

## SUMMARY

### EFFECT OF BENZNIDAZOL ON DRUG BIOTRANSFORMATION AND EXCRETION SYSTEMS AFFECTING ITS OWN METABOLISM.

Benznidazole (BZL) constitutes the therapeutic agent of choice for treatment of Chagas disease in endemic regions and during its acute phase. During BZL therapy, drug-drug interactions, generation of BZL toxic metabolites, or changes in BZL metabolism or pharmacokinetics may occur. These undesirable effects are poorly characterized at present. We here reviewed most relevant data demonstrating up-regulation of expression and activity of phase I and II biotransformation systems and drug export pumps, which take place either in liver or intestine. Based on these effects it is possible to predict the occurrence of drug-drug interactions with therapeutic agents coadministered with BZL, as well as a decrease in BZL therapeutic efficacy, particularly under chronic treatment conditions.

**Key words:** Chagas disease, benznidazole, drug metabolism.

## INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es una infección endémica en América Latina que afecta a más de 8 millones de personas (1). La morbilidad es relativamente alta: 17-30 % de los pacientes en la fase crónica exhiben manifestaciones clínicas como miocardiopatía y megavísceras (megaesófago y megacolon). Actualmente, en la mayoría de las zonas endémicas la única droga disponible para el tratamiento en la fase aguda es el benznidazol (BZL), activo contra todas las formas del parásito (intra o extracelular) (2). Sin embargo, los efectos tóxicos son frecuentes y llevan, en algunos casos, a suspender el tratamiento. La dosis recomendada es de 5-7 mg/kg/día p.o. La duración promedio del tratamiento es de aproximadamente 60 días, pero puede prolongarse por 5 meses o más cuando la enfermedad se reactiva durante la fase crónica (por ej. en pacientes con inmunodeficiencia inducida o adquirida) (3). El BZL actúa a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos que probablemente se unen a macromoléculas del parásito (3-5). Los mecanismos de defensa del *T. cruzi* contra el estrés oxidativo son deficientes (6). En contraste, las células de los mamíferos cuentan con sistemas capaces de contrarrestar el desafío provocado por los radicales libres (mecanismos enzimáticos: glutatión S-transferasas, superóxido dismutasa, glutatión reductasa, etc. y mecanismos no enzimáticos: alfa-tocoferol, ascorbato, beta-carotenos y glutatión reducido) (7). Sin embargo a pesar de estos mecanismos, los derivados de BZL pueden producir efectos citotóxicos, descritos por ejemplo en hepatocitos de rata (8).

## SISTEMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN Y TRANSPORTE. SU REGULACIÓN.

Los seres humanos están expuestos a lo largo de su vida a una amplia variedad de xenobióticos, incluyendo drogas de uso terapéutico, contaminantes ambientales y toxinas. La concentración plasmática de un compuesto depende de su absorción, distribución, metabolismo y eliminación. El hígado es el principal órgano involucrado en la biotransformación de compuestos endógenos (bilirrubina, sales biliares, hormonas, etc.) y

exógenos (fármacos, toxinas, etc.). El intestino, reconocido por su importancia en la absorción de nutrientes, toxinas o fármacos, está dotado con los mismos sistemas de metabolización y transporte que el hígado y es también responsable del efecto de primer paso que sufren compuestos administrados oralmente. El metabolismo enzimático involucra:

**a- reacciones de Fase I** (oxidación, reducción, hidrólisis) catalizadas, en su mayoría, por miembros de la familia del citocromo P-450 (siendo CYP3A4 la isoforma más abundante y la que metaboliza el 60% de las drogas de uso terapéutico) (9), y **b- reacciones de Fase II** (conjugación con grupos endógenos como ácido glucurónico o glutatión) catalizadas por isoformas de glutatión S-transferasa (GST) y UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), entre otras

Si bien todos estos sistemas se expresan en forma significativa también en riñón, el hígado y el intestino constituyen los órganos de primer paso cuando la incorporación de un xenobiótico o droga de uso terapéutico ocurre por vía digestiva. Los productos resultantes del metabolismo hepático e intestinal son excretados al canalículo biliar o a la luz intestinal, respectivamente. La excreción a través de la membrana apical de estos compuestos es mediada por proteínas pertenecientes a la familia ATP-binding cassette (proteínas ABC). Entre ellas pueden citarse como muy relevantes: **a- P-glicoproteína** (P-gp, MDR1 o ABCB1) que posee afinidad por una amplia variedad de fármacos incluidos digoxina, atenolol, losartán, nifedipina, antibióticos, agentes retrovirales, etc., y **b- la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2** (MRP2 o ABCC2) que posee afinidad por compuestos conjugados con ácido glucurónico, glutatión o sulfato, incluyendo glucurónidos de bilirrubina, estradiol, paracetamol, etc., mayormente derivados del metabolismo de fase II (10, 11).

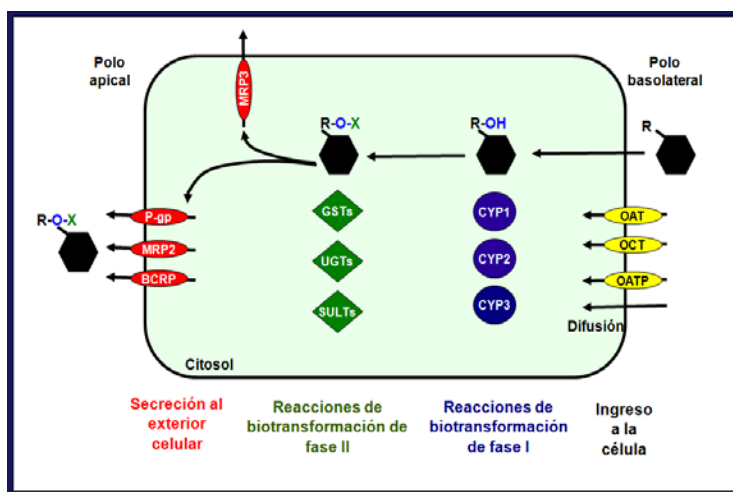


Fig. 1. **Acción coordinada de los sistemas celulares de biotransformación y transporte de xenobióticos.** El esquema representa una célula polarizada (ej. hepatocito, enterocito, etc), donde el ingreso de un xenobiótico ocurre a nivel basolateral por mecanismo difusivo simple o mediado por proteínas como el transportador de aniones orgánicos (OAT), de cationes orgánicos (OCT), o polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP). Una vez dentro de la célula, el xenobiótico puede sufrir reacciones de fase I, mayormente protagonizadas por miembros de la familia de citocromos 1, 2 o 3, siendo un ejemplo importante el CYP3A4 perteneciente a la última familia. El compuesto derivado (ej. hidroxilado), puede adicionar grupos polares (ej. ácido glucurónico, glutatión o sulfato) representado por la letra 'X' a través de enzimas de fase II, para finalmente excretarse a través de la membrana apical por transportadores dependientes de ATP como MRP2, P-gp o BCRP, o bien a través del polo basolateral por MRP3.

La expresión de los sistemas enzimáticos de biotransformación y los transportadores ABC en distintos tipos celulares (epitelios absortivos o secretores, elementos figurados de la sangre, macrófagos, etc.) no es estática ya que las células tienen una remarcable capacidad para regular sus niveles. La exposición a una variada gama de agentes químicos, incluyendo agentes terapéuticos, produce un incremento en la expresión de las enzimas de biotransformación y de transportadores alterando la depuración de endo- y xenobióticos (12-14).

En general, existe una regulación coordinada de los sistemas de biotransformación y los sistemas de transporte en un dado tipo celular. Diferencias tejido-específicas han sido atribuidas a variaciones en la abundancia de determinados mediadores (por ej. factores de transcripción) (15). Se ha observado que los sistemas enzimáticos y de transporte son influenciados por un gran número de factores como sexo, edad, composición de la dieta, hormonas, fármacos, etc., y que esta modulación puede ser mediada por receptores nucleares. Como consecuencia, un aumento en la cantidad de proteína y concomitantemente, en su actividad, podría acelerar la depuración de los compuestos que son sus sustratos (11, 13).

Es sabido que la regulación de estos sistemas puede producirse a varios niveles:

A nivel transcripcional:

- Por interacción de moléculas específicas con sitios selectivos en el promotor de los genes correspondientes.

A nivel postranscripcional:

- Por cambios en el procesamiento y estabilidad del ARNm.

- Por cambios en la velocidad de degradación de la proteína, en su localización, etc.

Tanto para los mecanismos de regulación transcripcional como postranscripcional se ha demostrado la participación de receptores nucleares activados por ligandos (endógenos o exógenos) (10, 11, 13). El receptor de pregnanos X (PXR, NR1I2) y el receptor constitutivo de androstanos (CAR, NR1I3) son considerados, en ese orden de relevancia, los más importantes sensores de xenobióticos que regulan genes involucrados en la biotransformación y eliminación de compuestos endógenos y exógenos (14).

Los receptores nucleares, en especial los que reconocen a xenobióticos como ligandos, luego de activarse actúan uniéndose a elementos de respuesta caracterizados por la presencia de dos o más repeticiones directas o invertidas de una dada secuencia consenso. Éstas pueden localizarse en el promotor proximal o en zonas distales (enhancers). La presencia de tales elementos se ha confirmado experimentalmente para el gen MDR1 (codificante de la proteína P-gp), donde median la inducción PXR-dependiente por rifampicina (16) y la inducción CAR-dependiente por ácido valproico (17). Resultados similares se han descrito para los genes humanos que codifican las enzimas CYP3A4 y UGT1A1, donde existen elementos de respuesta que median la inducción PXR-dependiente por rifampicina (18, 19). También se describió la presencia de elementos proximales de respuesta a PXR en el promotor de Mrp2 de rata, que median la inducción dependiente de este receptor nuclear luego del tratamiento con pregnenolona-16 $\alpha$ -carbonitrilo (20). No obstante, no se encuentra descrita en la bibliografía la presencia de tales sitios ni en el promotor ni en la región 5' distal del gen de MRP2 humano. Mediante estudios *in silico* nuestro grupo determinó la presencia de dos supuestos sitios de respuesta a receptores de xenobióticos en la región 5' reguladora del gen de MRP2 humano (resultados no publicados). Alternativamente, en la respuesta pueden estar implicados otros factores de

transcripción tales como AP-1. Al respecto, se ha descrito que la activación de AP-1 media la inducción de una isoforma de GST en hepatocitos de rata (21).

### **REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL. RECEPTOR NUCLEAR DE PREGNANOS X (PXR).**

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. Como se mencionó anteriormente, PXR es el receptor nuclear más importante en la mediación del efecto de fármacos y xenobióticos, modulando la expresión de los sistemas de biotransformación y excreción, que en definitiva afecta la farmacocinética de los mismos xenobióticos. PXR fue clonado por primera vez a partir de una biblioteca de hígado de ratón (22). Los mayores niveles de expresión de PXR se observaron 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 células tumorales de origen diverso (23).

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 (14). La elevada promiscuidad de PXR se debe a la presencia de un bolsillo hidrofóbico de gran tamaño (1200 Å<sup>3</sup>). El mismo goza además de una flexibilidad que le permite expandirse hasta 1600 Å<sup>3</sup> y acomodar compuestos de tamaños y, fundamentalmente, de estructuras químicas variables (23).

### **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 administrados conjuntamente con el primero. 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 (24).

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 espirolactona en ratas, disminuye la absorción de digoxina (25). Un fenómeno similar se ha descrito en estudios clínicos para distintos fármacos. Uno de esos casos incluye el cotratamiento con rifampicina, debido fundamentalmente a su rol inductor sobre varios sistemas de biotransformación y excreción de xenobióticos. Entre los fármacos cuya depuración es inducida por rifampicina pueden mencionarse: ciclofosfamida, ciclosporina, digoxina, erlotinib, etinilestradiol, ifosfamida, imatinib, lamotrigina, midazolam,

morfina, propafenona, verapamilo, warfarina y zidovudina (26-30). 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, irinotecan, metotrexato, paclitaxel, teniposido y topotecan (31). 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 (32, 33). Para ciertos compuestos como ciclofosfamida, la inducción de su metabolismo como se describió en un paciente cotratado con fenitoína, no sólo disminuyó la concentración de la droga original sino que aumentó la concentración de metabolitos de mayor toxicidad (34).

Las interacciones droga-droga también pueden 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 administración de un inhibidor del CYP3A4 junto a un sustrato del mismo. Vale recordar que el CYP3A4 es el responsable del metabolismo de aproximadamente el 60% de las drogas empleadas en la práctica clínica (35). Por ejemplo se ha observado que mibefradil inhibe CYP3A4, y en cierta medida también a P-gp, y de esa manera aumenta la concentración de ciclosporina, digoxina, simvastatina y tacrolimus en el organismo (36). De la misma manera se observó una menor depuración de midazolam ante la coadministración con voriconazol o ritonavir, ambos inhibidores de CYP3A4 (37). Otros inhibidores del CYP3A4 que pueden modificar el metabolismo de drogas coadministradas son amprenavir, claritromicina, diltiazem, eritromicina, fluoxetina, ketoconazol, saquinavir y tamoxifeno (35).

### BENZNIDAZOL (BZL).

El benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida, BZL) (Fig. 2) es un fármaco que pertenece a la familia de los nitroimidazoles.

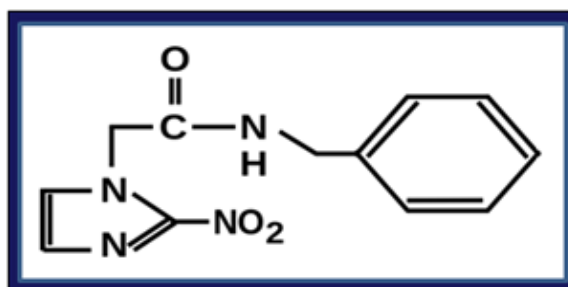


Fig. 2. Estructura química del BZL.

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. El BZL actúa 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 los radicales nitro y superóxido, con el consecuente daño oxidativo sobre la célula.

Tanto los mamíferos como los parásitos poseen mecanismos de defensa contra los intermediarios electrófilos y en particular contra el glioxal formado por activación del BZL. En el caso de los mamíferos, el sistema de las glutatión-S-transferasas (GSTs) y de las glioxalidas se constituyen en defensas efectivas 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 (6, 43). Además, algunos parásitos carecen de glioxalidas con funciones de detoxificación, lo que representaría un factor clave que determina la sensibilidad del mismo a la droga (42). Por el contrario, la deficiencia de nitroreductasas de tipo I se constituiría en un factor de resistencia (44).

La información acerca del efecto del BZL sobre la expresión y/o actividad de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas es muy escasa. Si el BZL puede modificar la farmacocinética de otras drogas o incluso su propia farmacocinética es aún más incierto. Al respecto, existen estudios que atribuirían al BZL un rol inhibitorio 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 (45), por un mecanismo que implicaría la inhibición de la hidroxilación de la lomustina por BZL (46, 47). 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-desmetilasa, probablemente por unión covalente de metabolitos del BZL, sin cambios en los contenidos de proteína (48). La coadministración de compuestos conteniendo grupos tioles (cisteína, N-acetilcisteína, penicilamina, glutatión) produce una reversión del efecto (49). No obstante, como se anticipó más arriba, se desconocen los efectos a nivel de la expresión de las isoformas más importantes del citocromo P-450, como así también sobre la expresión y actividad de otros sistemas relevantes de biotransformación y transporte. Interesantemente, un estudio realizado en pacientes varones que recibieron BZL por 30 días (7 mg/kg/día, en dos tomas diarias) reveló que la concentración plasmática máxima tiende a disminuir con el tiempo de tratamiento (50), sugiriendo un aumento en su velocidad de metabolismo y/o excreción.

En un intento por avanzar en el conocimiento de las posibles interacciones droga-droga y en la afectación de la farmacocinética del propio BZL, nuestro grupo realizó estudios recientes tanto en ratas como en cultivo de células de origen humano. Los resultados se presentan a continuación en forma sintética.

### **EFFECTO DEL BZL SOBRE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN Y TRANSPORTADORES DE DROGAS EN CÉLULAS HEPG2.**

En una primera etapa, realizamos estudios utilizando la línea celular HepG2 como modelo de hepatocito humano (51). Así, en Rigalli y col. (52) demostramos un efecto inductor de BZL (200  $\mu$ M, 48 h) sobre los niveles de CYP3A4 (proteína y ARNm), aunque con una inhibición de su actividad como hecho más significativo. Esta inhibición, posiblemente debido a una acción directa sobre la enzima, podría dar lugar a potenciales interacciones droga-droga. De la misma manera en que se observó una menor depuración de midazolam ante la coadministración con inhibidores de CYP3A4 como voriconazol y ritonavir (37), 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 (53, 54).

Además, se evaluó el efecto de BZL sobre enzimas de fase II. Con respecto a GST, la expresión de GST $\pi$  (proteína y ARNm) aumentó en respuesta al tratamiento que se tradujo en un aumento de la actividad GST global, determinada utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como sustrato. Dado que no se observaron diferencias en la expresión de GST $\alpha$  ni de GST $\mu$ , el incremento medido en la actividad se debería al aumento en la expresión de GST $\pi$ . Al respecto, se ha descrito su inducibilidad en hígado luego de la exposición a estímulos químicos y en modelos de preneoplasia (21, 55). En hígado humano, GSTP1 es la única isoforma de GST $\pi$  presente, siendo los ductos biliares el mayor sitio de expresión constitutiva. GST se ha visto implicada en la conjugación de especies electrofílicas potencialmente perjudiciales para la célula (56). La inducción de GST medido en la actividad se debería al aumento en la expresión de GST $\pi$ . Al respecto, se ha descrito su inducibilidad en hígado luego de la exposición a estímulos químicos y en modelos de preneoplasia (21, 55). En hígado humano, GSTP1 es la única isoforma de GST $\pi$  presente, siendo los ductos biliares el mayor sitio de expresión constitutiva. GST se ha visto implicada en la conjugación de especies electrofílicas potencialmente perjudiciales para la célula (56). La inducción de GST por BZL podría contrarrestar potenciales efectos oxidativos desencadenados por el mismo fármaco y por otros fármacos coadministrados (38). La expresión de UGT1A no fue afectada por BZL podría contrarrestar potenciales efectos oxidativos desencadenados por el mismo fármaco y por otros fármacos coadministrados (38). La expresión de UGT1A no fue afectada por BZL.

Cuando se evaluó el efecto del tratamiento con BZL sobre las proteínas transportadoras de drogas se observó un aumento concentración-dependiente en la expresión de P-gp y MRP2, sin cambios en BCRP (proteína de resistencia asociada al cáncer de mama), ni en el transportador basolateral MRP3. El aumento en los niveles proteicos y de ARNm de estos transportadores se correlacionó con un aumento en sus actividades de transporte, determinada utilizando sustratos modelos. Este es el primer estudio que demuestra un rol inductor de BZL sobre P-gp y MRP2 en un sistema humano. En estudios clínicos, se observó que sujetos con inducción de P-gp o MRP2 por rifampicina muestran menor AUC y/o mayor excreción de fármacos coadministrados (29, 30, 57). De ser BZL capaz de evocar una respuesta similar a la de rifampicina, se podrían esperar efectos sobre la depuración de otros fármacos sustratos de P-gp y/o MRP2, y por ende, cambios en la respuesta farmacológica y/o toxicológica.

#### **ACTIVACIÓN DE PXR POR BZL EN UN MODELO CELULAR.**

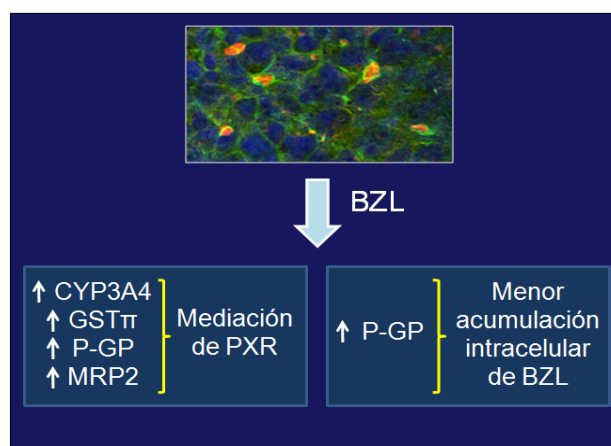
Utilizando la metodología del ARN de interferencia se logró silenciar la expresión de PXR en células HepG2. En este modelo, los efectos inductores de BZL fueron abolidos indicando que PXR es el mediador de su acción. A continuación y con la finalidad de determinar si el mecanismo por el cual PXR media 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. Como control positivo de activación de PXR se empleó rifampicina corroborándose la activación esperada de PXR por BZL (52).

**EFLUJO DE BZL EN CÉLULAS HEPG2. ROL DE P-GP.**

Para determinar el/los transportador/es involucrado/s en la extrusión de BZL de células HepG2 se coincubaron las células con BZL (100  $\mu$ M, 2 h) y con los inhibidores del transporte probenecid (PRO, 1 mM, inhibidor de MRPs) o verapamilo (VER, 100  $\mu$ M, inhibidor de P-gp) y se determinó la cantidad de BZL retenido luego de la incubación. Las células coincubadas con VER mostraron una mayor acumulación que las células controles o las coincubadas con PRO, sugiriendo que P-gp se encuentra efectivamente involucrada en el transporte de BZL, al menos en parte.

A fin de evaluar en forma más directa la participación de P-gp en el transporte de BZL en células HepG2 se procedió al silenciamiento del transportador mediante transfección con un siRNA específico. En estas condiciones se observó una acumulación significativamente mayor de BZL en células P-gp<sup>-</sup> que en células P-gp<sup>+</sup>, confirmando la participación de P-gp.

Finalmente, teniendo en cuenta que P-gp participa en el transporte de BZL y que el pretratamiento con BZL induce la expresión de P-gp, era esperable que el pretratamiento con BZL modificara su propia concentración intracelular. Efectivamente, 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. El efecto desapareció ante el agregado del inhibidor VER. Estos estudios nos permiten concluir que el tratamiento con BZL induce la expresión y actividad de P-gp, afectando su propia acumulación en las células HepG2. Los resultados se sintetizan en la Fig. 3.



**Fig. 3. Efectos destacados del tratamiento in vitro con BZL.** Las células HepG2 expresan las enzimas de biotransformación y transportadores de drogas característicos del hígado. MRP2 (en rojo) se expresa en la zona de contacto entre células o pseudocanalículo, que se identifica en la foto superior circundado por la proteína de uniones estrechas ZO-1 (en verde). Similar distribución se observa para P-gp. Los efectos mostrados en la parte inferior resultaron de la incubación de las células con BZL 200  $\mu$ M, durante 48 hs. La mediación de PXR fue demostrada experimentalmente por supresión parcial de su expresión. La inducción de P-gp por su parte condujo a un aumento de la extrusión de BZL resultando por lo tanto en una menor acumulación celular (52).



## EFFECTO DEL BZL SOBRE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN Y TRANSPORTADORES DE DROGAS EN UN MODELO *IN VIVO*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la línea celular HepG2, podría especularse que el tratamiento con BZL ha de afectar la expresión y actividad de estos sistemas en distintos tejidos del huésped donde normalmente se expresan, esto es, hígado, mucosa intestinal y riñón, entre otros. Estos órganos afectan la biodisponibilidad de drogas, por intervenir en su absorción, metabolismo y excreción, por lo que la alteración de estos sistemas por BZL podría modificar la depuración de drogas coadministradas con BZL e incluso la del propio fármaco. En una segunda etapa, evaluamos el efecto del tratamiento con distintas dosis de BZL (25; 50 y 100 mg/kg/día i.p., 3 días consecutivos) sobre los sistemas mencionados en hígado, intestino y riñón de rata. En principio, evaluamos el efecto sobre CYP3A, UGT y GST, sistemas enzimáticos cuantitativamente más importantes en los procesos de biotransformación de drogas. El tratamiento con la dosis mayor aumentó no sólo la expresión proteica de la familia de proteínas CYP3A sino también estimuló la actividad de CYP3A4 hepática, contrariamente a lo observado en células HepG2 (donde la actividad enzimática disminuyó). La contradicción entre los resultados descritos podría deberse a diferencias en los protocolos experimentales y/o a diferencias especie-específicas en la respuesta al BZL. En intestino (yeyuno e íleon) y en riñón no se observaron cambios significativos en la expresión de esta enzima. Como el hígado es el órgano cuantitativamente más importante en el proceso de biotransformación, los resultados sugieren que el metabolismo de otras drogas coadministradas y del propio BZL podría verse afectado por el tratamiento con BZL (58).

Con respecto a enzimas de fase II, el tratamiento con BZL no alteró los niveles de expresión de UGT1A en ninguno de los tejidos analizados indicando que esta etapa no es afectada para las isoformas analizadas, que representan las isoenzimas más relevantes involucradas en la glucuronización de derivados fenólicos como acetaminofeno y compuestos endógenos como la bilirrubina (56).

En cuanto a GST, las clases  $\alpha$  y  $\mu$  fueron las únicas que mostraron un aumento en la expresión luego del tratamiento con BZL, con un concomitante aumento en la actividad global. En hígado se observó un aumento en la expresión proteica de GST $\mu$ , sin cambios en la expresión de GST $\alpha$  ni GST $\pi$ , acompañado de un aumento en la actividad. Por otra parte, en yeyuno e íleon se observó un aumento proteico de GST $\alpha$ , sin cambios en la expresión de GST $\mu$  ni GST $\pi$ , el que se tradujo en un aumento de la actividad de GST global. Estos resultados sugieren que el aumento de la actividad GST en intestino se debería al menos en parte a la inducción de la expresión proteica de GST $\alpha$ . En riñón no se observaron alteraciones en la expresión de ninguna de las isoformas estudiadas (58). Es sabido que los metabolitos electrofílicos son metabolizados y excretados por procesos dependientes de glutatión que reducen su toxicidad. La reacción de conjugación es generalmente catalizada por GSTs, protegiendo a las macromoléculas celulares del ataque por compuestos electrofílicos reactivos (56). Como se dijo anteriormente, BZL es metabolizado por una nitroreductasa tipo I NADH-dependiente produciendo glioxal en el parásito (un agente citotóxico y mutagénico) (42), mientras que en mamíferos el grupo nitro es reducido a un grupo amino por una nitroreductasa tipo II, con la formación de radicales libres intermediarios y especies reactivas del oxígeno (ROS) (3, 42). En los protocolos terapéuticos, BZL es administrado vía oral. Es posible que la inducción de la expresión y actividad de GST $\mu$  en hígado y GST $\alpha$  en intestino (yeyuno e íleon) por BZL observada en

nuestro trabajo se constituya en un mecanismo compensatorio presistémico para hacer frente a la producción de metabolitos electrofílicos en el sitio de entrada de la droga al organismo.

En cuanto a la expresión de P-gp observamos que el tratamiento de ratas Wistar macho adultas con BZL indujo un aumento significativo en hígado, en yeyuno y en íleon. En riñón no se observaron cambios en la expresión de P-gp. Para evaluar si el aumento en la expresión de P-gp podría tener consecuencias funcionales sobre su actividad, la velocidad de eflujo de rodamina 123 (Ro-123, sustrato modelo de P-gp) fue medida en ratas tratadas con BZL y controles en un modelo de perfusión intestinal *in situ* de simple paso y con recolección simultánea de bilis y orina. Se observó un incremento en las velocidades de excreción biliar e intestinal (yeyuno) de Ro-123 en concordancia con el aumento de expresión de este transportador. Por otra parte, no se observaron diferencias en la excreción renal del compuesto en las ratas tratadas con BZL en relación al grupo control. La actividad de P-gp en íleon no fue evaluada (58).

Por otra parte, los niveles de expresión proteica de Mrp2 fueron significativamente inducidos por el tratamiento con BZL en hígado y en yeyuno, sin alterarse los niveles de expresión en riñón. En íleon, Mrp2 no fue detectable, como era de esperar. Utilizando el mismo modelo de perfusión intestinal *in situ* de simple paso se evaluó la velocidad de excreción de dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG, sustrato modelo, resultante de la metabolización de CDNB) como medida de la actividad de Mrp2. Se observó que, a pesar del gran aumento observado en los niveles de expresión hepática de Mrp2, la excreción biliar de DNP-SG y su metabolito mayoritario dinitrofenil-cisteinilglicina (DNP-CG) fue apenas ligeramente mayor en las ratas tratadas con BZL. En yeyuno proximal, la velocidad de excreción de DNP-SG/CG en ratas tratadas con BZL se correlacionó con el aumento en los niveles de expresión de Mrp2 observados. Como era esperado, no se observaron diferencias en la excreción renal de estos compuestos (58).

Con respecto a Mrp2, el aumento en su expresión es usualmente acompañada por un incremento en la excreción de sus sustratos. Sin embargo, el moderado incremento en la excreción biliar de DNP-SG+DNP-CG podría deberse a síntesis de proteína no funcional (por ej. Mrp2 no localizada en la membrana canalicular), a la presencia de otros compuestos que compitan en la excreción mediada por Mrp2 (por ej. metabolitos de BZL capaces de inhibir la actividad de Mrp2) o a la utilización de concentraciones no apropiadas de CDNB (la concentración utilizada en el modelo *in vivo* es saturante a nivel intestinal, pero puede no serlo a nivel hepático). Para esclarecer esta discrepancia decidimos usar otra estrategia para evaluar la actividad intrínseca de Mrp2, utilizando el modelo de hepatocitos aislados. En el proceso de aislamiento, los hepatocitos se lavan de compuestos intracelulares (bilirrubina, sales biliares, glutation e incluso, los derivados de BZL) que podrían competir con DNP-SG por la secreción. En este modelo encontramos un incremento más significativo en la actividad de Mrp2 en respuesta al tratamiento con BZL, que esta vez se correspondió mejor con el aumento en los niveles proteicos. Estos resultados sugieren que los obtenidos *in vivo* pueden afectarse, al menos en parte, por la competición entre DNP-SG y otros potenciales sustratos de Mrp2 (58).



**Fig. 4. Efectos destacados del tratamiento in vivo con BZL.** Los efectos que se muestran en la parte inferior de la figura resultaron del tratamiento con una dosis de 100 mg/kg peso/día, i.p., durante 3 días (58).

En conjunto, estos resultados sugieren que la inducción de P-gp y Mrp2 en hígado, podría alterar la capacidad de excreción biliar de diversos compuestos y llevar a interacciones droga-droga a nivel hepático. Por otra parte, la inducción de P-gp a nivel intestinal podría tener implicancias en la absorción del BZL, que se administra terapéuticamente por vía oral o de otras drogas sustratos del transportador. Como es sabido, P-gp es uno de los principales transportadores ABC expresados en intestino y representa una importante barrera contra la absorción de xenobióticos. Por consiguiente, su eventual inducción produciría una disminución de la biodisponibilidad de ciertos fármacos y en consecuencia, de su efectividad. Por otra parte, el aumento en la expresión de Mrp2 en intestino podría modificar el tiempo de permanencia en el interior celular y la excreción intestinal de derivados resultantes de la metabolización del BZL y otras drogas. Los resultados más relevantes descriptos anteriormente se sintetizan gráficamente en la Fig. 4.

#### **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE UNA DOSIS TESTIGO DE BZL EN RATAS.**

En la Tabla 1 se muestran los parámetros farmacocinéticos determinados en ratas controles y pretratadas con BZL para una dosis testigo de BZL (5 mg de BZL/kg peso corporal, intraduodenal). La constante de decaimiento plasmático de BZL (k) fue mayor en ratas pretratadas con BZL comparadas con el grupo control, en concordancia con un área bajo la curva (AUC) menor en el grupo pretratado con BZL en comparación al grupo control. También puede observarse que la cantidad de BZL eliminado en bilis durante 90 min fue significativamente mayor en animales pretratados con BZL en comparación con animales controles. En contraste, la cantidad de BZL excretada en orina fue similar entre ambos grupos experimentales

**TABLA 1: Parámetros farmacocinéticos resultantes de una dosis testigo de BZL.** C<sub>máx</sub>: concentración plasmática máxima; AUC: área bajo la curva; k: velocidad de eliminación. Cada valor representa la media±SD. \*significativamente diferente de Control, p<0,05, n=4-5

MUESTRA	PARÁMETRO	CONTROL	BZL
Plasma	C <sub>máx</sub> ( $\mu\text{M}$ )	18,8±2,3	14,7±1,6*
“	AUC(nmolmin/ml)	1298 ± 178	799 ± 20 *
“	k(min <sup>-1</sup> )	-0,0042 ± 0,0020	-0,0166 ± 0,0045*
Bilis	Excreción acumulativa (pmol/g hígado)	152±18	244±23*
	%dosis	0,64± 0.17	1,16±0,10*
Orina	Excreción acumulativa (pmol/grión)	1178±299	1016±184
	%dosis	1,01±0,67	1,55±0,19

Los resultados claramente confirman la mayor eliminación de BZL en animales pretratados con el fármaco, en correspondencia con los hallazgos sobre sus efectos a nivel de expresión y actividad de transportadores como P-gp en hígado (58).

#### EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON BZL SOBRE SU PROPIA ABSORCIÓN INTESTINAL.

Para evaluar si la inducción de P-gp a nivel intestinal podría afectar la absorción de BZL, se utilizó el modelo de sacos intestinales. La velocidad de absorción de BZL fue particularmente estimada en sacos de yeyuno, donde previamente observamos una mayor inducción de Mrp2 y P-gp por BZL, en presencia o ausencia de PSC833, inhibidor específico de P-gp. La velocidad de transporte de BZL desde el lado mucoso al lado seroso fue menor en el grupo pretratado con BZL, que en el grupo control, a lo largo de todo el experimento; efecto que se revirtió con el tratamiento con PSC833. Se observó además una menor absorción acumulativa de BZL en ratas pretratadas en comparación con el grupo control. PSC833 fue capaz de aumentar la captación intestinal en ambos grupos experimentales (58).

En conjunto, todos estos hallazgos sugieren la posibilidad de una disminución progresiva en la absorción de BZL y/o incremento en la metabolización/eliminación después de su administración terapéutica. La afectación de la absorción y farmacocinética de otras drogas coadministradas con BZL es, por supuesto, también esperable.

#### POSIBLES IMPLICANCIAS CLÍNICAS.

Al presente, se desconoce si podría existir una inducción de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas en pacientes tratados con BZL. La dosis usual utilizada para el tratamiento con BZL durante la enfermedad de Chagas varía entre 5 y

10 mg/kg peso corporal, administrada durante 30-60 días o por más de 5 meses en casos de reactivación de la enfermedad (2). En nuestros estudios, se utilizó una dosis de 100 mg/kg/día durante 3 días consecutivos, mostrando un efecto inductor sobre varios sistemas. La concentración plasmática de BZL medida 24 h posteriores a la última inyección en ratas fue de 15  $\mu$ M, la cual es similar a la encontrada en pacientes (13-26  $\mu$ M) 24 h posteriores a la última dosis y después de 30 días de tratamiento (50). En general, los roedores necesitan mayores dosis de un compuesto dado para reproducir los mismos efectos que en humanos. Entonces, el efector inductor de BZL en pacientes no debería ser descartado, dado que el tiempo de tratamiento es más extenso que en nuestro modelo experimental. Las interacciones droga-droga podrían ser particularmente importantes en pacientes bajo tratamiento de inmunosupresión con ciclosporina A, corticoesteroides y azatioprina para trasplantes de corazón o riñón (59, 60), o en pacientes VIH positivos infectados con *T. cruzi* que reciben antiretrovirales (61, 62).

Por otra parte, la inducción de P-gp a nivel intestinal podría tener implicancias en la absorción del BZL, que se administra terapéuticamente por vía oral o de otras drogas sustratos del transportador. Hasta el momento, no existe evidencia directa basada en estudios clínicos que sea capaz de sustentar esta presunción. Sin embargo, y a favor de esta hipótesis, Raaflaub (50) observó que la concentración plasmática máxima en pacientes hombres que recibieron BZL (7 mg/kg/día durante 30 días, dos veces al día) tiende a disminuir durante el tratamiento (-20% después de 25 días), sugiriendo un incremento en el metabolismo y/o excreción de BZL. Es por esto que decidimos estudiar si las alteraciones en las proteínas transportadoras observadas podrían tener algún efecto sobre la biodisponibilidad de una dosis testigo de BZL (5 mg/kg). Los parámetros farmacocinéticos de la dosis testigo de BZL calculados mostraron un aumento en la constante de eliminación plasmática (k) y una menor AUC plasmática en el grupo pretratado con BZL (100 mg/kg/día) en comparación con el grupo control, indicando un aumento en la depuración plasmática. Además, la  $C_{m\acute{a}x}$  de BZL en plasma fue menor en los animales pretratados con BZL, sugiriendo una menor absorción intestinal de BZL. Cuando evaluamos la cantidad de BZL excretada por la vía biliar observamos un aumento significativo en animales pretratados con BZL en comparación a los animales controles. La cantidad de BZL excretada en orina fue similar entre ambos grupos experimentales, sugiriendo que el aumento en la depuración plasmática podría deberse, al menos en parte, al aumento observado a nivel biliar (debido a la inducción de P-gp).

Al observar la disminución en la concentración plasmática máxima alcanzada luego de la administración de la dosis testigo de BZL en el grupo pretratado, decidimos evaluar si la capacidad de absorción intestinal podría estar afectada. Para este fin, estudiamos el transporte intestinal mucoso-seroso de BZL utilizando la técnica de sacos intestinales, en presencia o ausencia de PSC833 (inhibidor específico de la actividad de P-gp). Los resultados obtenidos (27% menos transporte de BZL en el sentido luminal-seroso) confirmaron nuestra hipótesis. La participación de P-gp en el eflujo de BZL fue previamente observada en células HepG2 (52). La información obtenida a partir de nuestros estudios sugiere la posibilidad de una disminución progresiva en la absorción de BZL y/o incremento en la metabolización/eliminación después de su administración terapéutica.

El hecho de que el pretratamiento con BZL no haya producido alteraciones en la expresión de CYP3A, GST, P-gp y Mrp2 en riñón es desconocido, poniéndose en evidencia un efecto órgano-específico. PXR es un receptor nuclear que regula la expresión de enzimas de biotransformación de fase I y fase II así como transportadores de xenobióticos (23). PXR se expresa ampliamente en hígado y en intestino delgado en el ser humano, rata,

ratón y conejo. Interesantemente, estos son tejidos donde los sistemas de biotransformación y transportadores se encuentran ampliamente expresados y se inducen por BZL. En células HepG2 donde se silenció el gen de PXR no se observó inducción de CYP3A4, GST $\pi$ , P-gp ni MRP2 al ser expuestas a BZL, sugiriendo que este receptor nuclear estaría involucrado en los efectos observados (52). Postulamos entonces que la inducción diferencial de los sistemas estudiados en hígado e intestino en comparación a la ausencia de efectos observados en riñón podría estar relacionada a diferencias tejido-específicas en la expresión de PXR y/o otros factores de transcripción. En riñón humano se detectaron menores niveles de PXR que en hígado e intestino (22). En consecuencia, resultados similares podrían esperarse en condiciones de tratamiento terapéutico.

## CONCLUSIONES.

Las Figs. 3 y 4 y la Tabla 1 reflejan los principales hallazgos encontrados en nuestros propios estudios utilizando el modelo de rata *in vivo* así como un modelo *in vitro* de células hepáticas de origen humano. El incremento de la expresión y actividad de sistemas específicos de fase I y II y en los transportadores de drogas más relevantes podrían dar lugar a la aparición de interacciones droga-droga con otros fármacos que pudieran ser coadministrados durante el tratamiento, así como afectar el metabolismo y excreción del propio BZL y sus metabolitos. Estas consideraciones merecen tenerse presentes, particularmente ante tratamientos prolongados con la droga.

## REFERENCIAS.

1. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. (2010) Chagas disease. *Lancet*. 375: 1388-1402.
2. Rodríguez Coura JR, de Castro SL. (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 3-24.
3. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. (2007) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 146: 602-20.
4. Moreno SN, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AO. (1982) Different behaviours of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys*. 218: 585-91.
5. Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. (1988) Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*. 44: 880-1.
6. Krauth Siegel L, Leroux AE. (2012) Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid Redox Signal*. 17: 583-607.
7. Gutteridge JM, Halliwell B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 899: 136-47.
8. Goijman SG, Dubin M, Stoppani OA. (1998) Nifurtimox and benznidazole inhibit DNA and protein synthesis in rat hepatocytes. *Medicina*. 48: 718-9.
9. Zhou SF, Xue CC, Yu XQ, Wang G. (2007) Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. *Curr Drug Metab*. 8: 526-53.
10. Köhle C, Bock KW. (2009) Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol*. 77: 689-99.

11. Klaassen CD, Aleksunes LM. (2010) Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev.* 62: 1-96.
12. Ibrahim S, Peggins J, Knapton A, Licht T, Aszalos A. (2001) Influence of beta-adrenergic antagonists, H1-receptor blockers, analgesics, diuretics, and quinolone antibiotics on the cellular accumulation of the anticancer drug, daunorubicin: P-glycoprotein modulation. *Anticancer Res.* 21: 84-7.
13. Catania VA, Sanchez Pozzi EJ, Luquita MG, Ruiz ML, Villanueva SS, Jones B, Mottino AD. (2004) Coregulation of expression of phase II metabolizing enzymes and multidrug resistance-associated protein 2. *Ann Hepatol.* 3: 11-7.
14. Mottino AD, Catania VA. (2008) Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents. *World J Gastroenterol.* 14: 7068-74.
15. Kashfi K, Yang E, Roy-Chowdhury J, Roy-Chowdhury N, Dannenberg A. (1994) Regulation of uridine diphosphate glucuronosyltransferase expression by phenolic antioxidants
16. Geick A, Eichelbaum M, Burk O. (2001) Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem.* 276: 14581-7.
17. Cervený L, Svecová L, Anzenbacherová E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, Ulrichová J, Anzenbacher P, Pavek P. (2007) Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos.* 35: 1032-41.
18. Liu FJ, Song X, Yang D, Deng R, Yan B. (2008) The far and distal enhancers in the CYP3A4 gene coordinate the proximal promoter in responding similarly to the pregnane X receptor but differentially to hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Biochem J.* 409: 243-250.
19. Sugatani J, Muzishima K, Osabe M, Yamakawa K, Kakizaki S, Takagi H, Mori M, Ikari A, Miwa M. (2008) Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression through distal and proximal promoter motifs: implication of defects in the UGT1A1 gene promoter. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 377: 597-605.
20. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA. (2002) 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: 2908-15.
21. Chang KT, Lii CK, Tsai CW, Yang AJ, Chen HW. (2008) Modulation of the expression of the pi class of glutathione S-transferase by *Andrographis paniculata* extracts and andrographolide. *Food Chem Toxicol.* 46: 1079-88.
22. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterström RH, Perlmann T, Lehmann JM. (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell.* 92: 73-82.
23. di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M. (2009) Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med.* 30: 297-343.
24. Haefeli WE, Seibert-Grafe M, Gleiter CH. (2002) Arzneimittel-Kombinationstherapie. Gardez-Verlag, Sankt Augustin.
25. Ghanem CI, Gómez PC, Arana MC, Perassolo M, Delli Carpini G, Luquita MG, Veggi LM, Catania VA, Bengochea LA, Mottino AD. (2006) Induction of rat intestinal P-glycoprotein by spironolactone and its effect on absorption of orally administered digoxin. *J Pharmacol Exp Ther.* 318: 1146-52.
26. Kiang TK, Ensom MH, Chang TK. (2005) UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther.* 106: 97-132.
27. Fromm MF, Eckhardt K, Li S, Schänzle G, Hofmann U, Mikus G, Eichelbaum M. (1997) Loss of analgesic effect of morphine due to coadministration of rifampin. *Pain.* 72: 261-7.
28. Fromm MF, Dilger K, Busse D, Kroemer HK, Eichelbaum M, Klotz U. (1998) Gut wall metabolism of verapamil in older people: effects of rifampicin-mediated enzyme induction. *Br J Clin Pharmacol.* 45: 247-55.
29. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. (1999) The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest.* 104: 147-53.
30. Drescher S, Glaeser H, Mürdter T, Hitzl M, Eichelbaum M, Fromm MF. (2003) P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 73: 223-31.
31. Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. (2007) The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. *Cancer Treat Rev.* 33: 369-80.

32. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Lüscher MF, Noll G. (2000) Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet*. 355: 548-9.
33. Piscitelli SC, Burstein AH, Chaitt D, Alfaro RM, Falloon J. (2000) Indinavir concentrations and St John's wort. *Lancet*. 355: 547-8.
34. de Jonge ME, Huitema AD, van Dam SM, Beijnen JH, Rodenhuis S. (2005) Significant induction of cyclophosphamide and thiotepa metabolism by phenytoin. *Cancer Chemother Pharmacol*. 55: 507-10.
35. Zhou SF, Xue CC, Yu XW, Li C, Wang G. (2007) Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 29: 687-710.
36. Foti RS, Rock DA, Pearson JT, Wahlstrom HL, Wienkers LC. (2011) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by mibefradil through heme destruction. *Drug Metab Dispos*. 39: 1188-95.
37. Katzenmaier S, Markert C, Riedel KD, Burhenne J, Haefeli WE, Mikus G. (2011) Determining the time course of CYP3A inhibition by potent reversible and irreversible CYP3A inhibitors using a limited sampling strategy. *Clin Pharmacol Ther*. 90: 666-73.
38. Biaglow JE, Varnes ME, Roizen-Towle L, Clark EP, Epp ER, Astor MB, Hall EJ. (1986) Biochemistry of reduction of nitro heterocycles. *Biochem Pharmacol*. 35: 77-90.
39. Gorla N, Díaz Gómez MI, Castro JA. (1986) Interaction of benznidazole reactive metabolites with rat liver deoxyribonucleic acid and nuclear proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 280: 22-31.
40. Raleigh JA, Koch CJ. (1990) Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitroimidazoles to macromolecules. *Biochem Pharmacol*. 40: 2457-66.
41. Buschini A, Ferrarini L, Franzoni S, Galati S, Lazzaretti M, Mussi F, Northfleet de Albuquerque C, María Araújo Domingues Zucchi T, Poli P. (2009) Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. *J Parasitol Res*. 2009: 463575.
42. Hall BS, Wilkinson SR. (2012) Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 56: 115-23.
43. Chauhan SC, Padmanabhan PK, Madhubala R. (2008) Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. *Curr Drug Targets*. 9: 957-65.
44. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. (2008) A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 5022-7.
45. Siemann DW, Morrissey S, Wolf K. (1983) In vivo potentiation of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea by the radiation sensitizer benznidazole. *Cancer Res*. 43: 1010-3.
46. Roberts JT, Bleehen NM. (1985) Benznidazole with CCNU: a clinical phase I toxicity study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 11: 331-4.
47. Lee FY, Workman P, Cheseman KH. (1987) Misonidazole and benznidazole inhibit hydroxylation of CCNU by mouse liver microsomal cytochrome P-450 in vitro. *Biochem Pharmacol*. 36: 1349-55.
48. Masana M, de Toranzo EG, Rubio M, Castro JA. (1985) Effect of benznidazole on the mixed function oxygenase system from rat liver microsomes. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 276: 4-11.
49. Montaltode Mecca M, Bernacchi AS, Castro JA. (2000) 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.
50. Raaflaub J. (1980) Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung*. 30: 2192-4.
51. Sormunen R, Eskelinen S, Lehto VP. (1993) Bile canaliculus formation in cultured HepG2 cells. *Lab Invest*. 68: 652-62.
52. Rigalli JP, Perdomo VG, Luquita MG, Villanueva SS, Arias A, Theile D, Weiss J, Mottino AD, Ruiz ML, Catania VA. (2012) Regulation of biotransformation systems and abc transporters by benznidazole in HepG2 cells. Involvement of Pregnane X-receptor. *PLoS Negl Trop Dis*. 6: e1951.
53. Cotreau MM, von Moltke LL, Greenblatt DJ. (2005) The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. *Clin Pharmacokinet*. 44: 33-60.



54. Harris RZ, Jang GR, Tsunoda S. (2003) Dietary effects on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacokinet.* 42: 1071-88.
55. Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K. (2003) Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? *Mol Cell Biochem.* 253: 319-27.
56. Mulder GJ. (1990) Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach. Taylor & Francis, Londres - Bristol.
57. Naesens M, Kuypers DR, Streit F, Armstrong VW, Oellerich M, Verbeke K, Vanrenterghem Y. (2006) Rifampin induces alterations in mycophenolic acid glucuronidation and elimination: implications for drug exposure in renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 80: 509-21.
58. Perdomo VG, Rigalli JP, Villanueva SS, Ruiz ML, Luquita MG, Echenique CG, Catania VA. (2013) Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 4894-902.
59. Bacal F, Silva CP, Pires PV, Mangini S, Fiorelli AI, Stolf NG, Bocchi EA. (2010) Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clin Transplant.* 24: E29-E34.
60. Silva AE, Silva AC, Faleiros AC, Guimaraes CS, Correa RR, Oliveira FA, Correia D, Teixeira AC, Ramirez LE, Teixeira V de P, dos Reis MA. (2010) Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. *Ann Diagn Pathol.* 14: 199-203.
61. Diazgranados CA, Saavedra-Trujillo CH, Mantilla M, Valderrama SL, Alquichire C, Franco-Paredes C. (2009) Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. *Lancet Infect Dis.* 9: 324-30.
62. Almeida EA, Ramos Junior AN, Correia D y Shikanai-Yasuda MA. (2011) Co-infection Trypanosoma cruzi/HIV: systematic review (1980-2010). *Rev Soc Bras Med Trop.* 44: 762-70.