos a su inactivación y facilitando su posterior transporte fuera de la célula. Los sistemas de biotransformación pueden dividirse en sistemas de fase I y sistemas de fase II. Los sistemas de fase I incluyen a las proteínas de la familia del citocromo P450 y catalizan diversas reacciones de oxidoreducción. El miembro más representativo es el CYP3A4, responsable del metabolismo de aproximadamente el 50% de las drogas de aplicación clínica. Los sistemas de fase II catalizan reacciones de conjugación de los fármacos o los productos de las reacciones de fase I con compuestos como glutatión (reacciones catalizadas por las glutatión-S-transferasas, GSTs) o ácido glucurónico (reacciones catalizadas por las UDP-glucuronosiltransferasas, UGTs) entre otros. Las proteínas transportadoras suelen ser de carácter multiespecífico. Entre los transportadores de eflujo pueden mencionarse a la P-glicoproteína (P-gp), la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (MRP2) y la proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP) de localización apical en hepatocitos, enterocitos y células de los túbulos renales. La proteína asociada a resistencia a multidrogas 3 (MRP3), por su parte, se localiza en las membranas basolaterales de los mencionados tipos celulares.

La expresión y función de los sistemas anteriores no es constante sino que existe una regulación, por los mismos sustratos y por otras drogas, representando la base molecular de las interacciones droga-droga. La regulación puede cursar a nivel transcripcional (cambios en la síntesis de ARNm), nivel post-transcripcional (cambios en la estabilidad del ARNm o en su procesamiento), nivel traduccional (cambios en la síntesis de proteína) o a nivel post-traduccional (cambios en la actividad de la proteína sin cambios en su expresión). En el caso de la regulación por fármacos, la regulación transcripcional mediada por receptores nucleares suele ser uno de los mecanismos más importantes. El receptor de pregnanos X (PXR) es un receptor nuclear de elevada promiscuidad. El mismo es activado por un gran número de fármacos y otros xenobióticos

y regula la expresión de diversos genes que codifican sistemas de biotransformación y transportadores de drogas.

El Benznidazol (BZL) es el fármaco de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Actualmente se dispone de escasa información acerca de los efectos del BZL sobre los sistemas de biotransformación y transportadores de drogas. Su coadministración con otros compuestos y, por ende, la aparición de interacciones droga-droga no puede ser descartada.

Los objetivos del presente trabajo de tesis fueron: 1) establecer el efecto del tratamiento con BZL sobre la expresión y actividad de sistemas de biotransformación de fase I (CYP3A4), sistemas de biotransformación de fase II (GST y UGT) y proteínas transportadoras de drogas (P-gp, MRP2, BCRP y MRP3); 2) establecer el/los mediadores moleculares de tal efecto, en especial la participación de PXR y determinar el rol del BZL como activador de PXR y 3) estudiar el/los transportadores responsables del eflujo de BZL al exterior celular y cómo el pretratamiento con BZL afecta tal proceso. Los estudios se realizaron en la línea celular HepG2. La misma deriva de un hepatocarcinoma celular humano y conserva diversas propiedades bioquímicas, morfológicas y fisiológicas de los hepatocitos lo que la convierte en un modelo adecuado para estudiar la regulación de proteínas hepáticas humanas.

En primer lugar se realizó un estudio concentración-respuesta (0-1000 μM) de la expresión de los transportadores en respuesta al tratamiento con BZL. Se observó una inducción significativa a nivel proteico (por inmunocuantificación) de P-gp por BZL 200 y 1000 μM (160 ± 27 y $282 \pm 94\%$ respectivamente vs $100 \pm 7\%$). Un patrón similar se observó en la expresión de MRP2 (175 ± 15 y $491 \pm 5\%$ para 200 y 1000 μM de BZL respectivamente vs $100 \pm 14\%$). BCRP y MRP3 no mostraron diferencias significativas a ninguna de las concentraciones estudiadas. La inducción de P-gp y MRP2 se verificó tanto en lisados celulares como en membrana plasmática. Para los estudios posteriores se escogió la concentración de BZL 200 μM por ser la mínima concentración a la que se observa un efecto. A nivel de ARNm (por PCR cuantitativa a tiempo real), se observó también una inducción de P-gp y MRP2 por BZL (200 μM). Concretamente la expresión fue de 332 ± 151 vs $100 \pm 69\%$ en el caso del mensajero de P-gp y 293 ± 137 vs $100 \pm 57\%$ en el caso de MRP2. La inducción observada en la expresión se correlacionó con un aumento en la actividad tanto para P-gp como para MRP2. En el primer caso la actividad

se determinó por acumulación del sustrato modelo Rhodamina 123. Las células tratadas con BZL mostraron una acumulación significativamente menor (85 ± 2 vs $100 \pm 6\%$) que las células controles, lo que indica un mayor eflujo del mismo, y esto una mayor actividad de P-gp. En el caso de MRP2, la actividad se determinó midiendo el eflujo del sustrato dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG) observándose un eflujo significativamente mayor (181 ± 1 vs $100 \pm 7\%$) en las células tratadas que en las células controles.

A nivel de las enzimas de biotransformación, BZL (200 μ M) indujo la expresión proteica de CYP3A4 y GST π (143 ± 1 vs $100 \pm 22\%$ y 175 ± 12 vs $100 \pm 35\%$, respectivamente). La inducción se observó también a nivel del ARNm (150 ± 23 vs $100 \pm 21\%$ y 178 ± 94 vs $100 \pm 11\%$ para CYP3A4 y GST π respectivamente). También se observó una inducción en la actividad de GST, cuantificada a través de la formación de DNP-SG (204 ± 32 vs $100 \pm 7\%$). La actividad de CYP3A4 se determinó por la formación de un derivado luminiscente a partir de un sustrato modelo de la enzima. Se observó una disminución en la actividad (58 ± 6 vs $100 \pm 4\%$) que indica inhibición de la misma por BZL.

A fin de caracterizar el mecanismo de acción del BZL en el modelo celular empleado se verificó por inmunocuantificación la expresión de PXR, el receptor X de retinoides α (RXR α) con el cual heterodimeriza PXR y del coactivador p300, necesario para la función de los mismos. Mediante sobreexpresión de PXR se observó una inducción en la expresión de genes blanco de PXR como ser P-gp, MRP2, MRP3 y BCRP, lo que indicaría funcionalidad de PXR en el modelo y posibilidad de mediación del efecto de BZL por el mismo. Para confirmar tal hipótesis, se procedió al silenciamiento de PXR empleando un ARN de interferencia específico dirigido contra el ARNm del receptor nuclear lográndose un silenciamiento de PXR a nivel de proteína del 74% con respecto a las células transfectadas con un ARN de interferencia no silenciante. En estas condiciones se repitió el tratamiento con BZL y se cuantificó la expresión de las proteínas cuya expresión había resultado previamente inducida (CYP3A4, GST π , P-gp y MRP2). En todos los casos, el silenciamiento de PXR resultó en la ausencia de inducción por BZL confirmando la participación de PXR como mediador del efecto de BZL. A fin de determinar si el mecanismo por el cual PXR media el efecto de BZL consiste en una activación del mismo, se determinó la actividad del mismo en presencia de distintas concentraciones de BZL. Para ello se utilizaron células LS180-PXRRE, derivadas a partir de un adenocarcinoma de colon humano, que expresan en forma estable un gen

reportero sensible a la activación de PXR. Por regresión sigmoidea se obtuvo un valor de concentración efectiva 50 (EC_{50}) de $259 \pm 38 \mu\text{M}$ corroborándose así el rol de BZL como activador de PXR y sugiriendo su rol como ligando del mismo.

A fin de determinar el/los transportadores que mediarían el eflujo de BZL al exterior celular, se corroboró en primer lugar si el BZL sufre metabolización en las condiciones experimentales empleadas. Al no observarse metabolismo significativo, se procedió a realizar los estudios posteriores cuantificando la droga sin modificar (por HPLC). En primer lugar se determinó la acumulación intracelular de BZL luego de 2 h de incubación en presencia de verapamilo (como inhibidor de P-gp) o de probenecid (como inhibidor de las MRPs). Se observó una acumulación significativamente mayor en las células coincubadas con verapamilo respecto de las células controles no expuestas a ningún inhibidor (128 ± 16 vs $100 \pm 3\%$) sugiriendo la dependencia del transporte de BZL, al menos en parte, de P-gp. No se observaron cambios significativos en la acumulación de BZL en las células coincubadas con probenecid (88 ± 8 vs $100 \pm 3\%$) permitiendo descartar la participación de una MRP en el transporte de BZL, al menos en su forma sin modificar. A fin de confirmar la participación de P-gp en el transporte de BZL en células HepG2, se procedió a su silenciamiento mediante transfección con un ARN de interferencia. Se observó una acumulación significativamente mayor de BZL en las células P-gp⁻, transfectadas con un ARN de interferencia específico contra P-gp, que en células P-gp⁺, transfectadas con un ARN de interferencia no silenciante (115 ± 2 vs $100 \pm 3\%$) confirmando la participación de P-gp en el transporte de BZL. Teniendo en cuenta que P-gp participa en el transporte de BZL y que el pretratamiento con BZL induce la expresión de P-gp, es esperable que el pretratamiento con BZL modifique su propia concentración intracelular. A fin de corroborarlo se repitió determinó la acumulación de BZL en condiciones de inducción de P-gp por el fármaco ($200 \mu\text{M}$, 48 h). Se observó una acumulación significativamente menor de BZL en las células que fueron pretratadas con respecto a las células controles expuestas al vehículo (73 ± 15 vs $100 \pm 2\%$). El efecto desaparece ante el agregado de verapamilo (inhibidor de P-gp), donde la acumulación en células controles y pretratadas con BZL no difiere estadísticamente (120 ± 4 y $115 \pm 5\%$ respectivamente) confirmando así la participación de P-gp.

Los resultados del presente trabajo de tesis demuestran un efecto inductor del tratamiento con BZL sobre la expresión de CYP3A4, GST π , P-gp y MRP2. La inducción de la expresión en GST π , P-gp y MRP2 se refleja en un aumento en la actividad de las

proteínas empleando sustratos modelos de cada proteína. La inducción sugeriría un aumento en la depuración de fármacos sustratos de los mismos cuando estos son coadministrados con BZL. Además se confirmó el rol de P-gp en el transporte de BZL, lo que podría también representar la base de interacciones droga-droga en el caso de que el BZL sea administrado en condiciones de inducción de P-gp por otra droga. Simultáneamente, dado su carácter inductor de P-gp, BZL por si solo sería capaz de aumentar su propia depuración.

En el caso de CYP3A4 por el contrario se observa un efecto inhibitorio sobre la actividad. Teniendo en cuenta que el CYP3A4 es responsable del metabolismo de aproximadamente el 50% de los fármacos de empleo en la práctica clínica, de observarse un efecto similar *in vivo*, el tratamiento con BZL podría disminuir la depuración de sustratos coadministrados propiciando la aparición de interacciones droga-droga y efectos potencialmente tóxicos.

Además, se demostró la participación de PXR en la regulación del efecto y se confirmó la activación del receptor nuclear por BZL. Teniendo en cuenta que el mecanismo de activación descrito para PXR implica unión del sustrato al bolsillo hidrofóbico del dominio de unión a ligando, los resultados sugerirían un rol de BZL como ligando del mismo. No obstante, se requeriría la confirmación mediante ensayos de competición. Por otro lado, PXR cumple un rol regulador clave sobre un gran número de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas como así también sobre genes que regulan otras vías metabólicas (ej. síntesis de ácidos biliares) e interacciona con otras vías de transducción de señales (ej. respuesta inflamatoria, ciclo celular). Por lo tanto, no pueden descartarse potenciales interacciones entre BZL y las mencionadas vías de señalización.

1. Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD y Wilkinson GR. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 59: 491-502. (1996).
2. Hebert MF. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 27: 201-214. (1997).
3. Hall SD, Thummel KE, Watkins PB, Lown KS, Benet LZ, Paine MF, Mayo RR, Turgeon DK, Bailey DG, Fontana RJ y Wrighton SA. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab Dispos.* 27: 161-166. (1999).
4. Yokomasu A, Yano I, Sato E, Masuda S, Katsura T e Inui K. Effect of intestinal and hepatic first-pass extraction on the pharmacokinetics of everolimus in rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 23: 469-475. (2008).
5. Dufek MB, Knight BM, Bridges AS y Thakker DR. P-glycoprotein increases portal bioavailability of loperamide in mouse by reducing first-pass intestinal metabolism. *Drug Metab Dispos.* 41: 642-650. (2013).
6. Geneser F. Histología. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. pp 440-451. (1984).
7. Rodriguez Garay EA. Funciones del hígado y de las vías biliares, formación y composición de la bilis y transporte hepático de compuestos endógenos y exógenos. En: Fisiología Humana de Houssay. Editorial El Ateneo, Buenos Aires. pp 208-232. (2000).
8. Köhle C y Bock KW. 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. (2009).
9. Strobel HW, Geng J, Kawashima H y Wang H. Cytochrome P450-dependent biotransformation of drugs and other xenobiotic substrates in neural tissue. *Drug Metab Rev.* 29: 1079-1105. (1997).

10. Cotreau MM, von Moltke LL y Greenblatt DJ. The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. *Clin Pharmacokinet.* 44: 33-60. (2005).
11. Harris RZ, Jang GR y Tsunoda S. Dietary effects on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacokinet.* 42: 1071-1088. (2003).
12. Zhou SF, Xue CC, Yu XW, Li C y Wang G. 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. (2007).
13. Lewis DFV. Guide to Cytochromes P450. Structure and Function. Taylor & Francis, Londres - Nueva York. pp 69-109. (2001).
14. Mulder GJ. Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach. Taylor & Francis, Londres - Bristol. pp 49-350. (1990).
15. Riches Z, Stanley EL, Bloomer JC y Coughtrie MW. Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT "pie". *Drug Metab Dispos.* 37: 2255-2261. (2009).
16. Jancova P, Anzenbacher P y Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 154: 103-116. (2010).
17. Evans WE y Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science.* 286: 487-491. (1999).
18. Catania VA, Sánchez-Pozzi EJ, Luquita MG, Ruiz ML, Villanueva SS, Jones B y Mottino AD. Co-regulation of expression of phase II metabolizing enzymes and multidrug resistance-associated protein 2. *Ann Hepatol.* 3: 11-17. (2004).
19. Kiang TK, Ensom MH y Chang TK. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther.* 106: 97-132. (2005).
20. Coffman BL, Rios GR, King CD y Tephly TR. Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos.* 25: 1-4. (1997).

21. Zhang A, Xing Q, Qin S, Du J, Wang L, Yu L, Li X, Xu L, Xu M, Feng G y He L. Intra-ethnic differences in genetic variants of the UGT-glucuronosyltransferase 1A1 gene in chinese populations. *Pharmacogenomics J.* 7: 333-338. (2007).
22. Klaassen CD y Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev.* 62: 1-96. (2010).
23. Choi MK y Song IS. Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Drug Metab Pharmacokinet.* 23: 243-253. (2008).
24. Hagenbuch B. Drug uptake systems in liver and kidney: a historic perspective. *Clin Pharmacol Ther.* 87: 39-47. (2010).
25. Juliano RL y Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 455: 152-62. (1976).
26. Kruh GD y Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.* 22: 7537-7552. (2003).
27. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I y Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 7735-7738. (1987).
28. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR y Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 695-698. (1989).
29. Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol.* 8: 161-170. (1997).
30. Martin P, Riley R, Back DJ y Owen A. Comparison of the induction profiles for drug disposition proteins by typical nuclear receptor activators in human hepatic and intestinal cells. *Br J Pharmacol.* 153: 805-819. (2008).

31. Drain S, Catherwood MA y Alexander HD. Multidrug resistance in the chronic lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*. 51: 1793-1804. (2010).
32. Tran TP, Kim HG, Choi JH, Na MK y Jeong HG. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance is induced by mollugin in MCF-7/adriamycin cells. *Phytomedicine*. 20: 622-631. (2013).
33. Zhang Y y Wang Q. Sunitinib reverse multidrug resistance in gastric cancer cells by modulating Stat3 and inhibiting P-gp function. *Cell Biochem Biophys*. En prensa. (2013).
34. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, Dorr R, Karanes C, Hynes HE, Doroshow JH, Shurafa M y Appelbaum FR. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*. 98: 3212-3220. (2001).
35. Silva R, Carmo H, Dinis-Oliveira R, Cordeiro-da-Silva A, Lima SC, Carvalho F, Bastos MdeL y Remiao F. In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells. *Arch Toxicol*. 85: 315-326. (2011).
36. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M y Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 3473-3478. (2000).
37. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG y Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*. 70: 189-1999. (2001).
38. Dean M y Allikmets R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr*. 33: 475-479. (2001).

39. Borst P, Zelcer N y van de Wetering K. MRP2 and 3 in health and disease. *Cancer Lett.* 234: 51-61. (2006).
40. Kitamura T, Jansen P, Hardenbrook C, Kamimoto Y, Gatmaitan Z y Arias IM. Defective ATP-dependent bile canalicular transport of organic anions in mutant (TR-) rats with conjugated hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 3557-3561. (1990).
41. Dubin IN y Johnson FB. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore).* 33: 155-197. (1954).
42. Akerboom TP, Narayanaswami V, Kunst M y Sies H. ATP-dependent S-(2,4-dinitrophenyl)glutathione transport in canalicular plasma membrane vesicles from rat liver. *J Biol Chem.* 266: 13147-13152. (1991).
43. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM y Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 258: 1650-1654. (1992).
44. Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T y Keppler D. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemia mutant rats. *J Biol Chem.* 271: 15091-15098. (1996).
45. Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R y Keppler D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 23: 1061-1066. (1996).
46. Keppler D y König J. Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J.* 11: 509-516. (1997).

47. Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dörsam J, Staehler G, Störkel S, Thon WF y Keppler D. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol.* 10: 1159-1169. (1999).
48. Mottino AD, Hoffman T, Jennes L y Vore M. Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 293: 717-723. (2000).
49. Potschka H, Fedrowitz M y Löscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 306: 124-131. (2003).
50. Nies AT y Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch.* 453: 643-659. (2007).
51. Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Bootsma AH, van Gennip AH y Elferink RP. Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis.* 22: 805-811. (2001).
52. Choi YH, Lee YK y Lee MG. Effects of 17 α -ethynylestradiol-induced cholestasis on the pharmacokinetics of doxorubicin in rats: reduced biliary excretion and hepatic metabolism of doxorubicin. *Xenobiotica.* En prensa. (2013).
53. Naesens M, Kuypers DR, Streit F, Armstrong VW, Oellerich M, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Rifampin induces alterations in mycophenolic acid glucuronidation and elimination: implications for drug exposure in renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 80: 509-521. (2006).
54. Niemi M, Arnold KA, Backman JT, Pasanen MK, Gödtel-Ambrust U, Wojnowski L, Zanger UM, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivistö KT y Lang T. Association of genetic polymorphism in ABCC2 with hepatic multidrug resistance-associated protein 2 expression and pravastatin pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics.* 16: 801-808. (2006).

55. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK y Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 15665-15670. (1998).
56. Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M y Bates SE. ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev*. 61: 3-13. (2009).
57. van Herwaarden AE y Schinkel AH. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci*. 27: 10-16. (2006).
58. Vlaming ML, Lagas JS y Schinkel AH. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev*. 61: 14-25. (2009).
59. Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH y Schinkel AH. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst*. 92: 1651-1656. (2000).
60. Mizuno T, Fukudo M, Terada T, Kamba T, Nakamura E, Ogawa O, Inui K y Katsura T. Impact of genetic variation in breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) on sunitinib pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet*. 27: 631-639. (2012).
61. Sparreboom A, Loos WJ, Burger H, Sissung TM, Verweij J, Figg WD, Nooter K y Gelderblom H. Effect of ABCG2 genotype on the oral bioavailability of topotecan. *Cancer Biol Ther*. 4: 650-658. (2005).
62. Merino G, Alvarez AI, Pulido MM, Molina AJ, Schinkel AH y Prieto JG. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab Dispos*. 34: 690-695. (2006).

63. Agarwal S, Hartz AM, Elmquist WF y Bauer B. Breast cancer resistant protein and P-glycoprotein in brain cancer: two gatekeepers team up. *Curr Pharm Des.* 17: 2793-2802. (2011).
64. Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Julin JA, Baas F y Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 57: 3537-3547. (1997).
65. König J, Rost D, Cui Y y Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology.* 29: 1156-1663. (1999).
66. Rost D, Mahner S, Sugiyama Y y Stremmel W. Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282: G720-G726. (2002).
67. Hirohashi T, Suzuki H, Ito K, Ogawa K, Kume K, Shimizu T y Sugiyama Y. Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in eisai hyperbilirubinemic rats. *Mol Pharmacol.* 53: 1068-1075. (1998).
68. Ogawa K, Suzuki H, Hirohashi T, Ishikawa T, Meier PJ, Hirose K, Akizawa T, Yoshioka M y Sugiyama Y. Characterization of the inducible nature of MRP3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278: G438-G446. (2000).
69. Ruiz ML, Villanueva SS, Luquita MG, Ikushiro S, Mottino AD y Catania VA. Beneficial effect of spironolactone administration on ethynylestadiol-induced cholestasis in the rat: involvement of up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2. *Drug Metab Dispos.* 35: 2060-2066. (2007).
70. Zelcer N, van de Wetering K, Hillebrand M, Sarton E, Kuil A, Wielinga PR, Tephly T, Dahan A, Beijnen JH y Borst P. Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 7274-7279. (2005).

71. Manautou JE, de Waart DR, Kunne C, Zelcer N, Goedken M, Borst P y Elferink RO. Altered disposition of acetaminophen in mice with a disruption of the Mrp3 gene. *Hepatology*. 42: 1091-1098. (2005).
72. Kool M, van der Linden M, de Hass M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F y Borst P. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 6914-6919. (1999).
73. Steinbach D, Wittig S, Cario G, Viehmann S, Mueller A, Gruhn B, Haefler R, Zintl F y Sauerbrey A. The multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3) is associated with a poor outcome in childhood ALL and may account for the worse prognosis in male patients and T-cell immunophenotype. *Blood*. 102: 4493-4498. (2003).
74. Feierman DE, Melinkov Z y Nanji AA. Induction of CYP3A by ethanol in multiple in vitro and in vivo models. *Alcohol Clin Exp Res*. 27: 981-988. (2003).
75. Theile D, Haefeli WE, Seitz HK, Millonig G, Weiss J y Mueller S. Association of liver stiffness with hepatic expression of pharmacokinetically important genes in alcoholic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res*. 37: E17-E22. (2013).
76. Wareing CJ, Black SM, Hayes JD y Wolf CR. Increased levels of alpha-class and pi-class glutathione S-transferases in cell lines resistant to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. *Eur J Biochem*. 217: 671-676. (1993).
77. Ménez C, Mselli-Lakhal L, Foucaud-Vignault M, Balaguer P, Alvinerie M y Lespine A. Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. *Biochem Pharmacol*. 83: 269-278. (2012).
78. Haenisch S, Laechelt S, Bruckmueller H, Werk A, Noack A, Bruhn O, Remmler C y Cascorbi I. Down-regulation of ATP-binding cassette C2 protein expression in HepG2 cells after rifampicin treatment is mediated by microRNA-379. *Mol Pharmacol*. 80: 314-320. (2011).

79. Pan YZ, Gao W y Yu AM. MicroRNAs regulate CYP3A4 expresion via direct and indirect targeting. *Drug Metab Dispos.* 37: 2112-2117. (2009).
80. Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K y Dash S. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am J Pathol.* 180: 2490-2503. (2012).
81. Zhang Y, Li W y Vore M. Translational regulation of rat multidrug resistance-associated protein 2 expression is mediated by upstream open reading frames in the 5' untranslated region. *Mol Pharmacol.* 71: 377-383. (2007).
82. Zhang Y, Zhao T, Li W y Vore M. The 5'-untranslated region of multidrug resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2) regulates downstream open reading frame expression through translational regulation. *Mol Pharmacol.* 77: 237-246. (2010).
83. Markert C, Schweizer Y, Hellwig R, Wirsching T, Riedel KD, Burhenne J, Weiss J, Mikus G y Haefeli WE. Clarithromycin substantially increases steady-state bosentan exposure in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* En prensa. (2013).
84. Hayeshi R, Chinyanga F, Chenedza S y Mukanganyama S. Inhibition of human glutathione transferases by multidrug resistance chemomodulators in vitro. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 21: 581-587. (2006).
85. Crocenzi FA, Mottino AD y Roma MG. Regulation of synthesis and trafficking of canalicular transporters and its alteration in acquired hepatocellular cholestasis. Experimental therapeutic strategies for its prevention. *Curr Med Chem.* 11: 501-524. (2004).
86. Roma MG, Crocenzi FA y Mottino AD. Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease. *World J Gastroenterol.* 14: 6786-6801. (2008).
87. Rost D, Kartenbeck J y Keppler D. Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology.* 29: 814-821. (1999).

88. Weiss J, Sauer A, Divac N, Herzog M, Schwedhelm E, Böger RH, Haefeli WE y Benndorf RA. Interaction of angiotensin receptor type 1 blockers with ATP-binding cassette transporters. *Biopharm Drug Dispos.* 31: 150-161. (2010).
89. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M y Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 58: 685-704. (2006).
90. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterström RH, Perlmann T y Lehmann JM. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell.* 92: 73-82. (1998).
91. Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NC, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA y Moore JT. *Mol Endocrinol.* 14: 27-39. (2000).
92. di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P y Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med.* 30: 297-343. (2009).
93. Mottino AD y Catania VA. Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents. *World J Gastroenterol.* 14: 7068-7074. (2008).
94. Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, Collins JL y Kliewer SA. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 7500-7502. (2000).
95. Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, Hamilton G, Rizzo C, Jolley S, Gilbert D, Downey A, Mudra D, Graham R, Carroll K, Xie J, Madan A, Parkinson A, Christ D, Selling B, LeCluyse E y Gan LS. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 30: 795-804. (2002).

96. van Giersbergen PL, Gnerre C, Treiber A, Dingemans J y Meyer UA. Bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, activates the pregnane X receptor. *Eur J Pharmacol.* 450: 115-121. (2002).
97. Teng S, Jerkerle y Piquette-Miller M. Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. *Drug Metab Dispos.* 31: 1296-1299. (2003).
98. Kretschmer XC y Baldwin WS. CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters? *Chem Biol Interact.* 155: 111-128. (2005).
99. Masuyama H, Suwaki N, Tateishi Y, Nakatsukasa H, Segawa T y Hiramatsu Y. The Pregnane X receptor regulates gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *Mol Endocrinol.* 19: 1170-1180. (2005).
100. Mnif W, Pascussi JM, Pillon A, Escande A, Bartegi A, Nicolas JC, Cavailles V, Duchesne MJ y Balaguer P. Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicol Lett.* 170: 19-29. (2007).
101. Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH y Schellens JH. Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64: 35-43. (2009).
102. Li Y, Ross-Viola JS, Shay NF, Moore DD y Ricketts ML. Human CYP3A4 and murine Cyp3A11 are regulated by equol and genistein via the pregnane X receptor in a species-specific manner. *J Nutr.* 139: 898-904. (2009).
103. Harmsen S, Meijerman I, Febus CL, Maas-Bakker RF, Beijnen JH y Schellens JH. PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line. *Cancer Chemother Pharmacol.* 66: 765-771. (2010).
104. Lau AJ, Yang R, Yap CW y Chang TK. Selective agonism of human pregnane X receptor by individual ginkgolides. *Drug Metab Dispos.* 40: 1113-1121. (2012).

105. Plee-Gautier E, Antoun J, Goulitquer S, Le Jossic-Corcós C, Simon B, Amet Y, Salaun JP y Corcos L. Statins increase cytochrome P450 4F3-mediated eicosanoids production in human liver cells: a PXR dependent mechanism. *Biochem Pharmacol.* 84: 571-579. (2012).
106. Harmsen S, Meijerman I, Maas-Bakker RF, Beijnen JH y Schellens JH. PXR-mediated P-glycoprotein induction by small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Pharm Sci.* 48: 644-649. (2013).
107. Ohbuchi M, Yoshinari K, Kaneko H, Matsumoto S, Inoue A, Kawamura A, Usui T y Yamazoe Y. Coordinated roles of pregnane X receptor and constitutive androstane receptor in autoinduction of voriconazole metabolism in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 1332-1338. (2013).
108. Sharma D, Lau AJ, Sherman MA y Chang TK. Agonism of human pregnane X receptor by rilpivirine and etravirine: comparison with first generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 85: 1700-1711. (2013).
109. Wang YM, Lin W, Chai SC, Wu J, Ong SS, Schuetz EG y Chen T. Piperine activates human pregnane X receptor to induce the expression of cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1. *Toxicol Appl Pharmacol.* En prensa. (2013).
110. Weiss J, Theile D, Ruppel MA, Speck T, Spalwicz A y Haefeli WE. Interaction profile of macitentan, a new non-selective endothelin-1 receptor antagonist, in vitro. *Eur J Pharmacol.* 701: 168-175. (2013).
111. Weiss J y Haefeli WE. Potential of the novel antiretroviral drug rilpivirine to modulate the expression and function of drug transporters and drug-metabolising enzymes in vitro. *Int J Antimicrob Agents.* 41: 484-487. (2013).
112. Kawana K, Ikuta T, Kobayashi Y, Gotoh O, Takeda K y Kawajiri K. Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR. *Mol Pharmacol.* 63: 524-531. (2003).

113. Saradhi M, Sengupta A, Mukhopadhyay G y Tyagi RK. Pregnane and xenobiotic receptor (PXR/SXR) resides predominantly in the nuclear compartment of the interphase cell and associates with the condensed chromosomes during mitosis. *Biochem Biophys Acta*. 1746: 85-94. (2005).
114. Johnson DR, Li CW, Chen LY, Ghosh JC y Chen JD. Regulation and binding of pregnane X receptor by nuclear receptor corepressor silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT). *Mol Pharmacol*. 69: 99-108. (2006).
115. Hariparsad N, Chu X, Yabut J, Labhart P, Hartley DP, Dai X y Evers R. Identification of pregnane-X receptor target genes and coactivator and corepressor binding to promoter elements in human hepatocytes. *Nucleic Acid Res*. 37: 1160-1173. (2009).
116. Igarashi M, Yogiashi Y, Mihara M, Takada I, Kitagawa H y Kato S. Vitamin K induces osteoblast differentiation through pregnane X receptor-mediated transcriptional control of the *Msx2* gene. *Mol Cell Biol*. 27: 7947-7954. (2007).
117. Lee YH, Koh SS, Zhang X, Cheng X y Stallcup MR. Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol*. 22: 3621-3632. (2002).
118. Li T y Chiang JY. Rifampicin induction of CYP3A4 requires pregnane X receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4 α and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression. *Drug Metab Dispos*. 34: 756-764. (2006).
119. Squires EJ, Sueyoshi Y y Negishi M. Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver. *J Biol Chem*. 279: 49307-49314. (2004).
120. Lichti-Kaiser K, Xu C y Staudinger JL. Cyclic AMP-dependent protein kinase signaling modulates pregnane X receptor activity in a species-specific manner. *J Biol Chem*. 284: 6639-6649. (2009).
121. Ding X y Staudinger JL. Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C. *Biochem Pharmacol*. 69: 867-873. (2005).

122. Lin W, Wu J, Dong H, Bouck D, Zeng FY y Chen T. Cyclin-dependent kinase 2 negatively regulates human pregnane X receptor-mediated CYP3A4 gene expression in HepG2 liver carcinoma cells. *J Biol Chem*. 283: 30650-30657. (2008).
123. Biswas A, Pasquel D, Tyagi RK y Mani S. Acetylation of pregnane X receptor protein determines selective function independent of ligand activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 406: 371-376. (2011).
124. Staudinger JL, Xu C, Biswas A y Mani S. Post-translational modification of pregnane X receptor. *Pharmacol Res*. 64: 4-10. (2011).
125. Cervený L, Svecova L, Anzenbacherova E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, Ulrichova J, Anzenbacher P y Pavek P. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos*. 35: 1032-1041. (2007).
126. Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA y Zhang Y. FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci*. 31: 572-580. (2006).
127. Saeki M, Kurose K, Tohkin M y Hasegawa R. Identification of the functional vitamin D response elements in the human MDR1 gene. *Biochem Pharmacol*. 76: 531-542. (2008).
128. Chisaki I, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T e Iseki K. Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver. *Biochim Biophys Acta*. 1788: 2396-2403. (2009).
129. Muntané-Relat J, Ourlin JC, Domergue J y Maurel P. Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*. 22: 1143-1153. (1995).
130. Goodwin B, Hodgson E y Liddle C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol*. 56: 1329-1339. (1999).

131. Liu FJ, Song X, Yang D, Deng R y Yan B. The far and distal enhancers in the CYP3A4 gene co-ordinate the proximal promoter in responding similarly to the pregnane X receptor but differentially to hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Biochem J.* 409: 243-250. (2008).
132. Gödtel-Armbrust U, Metzger A, Kroll U, Kelber O y Wojnowski L. Variability in PXR-mediated induction of CYP3A4 by commercial preparations and dry extracts of St John's wort. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 375: 377-382. (2007).
133. Naspinski C, Gu X, Zhou GD, Mertens-Talcott SU, Donnelly KC y Tian Y. Pregnane X receptor protects HepG2 cells from BaP-induced DNA damage. *Toxicol Sci.* 104: 67-73. (2008).
134. Martin P, Riley R, Thompson P, Williams D, Back D y Owen A. Effect of prototypical inducers on ligand activated nuclear receptor regulated drug disposition genes in rodent hepatic and intestinal cells. *Acta Pharmacol Sin.* 31: 51-65. (2010).
135. Piton A, Rauch C, Langouet S, Guillouzo A y Morel F. Involvement of pregnane X receptor in the regulation of CYP2B6 gene expression by oltipraz in human hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 24: 452-459. (2010).
136. Weiss J, Herzog M y Haefeli WE. Differential modulation of the expression of important drug metabolising enzymes and transporters by endothelin-1 receptor antagonists ambrisentan and bosentan in vitro. *Eur J Pharmacol.* 660: 298-304. (2011).
137. Catania VA, Luquita MG, Sánchez-Pozzi EJ y Mottino AD. Differential induction of glutathione S-transferase subunits by spironolactone in rat liver, jejunum and colon. *Life Sci.* 63: 2285-2293. (1998).
138. Catania VA, Luquita MG, Sánchez-Pozzi EJ, Ikushiro S, Emi Y, Iyanagi T y Mottino AD. Effect of spironolactone on the expression of rat hepatic UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem Pharmacol.* 66: 171-177. (2003).

139. Oswald S, Haenisch S, Fricke C, Sudhop T, Remmler C, Giessmann T, Jedlitschky G, Adam U, Dazert E, Warzok R, Wacke W, Cascorbi I, Kroemer HK, Weitschies W, von Bergmann K y Siegmund W. Intestinal expression of P-glycoprotein (ABCB1), multidrug resistance associated protein 2 (ABCC2), and uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 predicts the disposition and modulates the effects of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 79: 206-217. (2006).
140. Bauer B, Hartz AM, Lucking JR, Yang X, Pollack GM y Miller DS. Coordinated nuclear receptor regulation of the efflux transporter, Mrp2, and the phase-II metabolizing enzyme, GSTpi, at the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28: 1222-1234. (2008).
141. Buckley DB y Klaassen CD. Induction of mouse UDP-glucosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Drug Metab Dispos.* 37: 847-856. (2009).
142. El-Sayed WM. Effect of pregnane X receptor (PXR) prototype agonists on chemoprotective and drug metabolizing enzymes in mice. *Eur J Pharmacol.* 660: 291-297. (2011).
143. Geick A, Eichelbaum M y Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem.* 276: 14581-14587. (2001).
144. Owen A, Goldring C, Morgan P, Park BP y Pirmohamed M. Induction of P-glycoprotein in lymphocytes by carbamazepine and rifampicin: the role of the nuclear hormone response elements. *Br J Clin Pharmacol.* 62: 237-242. (2006).
145. Satsu H, Hiura Y, Mochizuki K, Hamada M y Shimizu M. Activation of pregnane X receptor and induction of MDR1 by dietary phytochemicals. *J Agric Food Chem.* 56: 5366-5373. (2008).

146. Manov I, Bashenko Y, Eliaz-Wolkowicz A, Mizrahi M, Liran O e Iancu TC. High-dose acetaminophen inhibits the lethal effect of doxorubicin in HepG2 cells: the role of P-glycoprotein and mitogen-activated protein kinase p44/42 pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 322: 1013-1022. (2007).
147. Weiss J, Theile D, Spalwicz A, Burhenne J, Riedel KD y Haefeli WE. Influence of sildenafil and tadalafil on the enzyme- and transporter-inducing effects of bosentan and ambrisentan in LS180 cells. *Biochem Pharmacol.* 85: 265-273. (2012).
148. Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W y Schrenk D. The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol.* 157: 1575-1580. (2000).
149. Kauffmann HM, Pfannschmidt S, Zöller H, Benz A, Vorderstemann B, Webster JI y Schrenk D. Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology.* 171: 137-146. (2002).
150. Schrenk D, Baus PR, Ermel N, Klein C, Vorderstemann B y Kauffmann HM. Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicol Lett.* 120: 51-57. (2001).
151. Ghanem CI, Gómez PC, Arana MC, Perassolo M, Ruiz ML, Villanueva SS, Ochoa EJ, Catania VA, Bengochea LA y Mottino AD. Effect of acetaminophen on expression and activity of rat liver multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 68: 791-798. (2004).
152. Ruiz ML, Villanueva SS, Luquita MG, Sánchez-Pozzi EJ, Crocenzi FA, Pellegrino JM, Ochoa JE, Vore M, Mottino AD y Catania VA. Mechanisms involved in spironolactone-induced choleresis in the rat. Role of multidrug resistance-associated protein 2. *Biochem Pharmacol.* 69: 531-539. (2005).

153. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM y Edwards PA. Regulation of multidrug resistance-associated 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem.* 277: 2908-2915. (2002).
154. Stöckel B, König J, Nies AT, Cui Y, Brom M y Keppler D. Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3). *Eur J Biochem.* 267: 1347-1358. (2000).
155. Takada T, Suzuki H y Sugiyama Y. Characterization of the 5'-flanking region of human MRP3. *Biochem Biophys Res Commun.* 270: 728-732. (2000).
156. Jiang H, Chen K, He J, Pan F, Li J, Chen J, Chen W y Liang H. Association of pregnane X receptor with multidrug resistance-related protein 3 and its role in human colon cancer chemoresistance. *J Gastrointest Surg.* 13: 1831-1838. (2009).
157. Hitzl M, Klein K, Zanger UM, Fritz P, Nüssler AK, Neuhaus P y Fromm MF. Influence of omeprazole on multidrug resistance protein 3 expression in human liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 304: 524-530. (2003).
158. Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ y Klaassen CD. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos.* 33: 956-962. (2005).
159. Wagner M, Halilbasic E, Marschall HU, Zollner G, Fickert P, Langner C, Zatloukal K, Denk H y Trauner M. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology.* 42: 420-30. (2005).
160. Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y y Fardel O. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 34: 1756-1763. (2006).

161. Lemmen J, Tozakidis IE y Galla HJ. Pregnane X receptor upregulates ABC-transporter Abcg2 and Abcb1 at the blood-brain barrier. *Brain Res.* 1491: 1-13. (2013).
162. Ruiz ML, Rigalli JP, Arias A, Villanueva SS, Banchio C, Vore M, Mottino AD y Catania VA. Estrogen receptor- α mediates human multidrug resistance associated protein 3 induction by 17 α -ethynylestradiol. Role of activator protein-1. *Biochem Pharmacol.* En prensa. (2013).
163. Haefeli WE, Seibert-Grafe M y Gleiter CH. Arzneimittel-Kombinationstherapie. Gardez-Verlag, Sankt Augustin. (2002).
164. Ghanem CI, Gómez PC, Arana MC, Perassolo M, Delli Carpini G, Luquita MG, Veggi LM, Catania VA, Bengochea LA y Mottino AD. Induction of rat intestinal P-glycoprotein by spironolactone and its effect on absorption of orally administered digoxin. *J Pharmacol Exp Ther.* 318: 1146-1152. (2006).
165. Fromm MF, Eckhardt K, Li S, Schänzle G, Hofmann U, Mikus G y Eichelbaum M. Loss of analgesic effect of morphine due to coadministration of rifampin. *Pain.* 72: 261-267. (1997).
166. Fromm MF, Dilger K, Busse D, Kroemer HK, Eichelbaum M y Klotz U. Gut wall metabolism of verapamil in older people: effects of rifampicin-mediated enzyme induction. *Br J Clin Pharmacol.* 45: 247-255. (1998).
167. Barditch-Crovo P, Trapnell CB, Ette E, Zacur HA, Coresh J, Rocco LE, Hendrix CX y Flexner C. The effects of rifampin and rifabutin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of a combination oral contraceptive. *Clin Pharmacol Ther.* 65: 428-438. (1999).
168. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J y Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest.* 104: 147-153. (1999).

169. Drescher S, Glaeser H, Mürdter T, Hitzl M, Eichelbaum M y Fromm MF. P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 73: 223-231. (2003).
170. Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH y Schellens JH. The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. *Cancer Treat Rev.* 33: 369-380. (2007).
171. Backman JT, Olkkola KT y Neuvonen PJ. Rifampin drastically reduces plasma concentrations and effects of oral midazolam. *Clin Pharmacol Ther.* 59: 7-13. (1996).
172. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Lüscher MF y Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet.* 355: 548-549. (2000).
173. Piscitelli SC, Burstein AH, Chaitt D, Alfaro RM y Falloon J. Indinavir concentrations and St John's wort. *Lancet.* 355: 547-548. (2000).
174. de Jonge ME, Huitema AD, van Dam SM, Beijnen JH y Rodenhuis S. Significant induction of cyclophosphamide and thiotepa metabolism by phenytoin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 55: 507-510. (2005).
175. Foti RS, Rock DA, Pearson JT, Wahlstrom HL y Wienkers LC. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by mibefradil through heme destruction. *Drug Metab Dispos.* 39: 1188-1195. (2011).
176. Katzenmaier S, Markert C, Riedel KD, Burhenne J, Haefeli WE y Mikus G. Determining the time course of CYP3A inhibition by potent reversible and irreversible CYP3A inhibitors using a limited sampling strategy. *Clin Pharmacol Ther.* 90: 666-673. (2011).
177. Rassi A Jr, Rassi A y Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 375: 1388-1402. (2010).

178. Rodriguez-Morales AJ, Benitez JA, Tellez I y Franco-Paredes C: Chagas disease screening among Latin American immigrants in non-endemic settings. *Travel Med Infect Dis.* 6: 162-163. (2008).
179. Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J y Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 39: 41-54. (2006).
180. Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L y Pialoux G. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis.* 10: 556-570. (2010).
181. Biaglow JE, Varnes ME, Roizen-Towle L, Clark EP, Epp ER, Astor MB y Hall EJ. Biochemistry of reduction of nitro heterocycles. *Biochem Pharmacol.* 35: 77-90. (1986).
182. Gorla N, Díaz Gómez MI y Castro JA. Interaction of benznidazole reactive metabolites with rat liver deoxyribonucleic acid and nuclear proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 280: 22-31. (1986).
183. Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM y Cazzulo JJ. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia.* 44: 880-881. (1988).
184. Raleigh JA y Koch CJ. Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitroimidazoles to macromolecules. *Biochem Pharmacol.* 40: 2457-2466. (1990).
185. Buschini A, Ferrarini L, Franzoni S, Galati S, Lazzaretti M, Mussi F, Northfleet de Albuquerque C, María Araújo Domingues Zucchi T y Poli P. Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. *J Parasitol Res.* En prensa. (2009).
186. Hall BS y Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 56: 115-123. (2012).

187. Chauhan SC, Padmanabhan PK y Madhubala R. Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. *Curr Drug Targets*. 9: 957-965. (2008).
188. Krauth-Siegel L y Leroux AE: Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid Redox Signal*. 17: 583-607. (2012).
189. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM y Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 5022-5027. (2008).
190. Bern C. Antytrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 364: 2527-2534. (2011).
191. Marín-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S y BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J*. 156: 37-43. (2008).
192. Marín-Neto JA, Rassi A Jr, Avezum A Jr, Mattos AC, Rassi A, Morillo CA, Sosa-Estani S, Yusuf S y BENEFIT Investigators. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104: 319-324. (2009).
193. Raaflaub J y Ziegler WH. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung*. 29: 1611-1614. (1979).
194. Raaflaub J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung*. 30: 2192-2194. (1980).
195. Workman P, White RA, Walton MI, Owen LN y Twentyman PR. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Br J Cancer*. 50: 291-303. (1984).

196. Castro JA, de Mecca MM y Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* 25: 471-479. (2006).
197. Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PE, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC y Sperandio da Silva GM. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother.* 67: 1261-1266. (2012).
198. Ferreira RC, Schwarz U y Ferreira LC. Activation of anti-Trypanosoma cruzi drugs to genotoxic metabolites promoted by mammalian microsomal enzymes. *Mutat Res.* 204: 577-583. (1988).
199. de Toranzo EG, Masana M y Castro JA. Administration of benznidazole, a chemotherapeutic agent against Chagas disease, to pregnant rats. Covalent binding of reactive metabolites to fetal and maternal proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 272: 17-23. (1984).
200. Bapiro TE, Andersson TB, Otter C, Hasler JA y Masimirembwa CM. 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. (2002).
201. Burk O, Arnold KA, Nussler AK, Schaeffeler E, Efimova E, Avery BA, Avery MA, Fromm MF y Eichelbaum M. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol.* 67: 1954-1965. (2005).
202. Siemann DW, Morrissey S y Wolf K. In vivo potentiation of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea by the radiation sensitizer benznidazole. *Cancer Res.* 43: 1010-1013. (1983).
203. Roberts JT y Bleehen NM. Benznidazole with CCNU: a clinical phase I toxicity study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 11: 331-334. (1985).

204. Lee FY, Workman P y Chesseman KH. Misonidazole and benznidazole inhibit hydroxylation of CCNU by mouse liver microsomal cytochrome P-450 in vitro. *Biochem Pharmacol.* 36: 1349-1355. (1987).
205. Masana M, de Toranzo EG, Rubio M y Castro JA. Effect of benznidazole on the mixed function oxygenase system from rat liver microsomes. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 276: 4-11. (1985).
206. Montalto de Mecca M, Bernacchi AS y Castro JA. Prevention of benznidazole-induced prolonged effect on the pentobarbital sleeping time of rats using different thiol-containing compounds. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 108: 39-48. (2000).
207. Sassa S, Sugita O, Galbraith RA y Kappas A. Drug metabolism by the human hepatoma cell, HepG2. *Biochem Biophys Res Commun.* 143: 52-57. (1987).
208. Sormunen R, Eskelinen S y Lehto VP. Bile canaliculus formation in cultured HEPG2 cells. *Lab Invest.* 68: 652-662. (1993).
209. Cantz T, Nies AT, Brom M, Hofmann AF y Keppler D. MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of HepG2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278: G522-G531. (2000).
210. Le Vee M, Jigorel E, Glaise D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C y Fardel O. Functional expression of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporters in the differentiated human hepatoma HepaRG cell line. *Eur J Pharm Sci.* 28: 109-117. (2006).
211. Scharmach E, Hessel S, Niemann B y Lampen A. Glutathione S-transferase expression and isoenzyme composition during cell differentiation of Caco-2 cells. *Toxicology.* 265: 122-126. (2009).
212. Hanioka N, Nonaka Y, Saito K, Negishi T, Okamoto K, Kataoka H y Narimatsu S. Effect of aflatoxin B1 on UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in HepG2 cells. *Chemosphere.* 89: 526-529. (2012).

213. Zembruski NC, Nguyen CD, Theile D, Ali RM, Herzog M, Hofhaus G, Heintz U, Burhenne J, Haefeli WE y Weiss J. Liposomal sphingomyelin influences the cellular lipid profile of human lymphoblastic leukemia cells without effect on P-glycoprotein activity. *Mol Pharm.* 10: 1020-1034. (2013).
214. Fotakis G y Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* 160: 171-177. (2006).
215. Kubitz R, Helmer A y Häussinger D. Biliary transport systems: short-term regulation. *Methods Enzymol.* 400: 542-557. (2005).
216. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275. (1951).
217. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685. (1970).
218. Towbin H, Staehelin T y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 4350-4354. (1979).
219. Ikushiro S, Emi Y e Iyanagi T. Protein-protein interactions between UDP-glucuronosyltransferase isozymes in rat hepatic microsomes. *Biochemistry.* 36: 7154-7161. (1997).
220. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 29: e45. (2001).
221. Marguerite V, Beri-Dexheimer M, Ortiou S, Gueant JL y Merten M. Cobalamin potentiates vinblastine cytotoxicity through downregulation of *mdr-1* gene expression in HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem.* 20: 967-976. (2007).

222. Zhang Y, Gupta A, Wang H, Zhou L, Vethanayagam DR, Unadkat JD y Mao Q. BCRP transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharm Res.* 22: 2023-2034. (2005).
223. Elferink RP, Ottenhoff R, Liefting W, de Haan J y Jansen PL. Hepatobiliary transport of glutathione and glutathione conjugate in rats with hereditary hyperbilirubinemia. *J Clin Invest.* 84: 476-483. (1989).
224. Zhang K, Chew M, Yang EB, Wong KP y Mack P. Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms. *Mol Pharmacol.* 59: 837-843. (2001).
225. Bakos E, Evers R, Sinkó E, Varadi A, Borst P y Sarkadi B. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol Pharmacol.* 57: 760-768. (2000).
226. Tietze F. 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. (1969).
227. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* 106: 207-212. (1980).
228. Habig WH, Pabst MJ y Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249: 7130-7139. (1974).
229. Sambrook J y Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury. Secciones A1.116 y A8.1. (2001).
230. Novina CD y Sharp PA. The RNAi revolution. *Nature.* 430: 161-164. (2004).
231. Gu X, Ke S, Liu D, Sheng T, Thomas PE, Rabson AB, Gallo MA, Xie W y Tian Y. Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *J Biol Chem.* 281: 17882-17889. (2006).

232. Puigserver P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *Int J Obes (London)*. 29: S5-S9. (2005).
233. Lamba V, Panetta JC, Strom S y Schuetz EG. Genetic predictors of interindividual variability in hepatic CYP3A4 expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 332: 1088-1099. (2010).
234. Alqawi O, Bates S y Georges E. Arginine482 to threonine mutation in the breast cancer resistance protein ABCG2 inhibits rhodamine 123 transport while increasing binding. *Biochem J*. 382: 711-716. (2004).
235. Forster S, Thumser AE, Hood SR y Plant N. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in in vitro drug transport assays. *PLoS One*. 7: e33253. (2012).
236. Jouan E, Le Vee M, Denizot C, Da Violante G y Fardel O. The mitochondrial fluorescent dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCTs) 1 and 2. *Fundam Clin Pharmacol*. En prensa. (2012).
237. Dias V y Ribeiro V. The expression of the solute carriers NTCP and OCT-1 is regulated by cholesterol in HepG2 cells. *Fundam Clin Pharmacol*. 21: 445-450. (2007).
238. Huang M, Camara AK, Stowe DF, Qi F y Beard DA. Mitochondrial inner membrane electrophysiology assessed by rhodamine-123 transport and fluorescence. *Ann Biomed Eng*. 35: 1276-1285. (2007).
239. Chen ZS, Lee K y Kruh GD. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem*. 276: 33747-33754. (2001).
240. Amacher DE y Schomaker SJ. Ethylmorphine N-demethylase activity as a marker for cytochrome P450 CYP3A4 activity in rat hepatic microsomes. *Toxicol Lett*. 94: 115-125. (1998).

241. Hari Kumar KB y Kuttan R. Inhibition of drug metabolizing enzymes (cytochrome P450) in vitro as well as in vivo by *Phyllanthus amarus*. *Biol Pharm Bull.* 29: 1310-1313. (2006).
242. Aliya S, Reddanna P y Thyagaraju K. Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? *Mol Cell Biochem.* 253: 319-327. (2003).
243. Chang KT, Lii CK, Tsai CW, Yang AJ y Chen HW. Modulation of the expression of the pi class of glutathione S-transferase by *Andrographis paniculata* extracts and andrographolide. *Food Chem Toxicol.* 46: 1079-1088. (2008).
244. Harbottle A, Daly AK, Atherton K y Campbell FC. Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance. *Int J Cancer.* 92: 777-783. (2001).
245. Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B y Artursson P. Correlation of gene expression of the drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther.* 299: 164-170. (2001).
246. Gerets HH, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin S y Atienzar FA. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatocytes. *Cell Biol Toxicol.* 28: 69-87. (2012).
247. Roth WJ, Lindley DJ, Carl SM y Knipp GT. The effects of intralaboratory modifications to media composition and cell source on the expression of pharmaceutically relevant transporters and metabolizing genes in the Caco-2 cell line. *J Pharm Sci.* 101: 3962-3978. (2012).
248. Le Vee M, Jouan E, Stieger B y Fardel O. Differential regulation of drug transporter expression by all-trans retinoic acid in hepatoma HepaRG cells and human hepatocytes. *Eur J Pharm Sci.* 48: 767-774. (2013).

249. Nibourg GA, Huisman MT, van der Hoeven TV, van Gulik TM, Chamuleau RA y Hoekstra R. Stable overexpression of pregnane X receptor in HepG2 cells increases its potential for bioartificial liver application. *Liver Transpl.* 16: 1075-1085. (2010).
250. Zemruski NC, Haefeli WE y Weiss J. Interaction potential of etravirine with drug transporters assessed in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 1282-1284. (2011).
251. Watanabe K, Sakurai K, Tsuchiya Y, Yamazoe Y y Yoshinari K. Dual roles of nuclear receptor liver X receptor α (LXR) in the CYP3A4 expression in human hepatocytes as a positive and negative regulator. *Biochem Pharmacol.* En prensa. (2013).
252. Cai SY, He H, Nguyen T, Mennone A y Boyer JL. Retinoic acid represses CYP7A1 expression in human hepatocytes and HepG2 cells by FXR/RXR-dependent and independent mechanisms. *J Lipid Res.* 51: 2265-2274. (2010).
253. Chennamsetty I, Claudel T, Kostner KM, Baghdasaryan A, Kratky D, Levak-Frank S, Frank S, Gonzalez FJ, Trauner M y Kostner GM. Farnesoid X receptor represses hepatic human APOA gene expression. *J Clin Invest.* 121: 3724-3734. (2011).
254. Fan J, Maeng HJ, Du Y, Kwan D y Pang KS. Transport of 5,5-diphenylbarbituric acid and its precursors and their effect on P-gp, MRP2 and CYP3A4 in Caco-2 and LS180. *Eur J Pharm Sci.* 42: 19-29. (2011).
255. Goodwin B y Moore JT. CAR: detailing new models. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 437-441. (2004).
256. Watkins RE, Wisely GB, Moore LB, Collins JL, Lambert MH, Williams SP, Willson TM, Kliewer SA y Redinbo MR. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science.* 292: 2329- 2333. (2001).
257. Watkins RE, Maglich JM, Moore LB, Wisely GB, Noble SM, Davis-Searles PR, Lambert MH, Kliewer SA y Redinbo MR. 2.1 A crystal structure of human PXR complex in St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry.* 42: 1430-1438. (2003).

258. Schuster D y Langer T. The identification of ligand features essential for PXR activation by pharmacophore modeling. *J Chem Inf Model.* 45: 431-439. (2005).
259. Xia C, Hu J, Ketterer B y Taylor JB. The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J.* 313: 155-161. (1996).
260. Nishinaka T, Ichijo Y, Ito M, Kimura M, Katsuyama M, Iwata K, Miura T, Terada T y Yabe-Nishimura C. Curcumin activates human glutathione S-transferase P1 expression through antioxidant response element. *Toxicol Lett.* 170: 238-247. (2007).
261. Huang Y, Li W y Kong AN. Anti-oxidative stress regulator NF-E2-related factor 2 mediates the adaptive induction of antioxidant and detoxifying enzymes by lipid peroxidation metabolite 4-hydroxynonenal. *Cell Biosci.* 2: 40. (2012).
262. Liu XP, Goldring CE, Copple IM, Wang HY, Wei W, Kitteringham NR y Park BK. Extract of *Gingko biloba* induces phase 2 genes through Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway. *Life Sci.* 80: 1586-1591. (2007).
263. Falkner KC, Pinaire JA, Xiao GH, Geoghegan TE y Prough RA. Regulation of the rat glutathione S-transferase A2 gene by glucocorticoids: involvement of both the glucocorticoid and pregnane X receptor. *Mol Pharmacol.* 60: 611-619. (2001).
264. Anwar-Mohamed A, Degenhardt OS, El Gendy MA, Seubert JM, Kleeberger SR y El-Kadi AO. The effect of Nrf2 knockout on the constitutive expression of drug metabolizing enzymes and transporters in C57Bl/6 mice livers. *Toxicol In Vitro.* 25: 785-795. (2011).
265. Weerachayaphorn J, Mennone A, Soroka CJ, Harry K, Hagey LR, Kensler TW y Boyer JL. Nuclear factor-E2-related factor 2 is a major determinant of bile acid homeostasis in the liver and intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 302: G925-G936. (2012).

266. Sibhatu MB, Smitherman PK, Townsend AJ y Morrow CS. Expression of MRP1 and GSTP1-1 modulate the acute cellular response to treatment with the chemopreventive isothiocyanate, sulforaphane. *Carcinogenesis*. 29: 807-815. (2008).
267. Wang VY, Huang W, Asagiri M, Spann N, Hoffmann A, Glass C y Ghosh G. The transcriptional specificity of NF- κ B dimers is coded within the κ B DNA response elements. *Cell Rep*. 2: 824-839. (2012).
268. Feng R, Lu Y, Bowman L, Qian Y, Castranova V y Ding M. Inhibition of activator protein-1, NF- κ B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzymes activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem*. 280: 27888-27895. (2005).
269. Cheng J, Shah YM y Gonzalez FJ. Pregnane X receptor as a target for treatment of inflammatory bowel disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 33: 323-330. (2012).
270. Araujo MS, Martins-Filho OA, Pereira ME y Brener Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother*. 45: 819-824. (2000).
271. Huang H, Wang H, Sinz M, Zoeckler M, Staudinger J, Redinbo MR, Teotico DG, Locker J, Kalpana GV y Mani S. Inhibition of drug metabolism by blocking the activation of nuclear receptors by ketoconazole. *Oncogene*. 26: 258-268. (2007).
272. Sun HW, Wang FC y Ai LF. Simultaneous determination of seven nitroimidazole residues in meat by using HPLC-UV detection with solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 857: 296-300. (2007).
273. Nare B, Liu Z, Prichard RK y Georges E. Benzimidazoles, potent anti-mitotic drugs: substrates for the P-glycoprotein transporter in multidrug-resistant cells. *Biochem Pharmacol*. 48: 2215-2222. (1994).
274. Warrington JS, Greenblatt DJ y von Moltke LL. The effect of age on P-glycoprotein expression and function in the Fischer-344 rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 309: 730-736. (2004).

275. Bullffer RF, Castro JA y Fanelli SL. Benznidazole levels in blood vary with age in rats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106: 374-377. (2011).
276. Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, Drag M, Soll M, Alvinerie M y Pineau T. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur J Pharmacol*. 460: 85-91. (2003).
277. Diazgranados CA, Saavedra-Trujillo CH, Mantilla M, Valderrama SL, Alquichire C y Franco-Paredes C. *Lancet Infect Dis*. 9: 324-330. (2009).
278. Almeida EA, Ramos Junior AN, Correia D y Shikanai-Yasuda MA. Co-infection Trypanosoma cruzi/HIV: systematic review (1980-2010). *Rev Soc Bras Med Trop*. 44: 762-770. (2011).
279. Tapaninen T, Backman JT, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ y Niemi M. Itraconazole, a P-glycoprotein and CYP3A4 inhibitor, markedly raises the plasma concentrations and enhances the renin-inhibiting effect of aliskiren. *J Clin Pharmacol*. 51: 359-367. (2011).
280. Moreira da Silva R, Oliveira LT, Silva Barcellos NM, de Souza J y de Lana M. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. *Antimicrob Agents Chemother*. 56: 3344-3348. (2012).
281. Dallagiovanna B, Gamarro F y Castanys S. Molecular characterization of a P-glycoprotein-related tcpgp2 gene in Trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol*. 75: 145-157. (1996).
282. Torres C, Barreiro L, Dallagiovanna B, Gamarro F y Castanys S. Characterization of a new ATP-binding cassette transporter in Trypanosoma cruzi associated to a L1Tc retrotransposon. *Biochem Biophys Acta*. 1489: 428-432. (1999).

283. Campos MC, Castro-Pinto DB, Ribeiro GA, Barredo-Pinho MM, Gomes LH, da Silva Bellieny MS, Goulart CM, Echevarria A y Leon LL. P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. *Parasitol Res.* 112: 2341-2351. (2013).

284. Murta SM, dos Santos WG, Anacleto C, Nirdé P, Moreira ES y Romanha AJ. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. *Mol Biochem Parasitol.* 117: 223-228. (2001).

Agradecimientos

Esta Tesis representa la culminación de una etapa importante de mi carrera y de mi vida. No puedo dejar de agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera me acompañaron durante estos años.

En especial quisiera agradecer :

A mis Padres, quienes representan el principio de mis logros y a quienes se debe una parte importante de ellos. En especial a mi mamá, por “tenerme la vela” antes de cada examen y por ayudarme con la realización de mis planes. A mi hermano por su ayuda en cuestiones informáticas sin la cual este Trabajo no hubiera sido el mismo. Su colaboración me permitió llevar a cabo esta presentación íntegramente con software libre.

A Viviana, por abrirme las puertas de esta carrera y permitirme trabajar bajo su dirección, por el acompañamiento desde mi trabajo de tesina hasta hoy, por estar disponible a atendernos en todo siempre que la necesitamos, por hacer todo para que no nos falte nada para el trabajo diario y por la libertad para el desarrollo de las tareas cotidianas.

A Laura, por introducirme en el “arte” del trabajo en la mesada, por su inagotable paciencia para ello, por su colaboración con los experimentos y por aportarme tranquilidad en los momentos de desesperación científica.

A Aldo, por su consejo incondicional durante el desarrollo de este Trabajo de Tesis, por estar siempre al tanto de nuestras necesidades y por compartir con nosotros no sólo su tiempo sino también su espacio.

A Virginia, por su ayuda con muchos de los experimentos aquí presentados, por los cafés y las tortas, por su vocación de servir a los demás desinteresadamente y por simplemente escucharme durante todo este tiempo.

A Silvina, por darme siempre la posibilidad de participar en todos sus proyectos, por instruirme en las técnicas de su especialidad y por estar siempre esperándome cada vez que tuve que hablar con ella.

A Agostina, por su colaboración con parte de los experimentos, por las charlas de biología molecular, por su fe ciega y por también permitirme participar en sus proyectos.

A Maite, por su manera de trabajar durante los pocos meses que lleva en el grupo, por los cafés y por lo que vendrá.

A Julia, por comprenderme en lo que casi nadie en el mundo me puede comprender, por ayudarme a recordar cuando parezco darme por vencido, por el *Glühwein* y por las cenas temáticas junto a Virginia y Damián.

A Johanna, por llevar adelante un laboratorio con un orden excepcional, por toda la colaboración material brindada para los estudios del CYP3A4 y para los ensayos de actividad de PXR y por el excelente trato durante mi estancia en Heidelberg.

A Dirk, por su compañía en el trabajo diario, por su ayuda con los experimentos, por interesarse siempre por mi trabajo, por incluirme en sus proyectos de investigación, por instruirme en los pormenores del sistema científico alemán y porque su presencia fue determinante para el éxito de mi estancia.

A Jutta, Corina y Stephanie por su eficiencia, por su colaboración en distintas técnicas de laboratorio y por todos los *Geheimtipps* que me traje de recuerdo.

A todo el personal del Departamento de Farmacología Clínica y Farmacoepidemiología de la Universidad de Heidelberg, por su calidez en el trato cotidiano y por los meses compartidos entre la Eurocopa, los asados y festejos y las *Fehlermeldungen*. Por ser partícipes del semestre más inolvidable de mi vida en lo que yo llamo y el diccionario define como „*Heimat*“. Es por eso que adhiero a sus palabras de despedida. *Auch mich tröstet, dass man sich im Leben stets zweimal sieht.*

A todo el personal del Instituto de Fisiología Experimental, por los momentos compartidos durante estos años, por la ayuda teórica y práctica brindada, por aportar momentos de distracción dentro de la rutina del laboratorio y por soportarme todo este tiempo.

A todos aquellos que aportaron reactivos, materiales, equipos, conocimientos y otros recursos para la realización de este Trabajo de Tesis.

A Marcelo Luquita por su asistencia técnica en el manejo del HPLC.

Por último, pero no menos importante, a la Memoria de Claudia G. Echenique (1963-2013) por interesarse en mi desde mis días de tesinista, por su simpatía y por su generosidad. Por el cuadro que me prometió y no llegó a comenzar, la recordaré especialmente cada vez que esa imagen se pinte en mi retina.

A todos, eternamente gracias.