



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO LIMITANTE DE LA GLICOPROTEÍNA P COMO
TRANSPORTADOR INTESTINAL DE EFLUJO EN LA
ABSORCIÓN ORAL Y BIODISPONIBILIDAD DE
FÁRMACOS.

T E S I N A

**TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN
CONTINUA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUCÍA ESTRADA MANILLA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Inés Fuentes Noriega

VOCAL: Profesor: Lauro Misael del Rivero Ramírez

SECRETARIO: Profesora: Kenneth Rubio Carrasco

1er. SUPLENTE: Profesor: Roberto Carlos Cañas Alonso

2° SUPLENTE: Profesor: Jorge Rafael Martínez Peniche

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**CONJUNTO D, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Inés Fuentes Noriega

SUSTENTANTE:

Lucía Estrada Manilla

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
PROPÓSITO Y JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVOS	16
1. GENERALIDADES	
1.1 ABSORCIÓN DE FÁRMACOS	17
1.1.1 Concepto.....	17
1.1.2 Importancia.....	18
1.1.2.1. Biodisponibilidad.....	18
1.1.2.1.1. Determinación de la Biodisponibilidad.....	20
1.1.3. Vías de administración y acceso de fármacos a la sangre.....	23
1.1.3.1. Clasificación.....	23
1.1.3.2. Administración oral.....	24
1.2. PROCESO DE ABSORCIÓN EN LA ADMINISTRACIÓN ORAL ...	27
1.2.1. Liberación.....	27
1.2.1.1. Desagregación y disgregación.....	29
1.2.1.2. Disolución.....	29
1.2.1.3. Difusión.....	31
1.2.2. Permeabilidad y transporte de fármaco a través de la membrana	31
1.2.3. Eliminación presistémica.....	33
1.2.3.1. Secreción y metabolismo intestinal.....	34
1.2.3.2. Metabolismo hepático. Efecto del primer paso.....	36
1.3. MEMBRANAS BIOLÓGICAS	40
1.3.1. Estructura y organización de la membrana.....	41
1.3.2. Componentes de la membrana.....	42
1.3.2.1. Lípidos.....	42
1.3.2.2. Proteínas.....	47
1.3.2.3. Carbohidratos.....	52
1.3.2.4. Uniones entre células.....	54

1.4. ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL	57
1.4.1. Anatomía general del tracto digestivo.....	57
1.4.1.1. Bosquejo histológico.....	61
1.4.1.2. Fisiología del tracto digestivo.....	63
1.4.2. Lugares de absorción.....	65
1.4.2.1 Mucosa del intestino delgado.....	65
1.4.2.2. Otros lugares de absorción.....	77
1.4.3. Mecanismos de absorción de fármacos a través del epitelio intestinal.....	77
1.4.3.1. Transporte pasivo.....	78
1.4.3.2. Transporte activo.....	83
1.4.3.3. Otros mecanismos de transporte.....	85
2. GLICOPROTEINA P	87
2.1. Antecedentes.....	87
2.2. Distribución tisular y función.....	100
2.3. Estructura.....	106
2.3.1. Organización.....	106
2.3.3.1. Dominios integrales de membrana.....	111
2.3.3.2. Dominios de unión a nucleótido.....	112
2.3.3.3. Sitios de unión a sustrato.....	116
2.4. Mecanismo de acción.....	118
2.4.1. Modelo de bomba clásica o de poro.....	119
2.4.2. Modelo de aspiradora hidrofóbica.....	120
2.4.3. Modelo de flippasa.....	121
2.5. Sustratos.....	123
2.6. Interacciones fármaco-fármaco.....	124
2.6.1. Inducción.....	126
2.6.2. Inhibición.....	128
2.6.2.1. Inhibidores competitivos y no competitivos.....	130
2.7. Superposición de sustratos con CYP3A4.....	132
2.8. Polimorfismo genético.....	135
2.8.1. Susceptibilidad a enfermedades.....	140

3. GLICOPROTEINA P E IMPORTANCIA CLÍNICA	142
3.1. Cáncer.....	142
3.2. Enfermedades del SNC.....	144
3.2.1. Epilepsia.....	145
3.2.2. Depresión.....	146
3.2.3. Neoplasia cerebral.....	147
3.2.4. Demencia asociada al VIH/SIDA.....	147
3.2.5. Alzheimer.....	148
3.2.6. Parkinson.....	151
3.3. VIH/SIDA.....	152
4. PERSPECTIVAS	153
4.1. Estrategias para la inhibición de la Glicoproteína P.....	153
4.1.1. Inhibidores de primera generación.....	154
4.1.2. Inhibidores de segunda generación.....	156
4.1.3. Inhibidores de tercera generación.....	159
4.1.4. Excipientes.....	161
4.1.5. Formulaciones farmacéuticas.....	161
4.1.6. Inhibidores irreversibles.....	162
4.1.7. Profármacos.....	163
4.1.8. Saturación.....	163
5. CONCLUSIONES	167
6. BIBLIOGRAFÍA	170
7. ANEXOS	178

INTRODUCCIÓN

El término Farmacocinética (derivado de los vocablos griegos “*pharmacón*” que significa fármaco y “*kinetikos*” que significa ponerse en movimiento), fue introducido por primera vez en 1953 por Harmust Dost¹ y pertenece a una rama de la Farmacología que involucra interpretar y describir cuantitativamente el curso temporal de los fármacos cuando estos son administrados en sistemas vivos. De esta manera, en su axioma más general la farmacocinética estudia “lo que el cuerpo le hace al fármaco” o en otras palabras, la interacción del fármaco con el organismo.

Esta definición, sin embargo; no alcanza a recoger todo lo que supone y estudia esta disciplina y es preferible considerarla de una forma más integral como el estudio que caracteriza la evolución temporal de la cantidad (concentración) de fármaco y/o sus metabolitos en los diferentes fluidos, tejidos y excreciones biológicas en base a la trayectoria de los procesos que la definen y que establecen el escenario fisiológico secuencial al que se encuentra sujeto el fármaco desde que es administrado en el organismo por una vía y en una forma de administración concreta hasta su eliminación; partiendo específicamente de la *liberación* de su forma farmacéutica con paso a solución libre, *absorción* a través de membranas biológicas y acceso a la circulación sistémica, *distribución* a los diversos tejidos y órganos blanco del organismo y, simultáneamente; la eliminación ya sea por *metabolismo* intestinal y hepático mayoritariamente y/o por *excreción* principalmente a nivel renal (*acrónimo, sistema LADME*). Adicionalmente, se encarga de analizar la relación de estos procesos en el desarrollo de la respuesta farmacológica (terapéutica o tóxica) en intensidad y duración, al igual que de la construcción de modelos matemáticos adecuados en un sistema de compartimientos que permitan la interpretación de los datos obtenidos.

¹ Wagner, G. John. *History of Pharmacokinetics*. J. Pharma. Ther. 1981, 12, 537-562.

Como resultado de este alcance, la Farmacocinética es una de las disciplinas que se ha ido consolidando durante los últimos 30 años. Su estudio proporciona las bases científicas para ser herramienta pronóstico de los procesos *ADME* en el descubrimiento de nuevas moléculas (selección de fármacos candidato) y en el área de desarrollo farmacéutico para la optimización de los fármacos ya existentes, estableciendo estrategias que reduzcan significativamente el número de fallos latentes de las nuevas formulaciones y sistemas terapéuticos. Por otra parte, su orientación clínica provee conocimientos útiles para establecer regímenes de dosificación y promover el empleo racional de medicamentos así como para el conocimiento y comprensión de los factores que conducen a la interacción o variabilidad farmacológica.

Actualmente, se ha enfocado de manera particular en el estudio de la correlación del proceso de absorción en la Biodisponibilidad de los fármacos. Esta vertiente ha ido adquiriendo importancia y desarrollo en la investigación de la industria farmacéutica así como una mayor atención por parte de los organismos reguladores debido a que la gran mayoría de los fármacos han sido diseñados para la administración oral, donde la absorción constituye el contexto en el que la Biodisponibilidad se reconoce e identifica como un criterio determinante de la capacidad de eficacia terapéutica y máximo aprovechamiento de un producto farmacéutico.

Dicha proyección está principalmente adecuada en la fabricación de productos genéricos y en la concesión de bioexenciones, lo que supone una oportunidad de ampliar las expectativas de mercado y el aumento en las opciones terapéuticas para el paciente. Además, también representa un importante reto desde el punto de vista del desarrollo de métodos y nuevos modelos que puedan predecir el potencial de absorción de un fármaco *in vivo* así como para el cumplimiento de normas, estándares regulatorios y de armonización instituidos para establecer las máximas garantías de eficacia y seguridad del fármaco.

Desde el punto de vista farmacológico, la absorción es un proceso dinámico que consiste en el movimiento de moléculas de fármaco a través de una o más membranas biológicas semipermeables desde su sitio de administración hasta la circulación sanguínea sistémica.²

Como se advirtió con anterioridad, este proceso es importante en el ámbito de las teorías farmacocinéticas y en la práctica clínica porque condiciona la Biodisponibilidad de los fármacos y su subsecuente eficacia terapéutica cuando son administrados por vías extravasculares, debido a que su acción sistémica requiere, en primera instancia; de su absorción a nivel de membranas y, posteriormente; de su Biodisponibilidad referida a la cantidad y velocidad con la cual el fármaco se absorbe y llega de forma activa e inalterada a la circulación sanguínea, siendo la sangre; el elemento central que puede distribuirlo en una concentración adecuada hasta el órgano diana donde se necesita para ser activo con su receptor y ejercer finalmente su efecto terapéutico.

En este sentido, se asume entonces que la Biodisponibilidad de un fármaco es en principio función recíproca del rendimiento de su proceso de absorción y puede hallarse modificada e incluso limitada por los mismos factores que rigen la incorporación del fármaco a la sangre.

Particularmente, este precepto adquiere una connotación relevante en la vía de administración oral, debido a que el proceso de absorción intestinal es el resultado de una compleja serie de eventos cinéticamente distintos determinados a su vez por diversos factores que, generalmente; intervienen en el desarrollo óptimo del proceso dando origen a la pérdida presistémica de fármaco, lo que se concreta en problemas de baja Biodisponibilidad, en la reducción del potencial de la respuesta farmacológica y, en consecuencia; en un aumento de la variabilidad inter e intrasujeto.

² Aiache, J. M.; Devissaguet, J. P. y Guyton-Hermann, A.M. *Biofarmacia*. Ed. El Manual Moderno. México, 1983.

Para contrarrestar esta problemática; entonces se hace necesario el conocimiento de los factores que contribuyen directa o indirectamente a alterar el curso natural del proceso absorptivo y la fracción biodisponible de fármaco. Conceptualmente, se trata de determinados factores de pérdida presistémica también llamados efectos de pérdida presistémicos inherentes a las propiedades fisicoquímicas del fármaco y al sustrato biológico gastrointestinal que pueden desencadenarse antes de la absorción (*pérdidas de absorbabilidad*), durante y después de la absorción (*efectos de primer paso*) relacionados con la mayor o menor estabilidad de los fármacos en el trayecto que comprende desde su liberación y disolución en el fluido gástrico hasta su paso mediante mecanismos de transporte por intestino e hígado antes de llegar a la circulación sistémica en corazón.

Bajo este contexto, una limitación sustancial se refiere a los mecanismos especializados de secreción y transporte en la membrana intestinal identificados como proteínas ABC o transportadores de eflujo ABC (*ATP-Binding-Cassette*) que por la complejidad de sus interacciones y afinidad con el fármaco, se han reconocido en los últimos años como importantes determinantes bioquímicos que pueden alterar la absorción neta y Biodisponibilidad de numerosos fármacos afectando los perfiles de seguridad y, en última instancia; predisponiendo la eficacia terapéutica y la respuesta del paciente al tratamiento.³

Especialmente se destaca que la mayor parte de las actividades de eflujo en el intestino, son atribuidas a la alta concentración y expresión habitual del transportador de membrana Glicoproteína P en la superficie de las vellosidades de los enterocitos (interfase lumen intestinal/citoplasma) el sitio primario donde se precisa la absorción para los fármacos administrados por vía oral.⁴

³ Estudante, M. et al., *Intestinal drug transporters: An overview*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012, 65 (10), 1340-1356.

⁴ Zhou, S-F. *Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition*. Xenobiotica. 2008, 38 (7-8), 802-832.

Por otra parte, su carácter eminente también tiene lugar en relación a que es un transportador capaz de reconocer como sustratos a un extenso espectro de compuestos estructural y funcionalmente no relacionados incluidos los fármacos, sus metabolitos y conjugados, así como toxinas y otros compuestos endógenos de la célula, fenómeno que parece desobeder las leyes del transporte convencional que rigen la selectividad de las proteínas.

La Glicoproteína P es el producto codificado del gen MDR1 (ABCB1); funciona como una bomba transmembrana que expulsa activamente una gran variedad de xenobióticos que entran en las células por difusión pasiva desde la bicapa lipídica y/o el citosol hacia el medio exterior mediante un mecanismo dependiente de la energía generada por la hidrólisis de ATP. Entre los fármacos que expulsa se incluyen fármacos clínicamente relevantes que son utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades como antibióticos, antineoplásicos, antiepilépticos, bloqueadores de canales de calcio, glucósidos cardíacos, corticoides, antirretrovirales Inhibidores de la proteasa del VIH, inmunosupresores y fármacos psicotrópicos entre otros sustratos.

Esta proteína transportadora glicosilada (abreviada como P-gp, Pgp-170, MDR1, PGY1, antígeno CD243 o ABCB1), fue descubierta originalmente en 1976 por conferir el fenómeno de resistencia a múltiples de fármacos (MDR) en células cancerosas debido a su sobreexpresión, por ello; también se le conoce como MDR clásica o típica. No obstante, en la última década ha ido adquiriendo un prominente interés como uno de los factores clave en el control de los procesos farmacocinéticos ADME al coincidir su intervención constitutiva bajo condiciones fisiológicas normales en diversos órganos, sobre todo en sitios excretores como el hígado, riñón e intestino al igual que en barreras sangre-tejido como la hematoencefálica, placentaria y testicular, entre otras interfases biológicas del organismo donde proporciona una barrera celular formidable de defensa/desintoxicación y resistencia intrínseca ya que limita la

concentración intracelular del fármaco y, por ende; su actividad al expulsarlo fundamentalmente de la circulación sanguínea, promueve un mecanismo efectivo para su eliminación en bilis y orina y, finalmente; protege a los diferentes tipos celulares e importantes santuarios farmacológicos susceptibles contra daños ocasionados por una toxicidad aguda o crónica.

Adicionalmente, la Glicoproteína P conlleva una gran importancia clínica al estar involucrada en varias interacciones fármaco-fármaco mediante su modulación a través de la inhibición o inducción conduciendo a cambios imprevistos en la respuesta farmacológica.

Asimismo, recientemente se han reportado polimorfismos en el gen MDR1 (SNPs), algunos de los cuales pueden afectar su expresión y función produciendo efectos clínicos variables en términos de eficacia del tratamiento o asociarse con la predisposición a una enfermedad. Se considera que su expresión puede contribuir potencialmente en la etiología, progresión y pronóstico de ciertas enfermedades además del cáncer como VIH/SIDA y enfermedades neurológicas.

La primera evidencia que indicaba que las glicoproteínas P estaban involucradas en un sistema secreción intestinal y absorción de fármacos, se remonta a principios de los años 90 en varios estudios *in vitro* realizados con líneas celulares de adenocarcinoma humano Caco-2 donde la P-gp se encuentra altamente expresada en el dominio apical.^{5,6}

Estos estudios reportaban que el transporte de Vinblastina y Docetaxel en la dirección Basolateral a Apical (B-A contraflujo) era 10 y 20 veces mayor

⁵ Estudante, M. et al., *Intestinal drug transporters: An overview*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012, 65 (10), 1340-1356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.042>.

⁶ Oostendorp L., Roos; Beijnen H., Jos and Schellens H.M., Jan. *The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier*. Can. Traeat. Rev. 2009, 35 (2), 137-147.

respectivamente que en la dirección Apical a Basolateral (A-B influjo), lo que corroboraba la actividad de extrusión de esta glicoproteína.⁷

Eventualmente, se presentaron otras variantes de esta misma metodología en función de la inhibición o la inducción. Estudiando el precedente de la primera observación en la modulación *in vitro* del fenotipo MDR mediante el uso concomitante de verapamilo en 1982, se reconoció que varios medicamentos que ya están en uso en la clínica inhiben a la Glicoproteína P y, en consecuencia; también pueden revertir en otros contextos el fenotipo MDR en sistemas experimentales. En estos ensayos se utilizaron inhibidores como el Verapamilo y Quinidina demostrando una disminución en la unión del fármaco sustrato lo que resultaba en un aumento de su absorción y Biodisponibilidad; tal fue el caso del Etopósido, Paclitaxel, Vinblastina y Digoxina. Por el contrario, con el uso de inductores como la Rifampicina se obtuvo una disminución significativa en su Biodisponibilidad aumentando la actividad intestinal total de esta proteína de eflujo.⁸

No obstante, la evidencia puntual para proporcionar una mejor comprensión en la evaluación de la importancia de la Glicoproteína P y aseverar su efecto en la reducción de la absorción y disminución de la Biodisponibilidad de fármacos administrados oralmente, proviene de desarrollar estudios *in vivo* en ratones con mutaciones genéticas del gen *mdr1a* que codifica a la principal isoforma de esta proteína expresada en el intestino. Un buen ejemplo, es el estudio de la limitación de la absorción intestinal de Paclitaxel (agente anticancerígeno conocido sustrato de la P-gp) utilizando ratones "knockout" *mdr1a* (-/-, deficiencia total de la P-gp) y wild type *mdr1a* (+/+). El área bajo la curva (ABC) del Paclitaxel, demostró ser de dos a 6 veces mayor en los ratones *mdr1a* (-/-) en comparación con los ratones wild type (+/+).

⁷ H. Lin, Jiunn and Yamazaki, Masayo. *Clinical Relevance of P-Glycoprotein in Drug Therapy*. Drug Metabolism Reviews. 2003, 35 (4), 417–454.

⁸ Boumendjel, Ahcencé; Boutonnat, Jean and Jacques, Robert. *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.2009.

Por consiguiente, la Biodisponibilidad del Paclitaxel se incrementó de un 11% en los ratones wild type a un 35% en los ratones knockout después de una dosis oral (10mg/Kg). Resultados similares se han obtenido con otros sustratos de la P-gp como Digoxina, Frepafloxacina, Vinblastina, Tacrolimus, Quinidina, Ciclosporina y agentes antiretrovirales inhibidores de la proteasa del VIH.⁹

Finalmente, la contribución general de la Glicoproteína P en la Biodisponibilidad de fármacos se complementa con el Talinolol, uno de sus sustratos más estudiados, el cual; es un β -bloqueante utilizado como antihipertensivo que tiene una lipofilicidad adecuada y un metabolismo de primer paso mínimo, requisitos previos con los cuales se esperaría que tuviera una buena absorción y una buena Biodisponibilidad. Sin embargo, pese a sus características; la Biodisponibilidad oral de Talinolol ha mostrado ser sólo de 54%, fenómeno atribuido a su absorción incompleta en el tracto gastrointestinal. La explicación se sustenta en el modelo de absorción de células Caco-2 donde exhibe un flujo asimétrico aproximadamente 10 veces mayor en la dirección (B-A) confirmándose que la Biodisponibilidad oral de Talinolol está limitada por el eflujo de esta proteína, interviniendo su función más allá que si tuviera una baja permeabilidad o inclusive un extenso metabolismo de primer paso.¹⁰

En años recientes, el número de líneas de investigación sobre el reconocimiento de la capacidad de expulsión de Glicoproteína P ha tenido avances significativos. Muchas de ellas actualmente se centran en la comprensión de su funcionamiento y en la información extraída sobre su organización estructural fundamental para la búsqueda de nuevas estrategias de regulación y predicción en el campo de desarrollo farmacéutico en términos de mejora de Biodisponibilidad, mientras que su

⁹ H. Linn, Jiunn and Yamazaki, Masayo. *Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics: Clinical Implications*. Clinical Pharmacokinetics. 2003, 42 (1), 59-98.

¹⁰ Hetal, Thakkar; Bindesh, Patel and Sneha, Thakkar. *A Review on Techniques for Oral Bioavailability Enhancement of Drugs*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2010, 4 (3), 303-323.

perspectiva oncológica ha llevado a la búsqueda de nuevos tratamientos anti-eflujo mediante la administración concomitante de quimioterapia para remediar clínicamente el MDR así como también diversas enfermedades crónicas. Otras no menos importantes, intentan dilucidar por completo cómo, a diferencia de otras proteínas transportadoras, la Glicoproteína P puede reconocer a una amplia variedad de sustratos ya que contradice el punto de vista clásico de las interacciones específicas ligando-receptor.

PROPÓSITO Y JUSTIFICACIÓN

Sin duda las causas por las cuales la absorción de un fármaco se reduce son muchas y de variada naturaleza, al respecto; uno de los factores por los cuales se puede limitar este proceso es la expresión del transportador de eflujo Glicoproteína P en el intestino, la cual; tiene un impacto significativo en la absorción de un amplio rango de fármacos clínicamente relevantes.

Fundamentalmente, el presente trabajo de *investigación bibliográfica* se enfoca en destacar su relación antagonista en el proceso de absorción asociada a un mecanismo de defensa, para entender su efecto sobre la Biodisponibilidad de fármacos y en su consiguiente acción terapéutica; condición que se ve reflejada en el fracaso de la farmacoterapia, principalmente en el tratamiento de enfermedades crónicas.

El interés por investigar a la Glicoproteína P parte esencialmente de una mayor comprensión del mecanismo de eflujo dentro de la lógica del proceso de absorción, con el fin de explorar un nuevo marco para el reconocimiento de su papel en la defensa fisiológica y en las alternativas que se han desarrollado para mejorar la Biodisponibilidad de fármacos que son sustrato de esta proteína, las cuales; difieren un poco del enfoque fisicoquímico tradicional que predomina actualmente.

OBJETIVOS

-General.

- ④ Explicar la función limitante de la Glicoproteína P como un transportador intestinal de eflujo en la absorción oral y Biodisponibilidad de fármacos, así como su relevancia clínica en el pronóstico terapéutico de enfermedades crónicas.

-Específicos.

- ④ Realizar una revisión bibliográfica del conocimiento actual acerca de la Glicoproteína P en su contexto más amplio de la biología de la membrana desde el punto de vista de su historia evolutiva, funciones fisiológicas paralelas en relación a su patrón de expresión e importancia en la absorción, metabolismo y excreción de fármacos; estructura y organización molecular, modelos alternativos de transporte, naturaleza interactiva con el complejo metabólico CYP3A4, potencial para mediar interacciones fármaco-fármaco; hasta alcanzar la configuración más acabada en los polimorfismos genéticos y su implicación clínica particularmente orientada en las enfermedades como Cáncer, VIH y del sistema nervioso central.
- ④ Conocer las diversas estrategias y métodos alternativos tanto clínicos como farmacéuticos implementados para la modulación de los efectos de la Glicoproteína P.

1. GENERALIDADES

1.1. Absorción de fármacos.

1.1.1. Concepto.

Desde el punto de vista farmacológico, la absorción es un proceso dinámico que consiste en el movimiento de moléculas de fármaco a través de una o más membranas biológicas semipermeables desde su sitio de administración hasta la circulación sanguínea general o sistémica.¹¹

En el contexto de esta definición, la absorción generalmente se compone de varios pasos y elementos que pueden considerarse parte de un proceso en serie; incluyendo la vía de administración, la liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica que lo contiene, el proceso de disolución que se desarrolla bajo condiciones fisiológicas en la zona anatómica a la que ha accedido la forma de dosificación, la absorción como tal mediante la permeabilidad de la membrana y mecanismos de transporte celular y, por último; la eliminación presistémica.

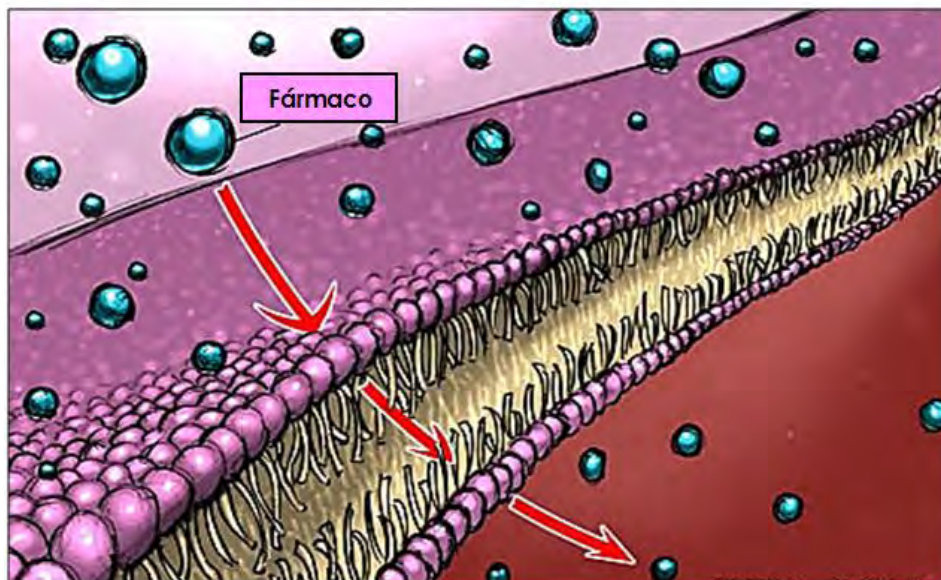


Fig.1. Representación esquemática del proceso de absorción. Las moléculas de fármaco atraviesan la membrana plasmática y se desplazan a la sangre. Imagen modificada de: <http://pharmcytimes.com/tag/git-drug-absorption/>.

¹¹ Staud, Frantisek; Ceckova, Martina; Micuda, Stanislav and Pavek Peter. *Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics*. Methods in Molecular Biology.2010, 596 (10), 199-222.

1.1.2. Importancia.

El carácter fundamental e imprescindible del proceso de absorción, parte de permitir la exposición del fármaco en la sangre periférica donde pueda estar disponible en un intervalo de concentración adecuado para ser distribuido por medio del circuito venoso en su diana farmacológica a fin de ejercer posteriormente su efecto terapéutico y desempeñar una respuesta clínicamente significativa para los propósitos de farmacoterapia.

De acuerdo con la consideración anterior, la eficiencia y rendimiento del proceso de incorporación de fármaco a la sangre en velocidad y extensión resulta clave para determinar la Biodisponibilidad del fármaco, la cual; establece a su vez la eficacia terapéutica del tratamiento en términos de intensidad y duración de efecto. Siendo la velocidad de absorción la que determinará que tan rápidamente se presentará el efecto del fármaco y la cantidad absorbida la intensidad del mismo.

Del tal manera que si se asume que el fármaco se absorbe lentamente o en escasa proporción, este llegará a la sangre en niveles de concentración insuficientes; situación que se refleja en una baja Biodisponibilidad para poder producir una respuesta terapéutica, o bien; la respuesta observada será probablemente inferior a la prevista además de considerar el hecho que el efecto del fármaco tardará más en llevarse a cabo. Por otra parte, si la absorción es rápida o excesiva el fármaco podrá asociarse con un incremento en la aparición de efectos adversos o incluso tóxicos. Esto es particularmente importante en fármacos con margen terapéutico estrecho, en patologías graves o que requieren de un efecto rápido.

1.1.2.1. Biodisponibilidad.

El concepto de Biodisponibilidad fue introducido por primera vez en la literatura farmacéutica por Oser y colaboradores en 1945 como la disponibilidad fisiológica de vitaminas hidrosolubles en preparaciones

farmacéuticas.¹² Tiempo después, otros términos que tienen significados similares también se han mencionado, por ejemplo; "la eficacia de la absorción" (Wagner, 1971), "la disponibilidad biofásica" para describir la disponibilidad de un fármaco en su biofase (Smolen, 1971), "disponibilidad sistémica" (Barr, 1973) y el término más general "disponibilidad biológica".

Actualmente, la Biodisponibilidad (designada como F) se define como la cantidad porcentual de fármaco que accede a partir de una forma farmacéutica de manera activa e inalterada a la circulación general después del proceso de absorción y la velocidad a la cual lo hace.

En el caso de la administración oral, la circulación general se refiere principalmente a la sangre venosa (con excepción de la sangre hepática) y a la sangre arterial que lleva el fármaco al tejido. Por tanto, la Biodisponibilidad oral es una función de la fracción de la dosis de fármaco que se absorbe en el tracto gastrointestinal desde el lumen hacia los enterocitos (F_a), la fracción de la dosis que pasa intacta a través de las membranas del intestino hacia la sangre porta hepática (F_g) y, en particular; de la fracción que pasa a través del hígado intacta antes de llegar el suministro de sangre sistémica (F_h).^{13,14}

Desde una perspectiva histórica, sólo F_a y F_h se consideran que tienen un impacto significativo en F . Sin embargo, tanto el metabolismo intestinal como la extrusión activa de fármaco absorbido han sido recientemente reconocidos como los principales factores determinantes de la Biodisponibilidad oral.¹⁵

¹² Oser L., Bernard; Melnick, Daniel and Hochberg, Melvin. *Physiological availability of vitamins. Study of methods for determining availability of vitamins in pharmaceutical products.* Ind Eng Chem. Anal. Ed., 1945, 17 (7), 405-411

¹³ El-Kattan, Ayman and Varma, Manthena. Capítulo 1. *Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability.* Topics on Drug Metabolism. 2012, 1-21.

¹⁴ Shugarts, Sarah and Benet Z., Leslie. *The Role of Transporters in the Pharmacokinetics of Orally Administered Drugs.* Pharmaceutical Research. 2009, 26 (9), 2039-2053.

¹⁵ Zhang, Yuanchao and Benet Z., Leslie. *The Gut as a Barrier to Drug Absorption Combined Role of Cytochrome P4503A and P-Glycoprotein.* Clin Pharmacokinet. 2001, 40 (3), 159-168.

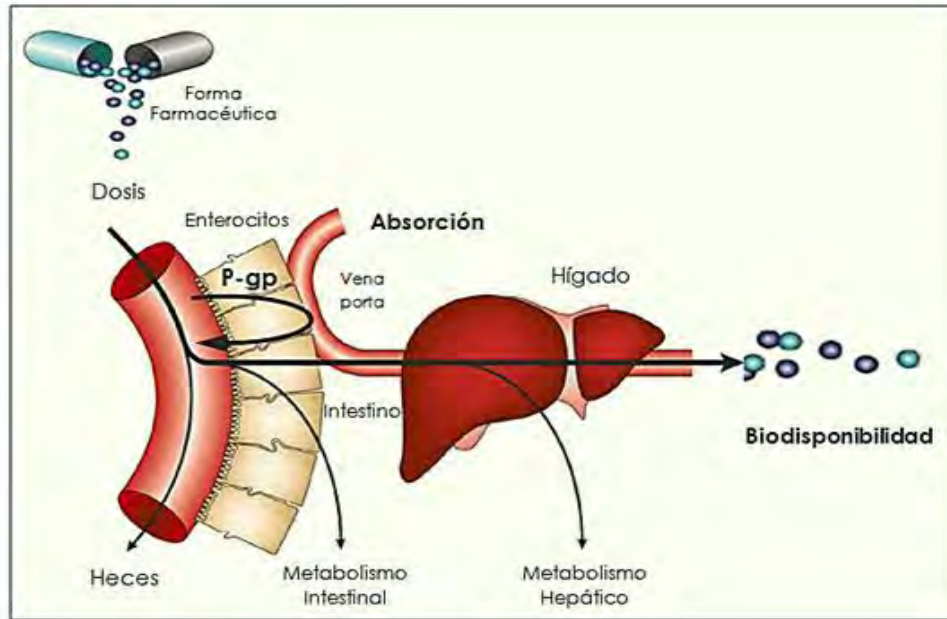


Fig.2. Esquema de la interacción entre los principales determinantes de la Biodisponibilidad oral de un fármaco. Imagen modificada de: <http://www.nature.com/reviews/index.html>.

1.1.2.1.1. Determinación de la Biodisponibilidad.

Para determinar la fracción de la dosis administrada que accede a la circulación sistémica intacta, se hace uso del estudio de tránsito del fármaco a través del organismo; bien sea a partir de niveles plasmáticos o a través de la cuantificación del fármaco en otros fluidos biológicos como la excreción urinaria, al ser la sangre y la orina dos líquidos biológicos fácilmente muestreables.

Desde el punto de vista cuantitativo, la Biodisponibilidad se mide mediante la construcción comparativa referida a una formulación estándar de la curva de niveles plasmáticos en función de los parámetros concentración-tiempo, donde gráficamente; el área bajo la curva (*ABC*) se muestra como un indicador de exposición directamente proporcional de la cantidad absorbida de fármaco, mientras que la concentración plasmática máxima (*C_{máx}*) y el tiempo en el que se alcanza dicha concentración (*T_{máx}*) como indicadores de la velocidad de absorción.

En relación a la formulación estándar, la intravenosa es tomada como punto de referencia óptimo para determinar la Biodisponibilidad, debido a que para esta vía se asume por definición que toda la dosis administrada

accede inalterada a la circulación sistémica al depositarla directamente en la sangre (Biodisponibilidad completa o del 100%), misma que es significativamente inferior por otra vía. No obstante, dependiendo de la comparación referida, la Biodisponibilidad puede dividirse en absoluta o relativa.

-Biodisponibilidad Absoluta.

La determinación de la Biodisponibilidad absoluta en magnitud comporta la comparación de una administración intravenosa del fármaco con una administración extravascular. Se realiza para determinar el efecto de primer paso (metabolismo hepático).

► Datos sanguíneos:

$$F \text{ absoluta} = \frac{\text{ABC extravascular} * \text{Dosis intravenosa}}{\text{ABC intravenosa} * \text{Dosis extravascular}}$$

Donde

F= 0 Nada llegó inalterado a la circulación

F= 1 Todo llegó a la circulación

► Datos urinarios:

$$F \text{ absoluta} = \frac{\text{Aex}_{\infty} \text{ extravascular} * \text{Dosis intravenosa}}{\text{Aex}_{\infty} \text{ intravenosa} * \text{Dosis extravascular}}$$

-Biodisponibilidad Relativa.

Puesto que no siempre es factible la utilización de la vía intravenosa, se suele utilizar como estándar de referencia otra administración extravasal del fármaco. Por lo tanto, la Biodisponibilidad relativa corresponde a la comparación de formas farmacéuticas extravasculares distintas.

Esta comparación determina el efecto de las diferencias de la formulación en la absorción del fármaco, lo cual; es útil para seleccionar la forma farmacéutica o la formulación más adecuada.

► Datos sanguíneos:

$$F \text{ relativa} = \frac{ABC \text{ prueba} * \text{Dosis referencia}}{ABC \text{ referencia} * \text{Dosis prueba}}$$

► Datos urinarios:

$$F \text{ relativa} = \frac{Aex_{\infty} \text{ prueba} * \text{Dosis referencia}}{Aex_{\infty} \text{ referencia} * \text{Dosis prueba}}$$

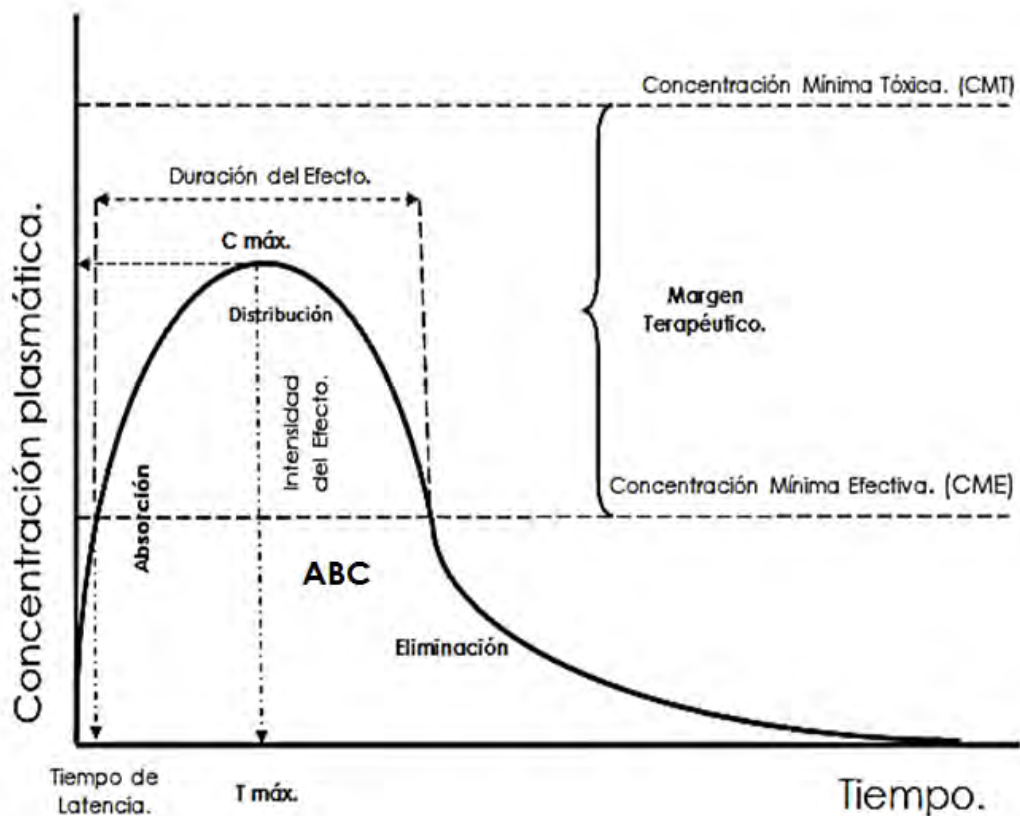


Fig.3. Curva de niveles plasmáticos de fármaco después de la administración oral. Se caracteriza por mostrar una primera fase ascendente y otra descendente, pasando por un punto de inflexión. La fase ascendente representa gráficamente el proceso de absorción y su pendiente la velocidad de absorción; tras el punto de inflexión, donde el valor de la pendiente es cero, sigue la fase descendente, que representa los procesos de eliminación (biotransformación y excreción) y su pendiente la velocidad con la que se llevan a cabo. En conjunto estos procesos caracterizan el ABC.

El tiempo transcurrido desde que la concentración plasmática es cero hasta alcanzar progresivamente un valor se conoce como período o tiempo de latencia, el valor de concentración máxima $C_{máx}$ y el tiempo donde alcanza la concentración máxima $T_{máx}$. Para la mayoría de los fármacos, la $C_{máx}$ se relaciona con la intensidad del efecto farmacológico.

El margen terapéutico, es el rango entre la concentración mínima efectiva (CME, concentración mínima en el plasma para que su acción farmacológica tenga valor terapéutico) y la concentración mínima tóxica (CMT, la mínima concentración del fármaco en el plasma capaz de inducir efectos tóxicos). Todo el tiempo en el cual la concentración del fármaco esté por encima de la CME, representa la duración del efecto farmacológico.

1.1.3. Vías de administración y acceso de fármacos a la sangre.

La vía de administración de un medicamento constituye el recurso que canaliza y facilita el ingreso del fármaco a un sistema vivo. Se define como el trayecto anatómico que se elige para incorporar el fármaco al organismo y dirigirlo hasta su diana celular a partir de una forma farmacéutica específica. De esta manera, la ruta o camino a seguir hasta el torrente sanguíneo depende de la vía de administración que se utilice; la cual, condicionará a su vez las características de las barreras que debe atravesar el fármaco para llegar a la sangre, siendo la complejidad de estos estratos biológicos los que constituyan el contexto sobre el que se desarrollaran todos los procesos inherentes a su absorción y Biodisponibilidad.

1.1.3.1. Clasificación.

Existen diferentes vías por las cuales se puede realizar la administración de medicamentos, sin embargo; la clasificación más general las divide de acuerdo al sitio de aplicación, en vías parenterales y enterales.

-Vías Parenterales.

La administración parenteral consiste en la conducción del fármaco por cualquier otra vía diferente al tracto gastrointestinal (TGI), es decir; se evita el acceso a través del tubo digestivo. Comprende la inyección, inhalación y la aplicación en piel y mucosas.

-Vías Enterales.

La vía enteral o entérica es la más antigua y refiere la administración directa del fármaco en cualquier parte del TGI aprovechando sus características fisiológicas. Dentro de esta clasificación se encuentran la vía rectal, sublingual y oral.

Como ya se mencionó previamente, sólo los fármacos que se administran por la vía intravenosa alcanzan una dosis intacta en la circulación

sanguínea al no depender del proceso de absorción ni de los factores que pueden alterarla; por ende; esta vía es la elección en situaciones críticas al distribuirse inmediatamente hasta el punto donde se lleva a cabo un efecto farmacológico en su sitio de acción. Al contrario, en las demás vías de administración extravasculares, este acceso no se produce de manera directa, el fármaco presenta un tránsito específico por el organismo siendo imprescindible la absorción, es decir; tiene que a travesar diversas barreras biológicas, desde el lugar de la aplicación hasta la sangre si se necesita generar una acción sistémica. De este modo el término absorción solo es adaptable a vías de administración extravasculares.

En suma, cuando se administra un fármaco en el organismo resulta fundamental el proceso de absorción, la vía de administración idónea de un medicamento pretende que el fármaco pueda superar exitosamente numerosas barreras biológicas y alcanzar una concentración adecuada en sangre antes de llegar a su sitio de acción. No obstante, su versatilidad impone características que determinan cambios en dicho proceso.

1.1.3.2. Administración oral.

Pese a la enorme innovación en el campo de la tecnología de administración de fármacos, la vía oral sigue siendo la forma habitual y natural para administrar fármacos con mayor incidencia de uso. Alrededor del 80% medicamentos más vendidos son formas farmacéuticas de administración oral donde coinciden las formas sólidas y líquidas (polvos, granulados, cápsulas, tabletas, grageas, soluciones, suspensiones, emulsiones, gotas, jarabes entre otras).^{16,17}

¹⁶ P. Wagh, Milind and Patel S., Jatin. *Biopharmaceutical Classification System: Scientific Basis Biowaiver Extensions*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2010, 2 (1), 12-19.

¹⁷ Aiache, J. M.; Devissaguet, J. P. y Guyton-Hermann, A.M. *Biofarmacia*. Ed. El Manual Moderno. México. 1983.

En general, la mayor aceptación que tiene la administración oral se explica por los múltiples beneficios que brinda en razones de conveniencia y practicidad para el paciente ya que caracteriza una manera cómoda, natural, no invasiva, segura, fácil y económica (desde un punto de vista tecnológico) para ingresar el fármaco al organismo, además de ser unipersonal y adecuada para el cumplimiento de la terapia en el tratamiento crónico en comparación con la administración intravenosa. Sin embargo, esta modalidad de administración también plantea una serie de inconvenientes y desventajas que representan un reto para el desarrollo farmacéutico y la eficacia terapéutica del fármaco *per se*. De modo que si se necesita un efecto sistémico rápido, la vía oral no es la opción de primera elección puesto que precisa como requisito una adecuada absorción intestinal, es decir; el paso de moléculas de fármaco desde el lumen del intestino hacia el torrente sanguíneo a través de una barrera fisiológica, la membrana plasmática de los enterocitos.

Además, este proceso es el resultado de una compleja secuencia de eventos determinados a su vez por diversos factores que, generalmente; intervienen en su desarrollo óptimo debido a que pueden dar origen a la pérdida presistémica de fármaco y resultar en una absorción errática o incompleta. Por ejemplo, algunos fármacos son modificados y corren el riesgo de inactivación y eliminación ya sea por efecto de los jugos gástricos, enzimas digestivas, microorganismos luminales, por el gradiente de pH existente a lo largo del TGI o bien; por la acción combinada o propia de los procesos de secreción y metabolismo que tiene lugar fundamentalmente en el intestino e hígado a nivel celular (enterocitos y hepatocitos respectivamente).

El grado de interacción entre todos estos elementos y factores en definitiva han demostrado controlar tanto la cantidad como la velocidad de la dosis que finalmente se absorbe en la circulación sistémica; condición que se concreta en una absorción parcial y, por lo tanto; en una menor Biodisponibilidad del fármaco.

Es por ello que entonces se hace necesario detallar y analizar el recorrido del fármaco en función de la administración oral, describiendo anatómica y fisiológicamente el escenario del proceso de absorción así como la manera en que se interrelacionan sus múltiples elementos y factores determinantes.

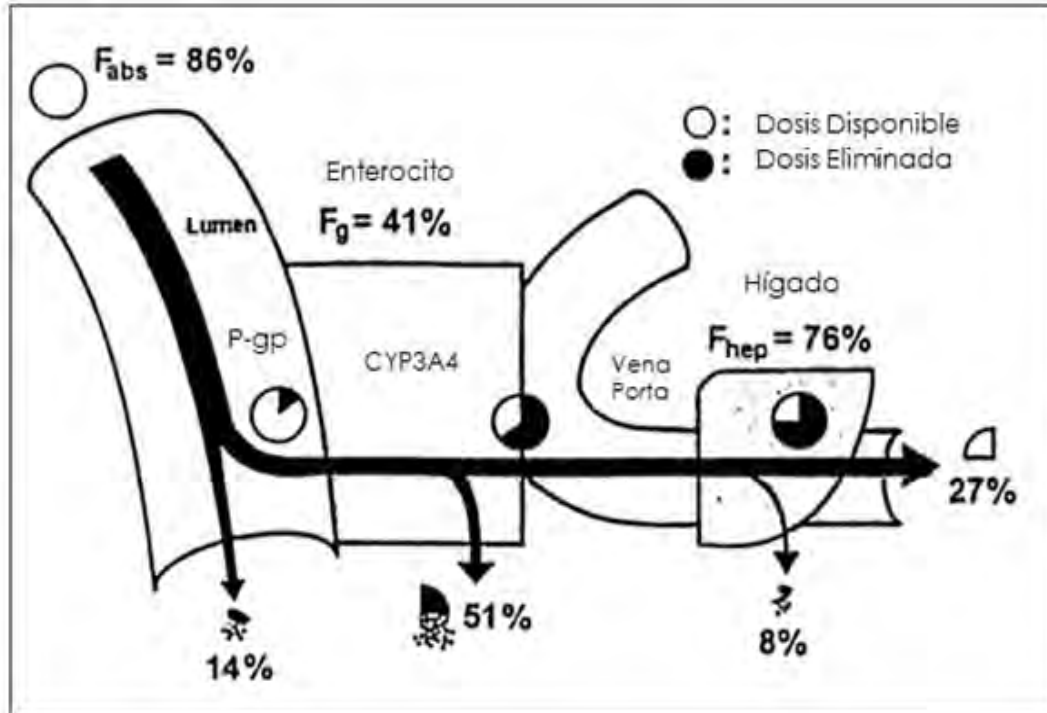


Fig.4. Diagrama esquemático que representa los diversos procesos que conducen a un 27% de Biodisponibilidad de Ciclosporina (Sandimmune) después de una dosis oral. Los valores porcentuales en la parte inferior de la figura indican la fracción promedio de la dosis perdida en cada uno de los procesos, es decir; 14% de la dosis no es absorbida debido al transportador de eflujo o contraflujo P Glicoproteína, 51 % del fármaco se metaboliza en los enterocitos de la pared del intestino y sólo el 8% se pierde debido al metabolismo hepático de primer paso. Imagen modificada de: Benet, L.Z., Wu, C.-Y., Hebert, M.F. and Wachter, V.J. *Intestinal drug metabolism and antitransport processes: A potential paradigm shift in oral drug delivery*. Journal. Control. Rel. 1996, 39, 139–143.

1.2. Proceso de absorción en la administración oral.

En el caso de la administración oral, la absorción de un fármaco se compone de varios procesos que, atendiendo a su análisis; se pueden descomponer temporalmente en distintos pasos o etapas conforme al desarrollo normal del proceso. Conceptualmente, se trata de determinados factores de pérdida presistémica también llamados efectos de pérdida presistémicos inherentes a las propiedades fisicoquímicas del fármaco y al sustrato biológico gastrointestinal que pueden desencadenarse antes de la absorción (pérdidas de absorbabilidad), durante y después de la absorción (efectos de primer paso), relacionados con la mayor o menor estabilidad de los fármacos en el trayecto que comprende desde su liberación y disolución en el fluido gástrico hasta su paso mediante mecanismos de transporte por intestino e hígado antes de llegar a la circulación sistémica en corazón.¹⁸

1.2.1. Liberación.

Desde una perspectiva deductiva y como punto de partida, se requiere la colocación del medicamento en boca, deglución a través del esófago y arribo al estómago. Una vez en estómago, es una regla general que para que el fármaco esté en disposición de absorberse, primero se debe desintegrar y disolver en el mismo instante en el que la forma farmacéutica entra en contacto con los líquidos gastrointestinales, de manera que prácticamente todos los fármacos deben de hallarse cedidos de la forma farmacéutica que los contiene y disueltos para que puedan posteriormente difundir y desplazarse a través del entorno acuoso desde el lugar de disolución hacia las membranas absorbentes.

De acuerdo con la estructura anterior, el proceso de liberación puede desglosarse en 3 subprocesos principales: *desagregación y/o disgregación* de la forma farmacéutica, *disolución* del fármaco en el medio gastrointestinal y por último *difusión* hacia el lugar de absorción.

¹⁸ Doménech Berrozpe, José. et. al. *Biofarmacia y Farmacocinética* Vol.II. Editorial Síntesis. 2008.

No obstante; cabe señalar que existen varias diferencias en la sucesión de estos subprocesos, concernientes a la forma farmacéutica en cuestión.

En el caso de una solución, la fase de liberación se simplifica ya que el fármaco únicamente difunde hacia la membrana gastrointestinal y su forma no ionizada pasará libremente a través de ella produciéndose de esa forma su absorción.

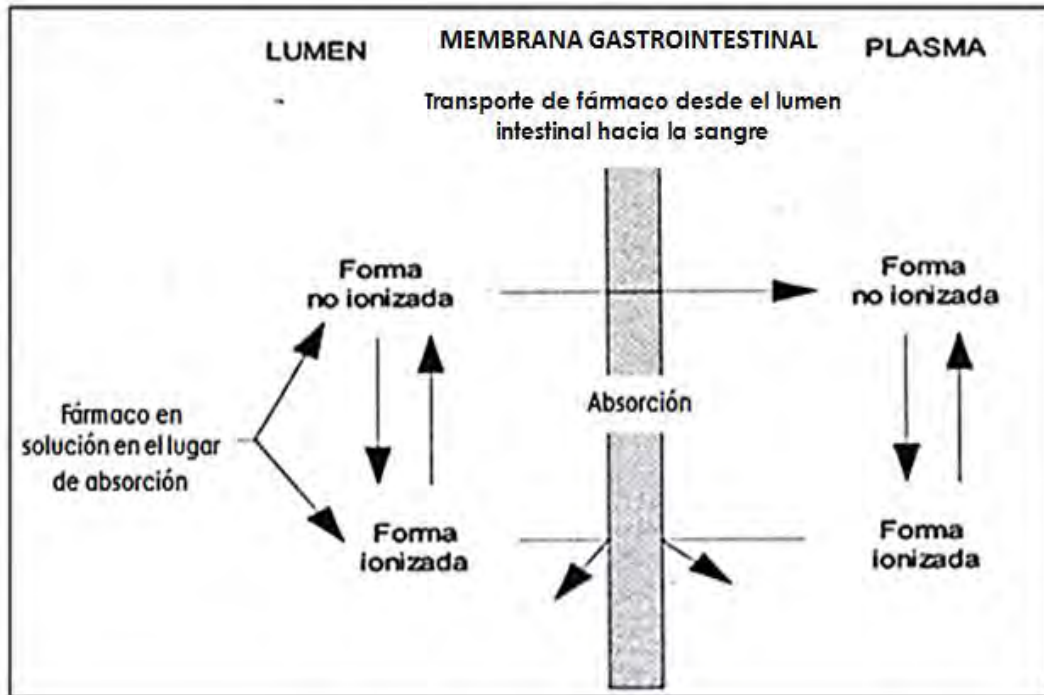


Fig.5. Representación grafica de los diferentes pasos que intervienen en el proceso de liberación cuando el fármaco se encuentra en solución. Imagen modificada de: Doménech Berrozpe, José. et. al. *Biofarmacia y Farmacocinética* Vol.II. Editorial Síntesis. 2008.

En contraste, si el fármaco se presenta en una forma farmacéutica sólida, en primer lugar se producirá una desagregación en gránulos o agregados; posteriormente, una disgregación en partículas finas y a continuación, la dispersión dando paso a la disolución del fármaco en el líquido gástrico, por último; la difusión de las moléculas hacia la membrana de absorción cuya forma no ionizada pasará libremente a través de la membrana gastrointestinal como en el caso anterior.

Así, las formas sólidas se desintegran, disuelven y difunden mientras que las formas farmacéuticas líquidas ya se administran en condición de

disolución en el lumen gástrico de modo que están disponibles inmediatamente para su absorción y transporte.

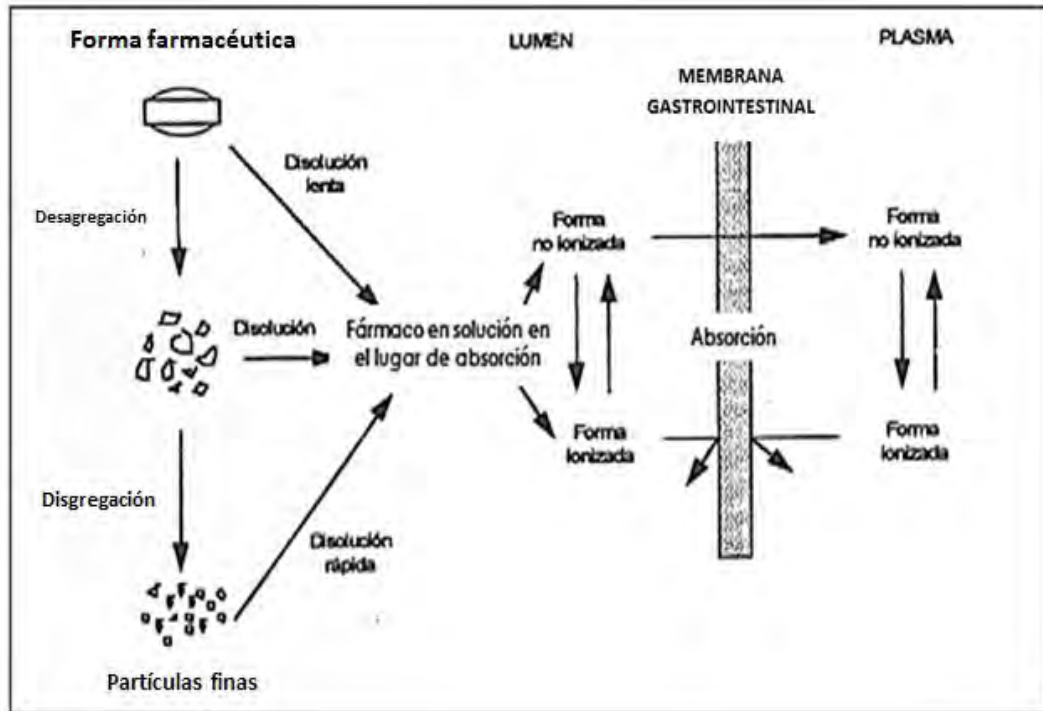


Fig.6. Representación gráfica de los diferentes pasos que intervienen en un proceso de liberación, cuando el fármaco se administra en una forma farmacéutica sólida, por ejemplo tabletas. Imagen modificada de: Doménech Berrozpe, José. et. al. *Biofarmacia y Farmacocinética* Vol.II. Editorial Síntesis. 2008.

1.2.1.1. Desagregación y Disgregación.

La desagregación, es el primer paso en la absorción de fármaco y se trata de la fragmentación de la forma farmacéutica en partes más pequeñas o hasta gránulos al hacer contacto con un medio disolvente, generalmente el jugo gástrico. Por su parte la disgregación establece la reducción de los gránulos formados en partículas finas aún más pequeñas.

1.2.1.2. Disolución.

Después de que la forma farmacéutica queda fragmentada en partículas pequeñas, el fármaco debe disolverse hasta un estado molecular en el fluido gastrointestinal. Este proceso comporta convertir el fármaco en un soluto dispersado homogéneamente entre las moléculas del disolvente que, hasta aquel momento, era un sólido contenido en una forma agregada.

-Factores que afectan la disolución.

La disolución de los fármacos está influenciada por numerosos factores que afectan directamente su velocidad, los cuales; pueden clasificarse en 2 grandes categorías.

I. Factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco.

Los factores más importantes son los relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco, dado que estas asumen un papel primario en el control de la disolución desde la forma farmacéutica que los contiene. En este sentido, la solubilidad del fármaco es uno de los factores principales.

⊗ Factores que afectan la solubilidad del fármaco.

- Estado químico: Ácido libre, Base libre, Formación de sales o ésteres.
- pH que junto con su pKa; determinarán el grado de ionización molecular.
- Estado físico: Forma amorfa o cristalina (polimorfismo), Forma anhidra o hidratada (solvatación), Formación de Complejos, Dispersiones sólidas y mezclas eutécticas.

⊗ Factores que afectan el área disponible para la disolución.

- Forma y tamaño de partícula
- Área superficial efectiva de la partícula

II. Factores farmacotécnicos.

⊗ Factores dependientes de la formulación.

-Uso de Excipientes y Aditivos: Diluyentes, Desintegrantes, Aglutinantes, Compactadores y Agentes Granulantes, Lubricantes, Tensoactivos, Agentes viscozantes, Colorantes, Polímeros de recubrimiento entre otros.

⊗ Factores dependientes del proceso de fabricación relacionados con la naturaleza y tipo de la forma farmacéutica (soluciones, cápsulas, tabletas, etc.)

-Efecto de las condiciones de fabricación: Método de granulación, tamaño del gránulo y distribución, fuerza de compresión y humedad durante el proceso.

1.2.1.3. Difusión.

Una vez disueltas, las moléculas de fármaco que se encuentran en el lumen intestinal deben desplazarse hasta ponerse en contacto con el lugar de absorción (membrana absorbente).

Esta progresión, se regula mediante la difusión en el medio acuoso (fluido gastrointestinal). Se trata de un proceso de transporte pasivo proveniente de las moléculas en movimiento a favor de un gradiente de concentración.

1.2.2. Permeabilidad y transporte de fármaco a través de la membrana.

Siguiendo secuencialmente el camino del fármaco, cuando llega al lugar de absorción; es necesario su paso a través de membranas hacia el torrente sanguíneo para que tenga un efecto sistémico. De esta manera, la absorción es la verdadera entrada del principio activo en el organismo.

En el caso de la administración oral, la incorporación gradual de las moléculas de fármaco a la sangre se produce predominantemente en la región proximal del intestino delgado debido a la disposición de su extensa área superficial, a la existencia de fenómenos de difusión pasiva, a la especialización funcional de las células epiteliales (específicamente, enterocitos) que lo recubren en la mucosa y a las proteínas transportadoras que facilitan la absorción.

Dentro de este contexto, la primera barrera fisiológica que debe atravesar el fármaco es entonces la membrana de los enterocitos, siendo probablemente la más importante de ellas debido a que es una barrera selectiva y es considerada como la primera línea de defensa contra la entrada muchos xenobióticos. En consecuencia, el movimiento del fármaco a través de membranas celulares resulta un paso esencial en el proceso de absorción, el cual; en su forma más elemental se reduce a la interacción del fármaco con una membrana biológica.

Una de las propiedades que conjunta en gran medida esta interacción y el alcance del proceso mismo, es la permeabilidad del fármaco. La permeabilidad de absorción se define como la capacidad o velocidad de las moléculas en cuestión para transportarse a través de una membrana biológica (cm/seg o unidades equivalentes).

Esta propiedad, está estrechamente influenciada tanto por las características fisicoquímicas de la molécula de fármaco como de la naturaleza de la membrana. Específicamente, alcanza su más alto nivel de configuración en relación a la liposolubilidad ya que estando la membrana celular formada, en su gran mayoría por fosfolípidos, es lógico pensar que una sustancia pasará más fácil y rápido cuanto mayor sea su estabilidad en ellos.

-Factores que afectan la permeabilidad y transporte de fármacos.

Estos se pueden clasificar convenientemente en:

I. Factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas del fármaco.

-pka, pH, grado de ionización, tamaño y peso molecular, carga, coeficiente de partición lípido/agua, que determina su liposolubilidad.

II. Factores fisiológicos.

Al precisarse la absorción en el intestino, esta se ve influenciada por las propiedades mecánicas, anatómicas y fisiológicas del mismo.

⊗ Factores relacionados con el lugar de absorción.

-Vaciado gástrico, motilidad gastrointestinal, microflora bacteriana en la luz intestinal, presencia de alimentos, flujo sanguíneo, variación de pH gástrico e intestinal, tiempo de tránsito intestinal, sales biliares, tiempo de exposición e irrigación.

⊗ Factores biológicos relacionados con la unidad celular enterocito.

-Naturaleza y composición de la membrana

- Mecanismos de transporte

-Enzimas metabólicas.

En términos de velocidad, la disolución y permeabilidad del fármaco son considerados los pasos con mayor trascendencia para la posterior absorción debido a que dependiendo de la magnitud relativa de sus velocidades y factores, uno de ellos puede llevarse a cabo de manera más lenta y, por ende; ser considerado como el paso limitante de la velocidad de absorción total antes de que el fármaco aparezca en sangre.

De esta manera, los fármacos fácilmente solubles en agua tenderán a disolverse rápidamente, haciendo la membrana gastrointestinal el paso crítico de la velocidad de absorción debido a su habilidad limitada a la partición en las dos capas de las membranas de los enterocitos. Contrariamente, la velocidad de absorción de fármacos poco solubles en agua, será limitada por la velocidad de disolución del fármaco o la desintegración de la forma de dosificación ya que si el fármaco no se disuelve en el intervalo de tiempo que contempla el tránsito intestinal, simplemente será eliminado en las heces.

1.2.3. Eliminación presistémica.

Después de atravesar la membrana apical del enterocito usualmente por procesos pasivos (cuando el fármaco ya se ha absorbido pero antes de llegar a la circulación sistémica), las moléculas de fármaco pueden ser directamente absorbidas intactas o seguir 3 caminos posibles; experimentar un proceso de secreción activa o extrusión como resultado de la exposición a mecanismos de eflujo, metabolización por el complejo enzimático intracelular presente en esta célula, o bien; transferencia a través de la membrana basal hacia metabolismo en otras células que transita, fundamentalmente las del hígado, el cual; es alcanzado por el fármaco mediante la vena porta antes de llegar a la circulación sistémica.

El conjunto de estos procesos se suele agrupar bajo el concepto de eliminación presistémica y comprende propiamente 3 subprocesos: *Secreción intestinal*, *Metabolismo intestinal* y *Metabolismo hepático o efecto de primer paso hepático* que, desde el punto de vista

farmacocinético; son considerados como los principales determinantes que explican la baja Biodisponibilidad observada en algunos fármacos administrados por la vía oral a pesar de que su absorción gastrointestinal sea completa o superior.

1.2.3.1. Secreción y metabolismo intestinal.

-Secreción intestinal, eflujo mediado por transportadores.

El fenómeno de eflujo es atribuido principalmente a la acción mediada de transporte de una gran proteína de membrana glicosilada, la Glicoproteína P. Esta proteína, es la más estudiada y conocida respecto a los transportadores de fármacos en la membrana intestinal y es también la que más interesa desde el punto de vista de la disminución de absorción ya que puede transportar una gran variedad de fármacos con diversas estructuras y actividades farmacológicas de regreso o en contraflujo a la luz intestinal facilitando su eliminación.

En ciertos casos, este proceso de secreción genera la aparición de ciclos entero entéricos debido a que una vez expulsado el fármaco puede volver a entrar al organismo mediante procesos de recirculación. El más frecuente es la reabsorción intestinal donde el fármaco queda otra vez disponible para ser absorbido y/o metabolizado en segmentos posteriores del tracto o bien ser eliminado en las heces.

Cabe destacar que el eflujo en el enterocito no es solamente exclusivo de la Glicoproteína P, en los últimos años se han descubierto otras proteínas de transporte con características similares de eflujo, por tanto; se cree que en conjunto forman una barrera importante para la absorción intestinal de los fármacos sustrato.

-Metabolismo intestinal.

Además de la absorción y las funciones de eflujo, se ha demostrado que aunque el hígado es de hecho el sitio principal de metabolismo del

fármaco de primer paso, cada enterocito expresa en su interior proteínas enzimáticas con actividades metabólicas responsables de reducir la cantidad de fármaco que entra a la circulación lo que limita su absorción incluso cuando captación intestinal es eficiente.

Vinculado al concepto, el citocromo P450 (CYP450) es todo un complejo que comprende una gran familia de enzimas encargadas de la biotransformación oxidativa de fase I de una gran variedad de xenobióticos; específicamente; se han detectado en todas las membranas subcelulares siendo la mitocondria y el retículo endoplásmico las fuentes más importantes. Solo las familias 1, 2 y 3 (CYP1, CYP2 y CYP3) intervienen en la mayor parte de las biotransformaciones de fármacos, mientras que las demás familias son importantes en el metabolismo de compuestos endógenos, por ejemplo; esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, acidas biliares y otros xenobióticos, incluyendo contaminantes ambientales y muchos otros productos químicos sintéticos.¹⁹

En el caso de los enterocitos, aunque se sabe poco acerca de la distribución y la expresión de las enzimas CYP, se han detectado en su interior algunas isoformas que pueden metabolizar al fármaco antes de que salga a través de la membrana basolateral (lado de la sangre). La isoforma más habitual que se expresa es la CYP3A4 ya que representa un contenido promedio de aproximadamente 80% de las isoformas, seguida por la CYP2C9 con el 15%. Además, se encuentran otras isoenzimas con menos relevancia cuantitativa como la CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C10, CYP2E1 (trazas) y CYP2D6 mostrando una marcada variabilidad interindividual.^{20,21}

¹⁹ M.^a Villar Del Fresno, Ángel; Bermejo Bescós, Paloma y Martín-Aragón Álvarez, Sagrario. *Aspectos farmacológicos del citocromo P-450*. 2003, 361-365.

²⁰ Takano, Mikiyoshi; Yumoto Ryoko and Murakami Teruo. *Expression and function of efflux drug transporters in the intestine*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, 109 (1-2), 137-161.

²¹ Elefterios, Eugenia y Venizelos, Bezirtzoglou. *Intestinal cytochromes P450 regulating the intestinal microbiota and its probiotic profile*. *Microb. Ecol. in Health & Disease*. 2012, 23, 1-10.

Conjuntamente, se encuentran otros sistemas metabólicos intracelulares como las glucuroniltransferasas, N-acetiltransferasas, glutatióntransferasas sulfotransferasas y estereasas que son enzimas de fase II de conjugación.

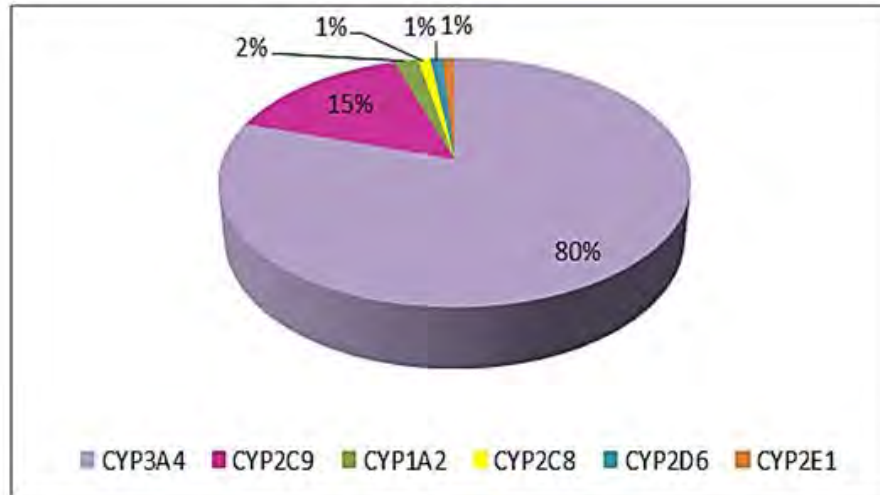


Fig.7. Distribución de los citocromos P450 intestinales.

Por mucho, la más prominente de estas enzimas de este sistema endógeno es la subfamilia CYP3A4 ya que a pesar de su baja concentración en el intestino en comparación con el hígado (alrededor del 1%) el conjunto de datos indica que el metabolismo intestinal de esta enzima puede contribuir a una extracción mayor que el metabolismo hepático para ciertos fármacos como la Ciclosporina, Midazolam, Nifedipino y Tacrolimus.

1.2.3.2. Metabolismo hepático. Efecto de primer paso.

Cuando el fármaco pasa a través de la membrana basolateral, la fracción absorbida que superó los procesos de secreción y metabolismo a nivel intestinal, es conducida hacia el hígado desde las venas capilares hasta las venas mesentéricas tributarias de la porta que drenan finalmente en el órgano (circulación porta hepática); donde está sujeta a un posterior metabolismo y/o excreción biliar a menudo por un sistema similar de enzimas presentes en el intestino.

Específicamente, los fármacos son removidos de la sangre portal en los hepatocitos a través de la membrana sinusoidal (basolateral) donde están expuestos a un ambiente rico en enzimas metabolizadoras, siendo susceptibles de sufrir la biotransformación más importante mediante múltiples isoformas enzimáticas del complejo CYP450 antes de llegar a corazón por medio de la vena hepática y alcanzar circulación sistémica. Por ende, la cantidad de fármaco que llegará inalterado a la circulación sistémica será inferior al administrado. A este proceso se le conoce como efecto de primer paso hepático.

Entre las principales isoenzimas metabolizadoras de fármacos presentes en los hepatocitos se encuentran CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A3, CYP3A5, CYP2D6, CYP2E1 y la CYP3A4. Estas isoenzimas son las más importantes en cuanto a que contribuyen al metabolismo oxidativo de más del 90% de los fármacos de uso clínico actual.²²

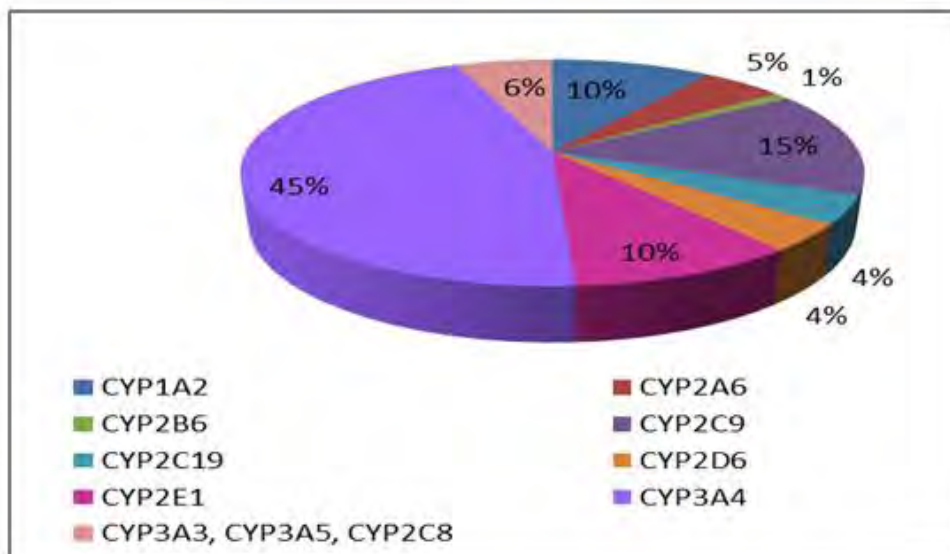


Fig.8. Principales isoformas CYP450 en el hígado.

En última instancia, los fármacos metabolizados o inalterados al pasar por el hígado pueden ser transportados por el hepatocito en la bilis a través

²² Gallego, Fernández Antonio, et.al. *Aspectos fundamentales del citocromo P450*. Serie Ciencias Biomédicas. ADEMÁS Comunicación Gráfica, 2010.

de la membrana canalicular donde sufren excreción biliar. La bilis se vierte en el intestino delgado, concretamente; en la zona duodenal y una vez ahí el fármaco puede reabsorberse si sus propiedades le permiten franquear la barrera intestinal y volver a la circulación comenzando de nuevo el ciclo denominado *enterohepatico* o bien ser excretado en las heces.

Los fármacos que llegan a la circulación sistémica después de su paso por el hígado, se encontrarán con los riñones, que están adaptados para la excreción activa de los productos de desecho.



Fig.9. Representación gráfica donde se resume los diferentes pasos secuenciales que intervienen en el proceso global de la absorción gastrointestinal, cuando el fármaco se administra de manera oral en una forma farmacéutica sólida. Imagen modificada de: Herrera Ruiz, Dea, et.al. *Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos*. Rev Mex Cienc Farm 2012, 43 (1).

En síntesis, la absorción oral comprende múltiples etapas que se desarrollan al paso del fármaco a través de tracto gastrointestinal. Estas etapas se pueden puntualizar como desintegración, disolución, difusión del fármaco hasta su lugar de absorción, permeabilidad y transporte a través de la membrana del enterocito, eflujo activo del fármaco, metabolismo en el enterocito y metabolismo en el hígado.

Al respecto, además de factores como la solubilidad acuosa, velocidad de disolución, la estabilidad en pH y la estabilidad enzimática; el paso del fármaco en términos de permeabilidad y sistemas de transporte a través de las membranas biológicas es de crucial importancia para concretar la absorción asegurando su paso a sangre. Estos dos factores dependen a su vez mayoritariamente de la afinidad entre el fármaco, el medio ambiente que lo rodea, y fundamentalmente; de la composición de la membrana ya que esta última constituye la barrera biológica universal sosteniendo así una estrecha e importante relación con la farmacocinética al definir el desplazamiento e interacción de una molécula en el organismo.

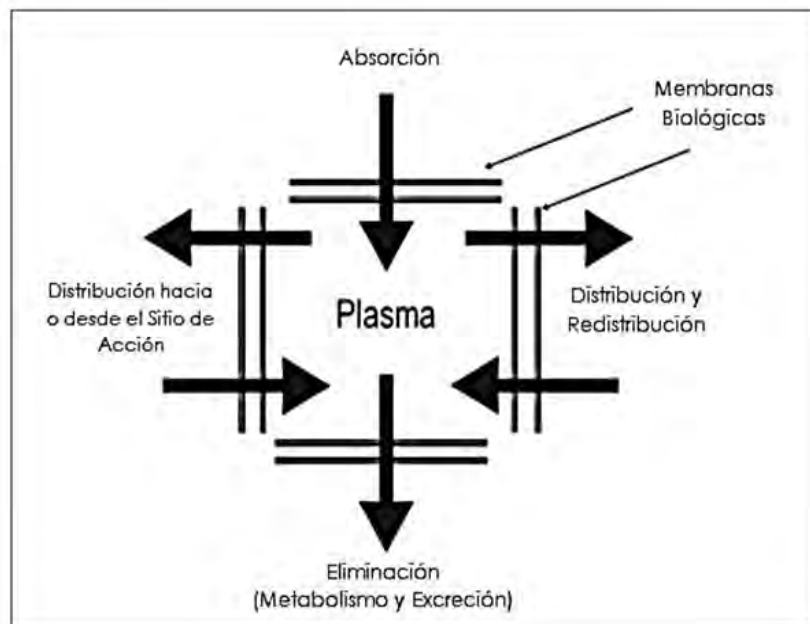


Fig.10. Sitios de tránsito en la membrana en el contexto de la Farmacocinética. Los fármacos deben pasar una o más membranas durante la absorción, distribución, metabolismo y excreción. Imagen modificada de: E. Rosenbaum, Sara. *Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: An Integrated Textbook and Computer Simulations*. John Wiley & Sons. 2011.

1.3 Membranas Biológicas.

Las células procariotas y eucariotas comparten al menos una estructura básica en común; todas están rodeadas por una *membrana plasmática* que las delimita y recubre del ambiente exterior como unidades autónomas. En el caso de las procariotas, esta estructura está confinada solamente a la barrera externa que rodea a las células, mientras que en las eucariotas; es también responsable de la compartimentalización interna (membranas de orgánulos).

De este modo, la membrana plasmática es considerada una estructura compleja y heterogénea esencial en la vida de la célula, ya que estando inmersa en un universo de sustancias químicas; sus diferentes componentes deben interactuar de múltiples maneras y desempeñar funciones perfectamente definidas que cambian de manera dinámica en respuesta al ambiente que las rodea.

Dependiendo del tipo de organismo y del tipo de célula; cada membrana biológica tiene un complemento único de lípidos y proteínas relacionadas con las distintas funciones básicas y especializadas que necesite realizar. No obstante, a pesar de esta versatilidad, se ha demostrado que la unidad estructural de membrana es consistente en todas ellas, lo que significa que muchas de sus funciones celulares se pueden generalizar de la siguiente manera:

- Ⓢ Define los límites externos de la célula. Aísla selectivamente el contenido de la célula del ambiente externo.
- Ⓢ División en compartimentos. La membrana plasmática encierra el contenido de sus organelos.
- Ⓢ Barrera con permeabilidad selectiva. Posee proteínas de transporte como los principales factores que regulan el intercambio de sustancias indispensables entre el interior de la célula y el ambiente externo así como en sus compartimentos (transporte de solutos y xenobióticos).
- Ⓢ Establecer comunicación e interacción intra e intercelular.

1.3.1. Estructura y organización de la membrana.

Modelo del Mosaico Fluido.

En 1972 S. Jonathan Singer y Garth Nicolson desarrollaron el modelo del mosaico fluido, el cual; es el modelo estructural más aceptado que hasta ahora ha dominado como el dogma central de la biología de la membrana. Según este modelo, una membrana vista desde arriba semeja un mosaico grueso de azulejos que se encuentra en constante movimiento con la fluidez propia de los aceites donde cada uno de los fosfolípidos puede moverse en diversos sentidos dentro del plano de la membrana formando la matriz combinada a su vez con una variedad de proteínas insertadas equiparables con el aspecto de “azulejos”.

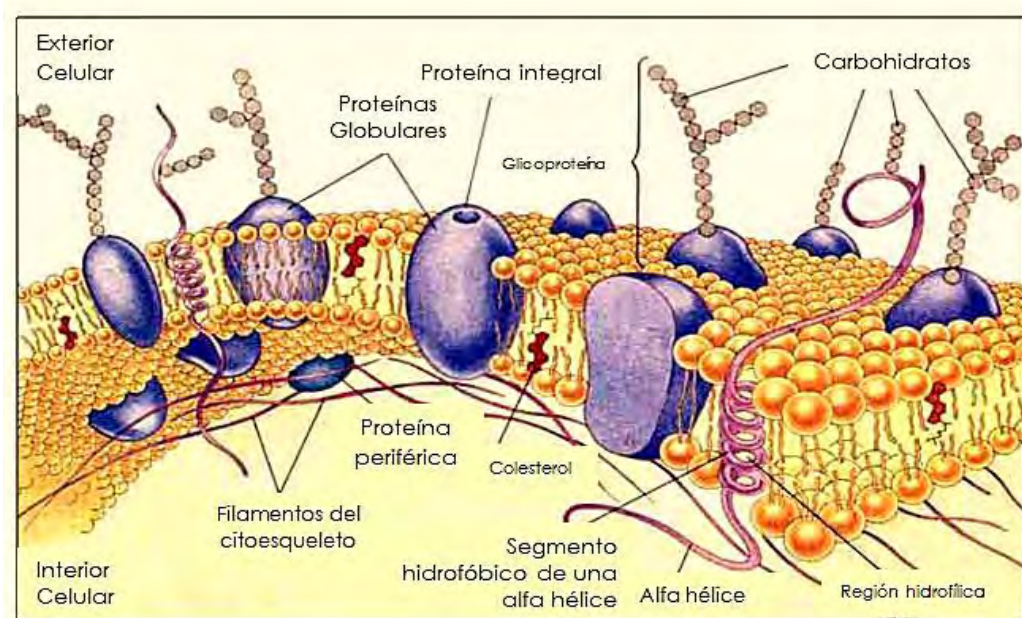


Fig.11. Estructura de membrana. Modelo del mosaico fluido. Las membranas biológicas consisten en proteínas anfipáticas embebidas en una bicapa lipídica de naturaleza también anfipática. Se muestra la ubicación de glicoproteínas como elementos transmembrana. Imagen modificada de: <http://ciencias.blogspot.mx/2013/01/andamiaje-enzimatico.html>.

En general, se mantuvo la estructura de bicapa lipídica básica de modelos previos en donde la parte polar de los lípidos, en su mayoría fosfolípidos; se encuentra orientada en el exterior y la cadena de ácidos grasos en el interior confiriendo naturaleza hidrofóbica al núcleo central, sin embargo; proyectó a las proteínas de una forma completamente diferente, no como capas finas sobre la superficie de la membrana, sino como entidades

globulares discretas que pueden estar asociadas parcial o totalmente en la bicapa fosfolipídica basándose en su afinidad relativa por el interior hidrofóbico de esta última. Además, distingue que algunas proteínas, incluso pueden desplazarse lateralmente por los lípidos distribuyéndose en forma irregular y asimétrica a lo largo de la membrana, cualidad que distingue a una membrana de otra.

1.3.2. Componentes de la membrana.

La estructura de mosaico de una membrana depende de sus lípidos, proteínas y carbohidratos los cuales varían en estructura y función.

De acuerdo con el modelo del mosaico fluido de estructura de membrana, esta posee básicamente ensambles de sus tres componentes principales: lípidos, proteínas y carbohidratos, sin embargo; si se comparan membranas de distintos tipos celulares, se pueden encontrar diferentes clases de lípidos y, en particular, diferente cantidad y tipo de proteínas y glúcidos. Estas diferencias en cada uno de los componentes, le confieren propiedades especiales a cada tipo de membrana de distintas células y organelos que se relacionan con las funciones que cumple cada uno de ellos.

1.3.2.1. Lípidos.

Las membranas, poseen una gran diversidad de lípidos en diferentes proporciones, sin embargo; todos poseen una característica en común, todos son anfipáticos; esto significa que contienen en su molécula regiones hidrofílicas o polares e hidrofóbicas o no polares. Los lípidos representan un material estructural dinámico, fluido y adaptable para los componentes de la célula desempeñando la función aislante de las membranas, es decir; se presentan como una barrera que previene los movimientos aleatorios de materiales hidrosolubles hacia adentro y fuera de la célula, además; de servir como soporte estructural de la membrana.

Se distinguen tres tipos principales de lípidos: fosfolípidos o fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol.

-Fosfolípidos

Los lípidos son moléculas grandes compuestas de glicerol y tres cadenas de ácidos grasos (triglicéridos). Si una de las 3 cadenas es reemplazada por un grupo fosfato se convierte en un fosfolípido o fosfoglicérido. En este sentido, un fosfolípido es una molécula con dos cadenas formadas por ácidos grasos saturados o insaturados que contienen un armazón de glicerol y un grupo fosfato. A diferencia de los triglicéridos, los fosfolípidos tienen dos regiones con propiedades muy diferentes: el extremo que contiene el grupo fosfato, posee un carácter hidrofílico neto (cabeza polar) y el otro extremo compuesto por las dos colas no polares de ácidos grasos muestra un carácter hidrófobo.

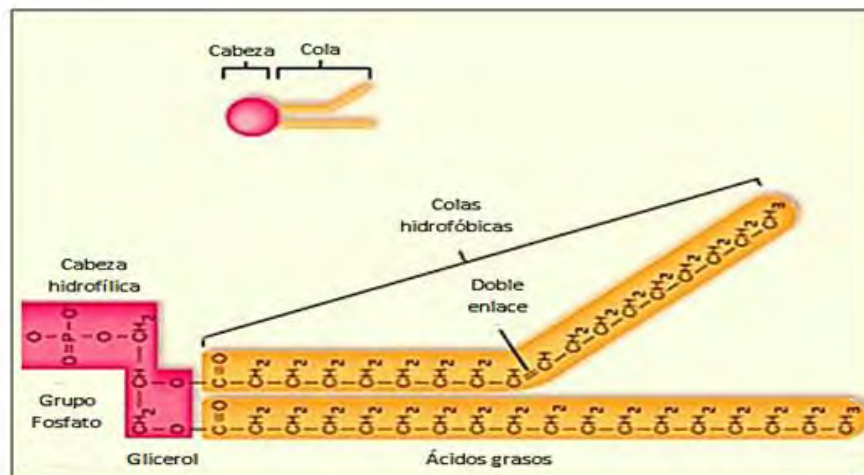


Fig.12.Estructura de un fosfolípido .Una cabeza polar y dos colas de ácidos grasos no polares. Imagen modificada de: <http://www.anatomiahumana.ucv.cl/biologia/top4.html>

En la mayoría de las membranas, los fosfolípidos no se presentan bajo su estructura básica; tiene grupos adicionales conjugados con el fosfato que por lo general son colina, etanolamina, serina o inositol siendo los principales la fosfatidiletanolamina o cefalina y la fosfatidilcolina o lecitina.

- Ⓢ Fosfatidiletanolamina (FE)
- Ⓢ Fosfatidilserina (FS)
- Ⓢ Fosfatidilcolina (FC)
- Ⓢ Fosfatidilinositol (FI)
- Ⓢ Cardiolipina (DFG)

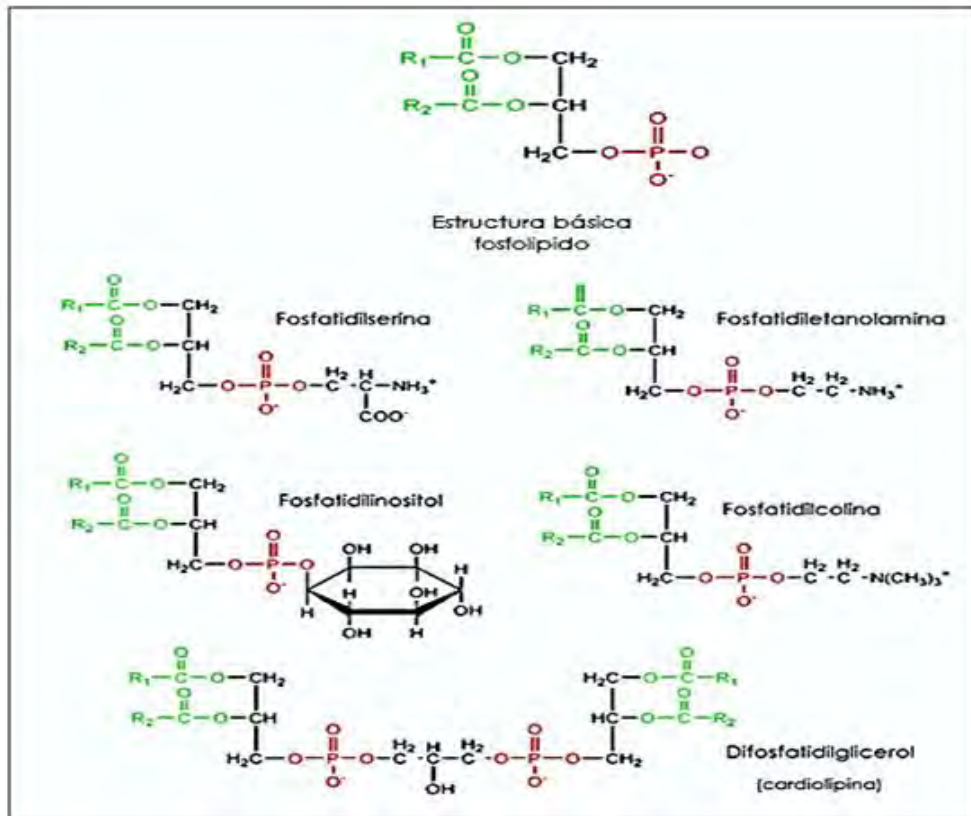


Fig.13. Estructuras moleculares de los diferentes tipos de fosfolípidos que se pueden encontrar en la membrana. Imagen modificada de:
http://www.uib.es/facultat/ciencias/prof/josefa.donoso/campus/modulos/modulo8/modulo8_1.html

Es importante mencionar que en el arreglo de membrana no existen uniones covalentes entre los lípidos, de manera que la estabilidad de las bicapa está dada por interacciones hidrofóbicas entre sus cadenas hidrocarbonadas, o bien; por fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas y puentes hidrogeno entre las cabezas polares de los lípidos, ya sea entre ellos mismos o con las moléculas de agua de los medios extra e intracelular. Esta característica de *uniones débiles* hace que la membrana sea simultáneamente una estructura estable y fluida.

Asimismo, el hecho de que uno de los grupos acilo de los ácidos grasos este insaturado y el otro no, aumenta la fluidez de la membrana, debido al “quiebre” de su cadena a la altura de los dobles enlaces. Esto impide, o al menos dificulta; que las colas se compacten, restringiendo las interacciones entre ellas y garantiza también una buena fluidez dentro del rango de temperaturas fisiológicas.

-Esfingolípidos

Se encuentran una clase menos abundante de lípidos en la membrana, los esfingolípidos, los cuales; son estructuras complejas que derivan de la esfingosina, un alcohol amino insaturado que contiene una larga cadena de hidrocarburos (18 carbonos aproximadamente) unida a un ácido graso mediante su enlace amino formando así una molécula de ceramida (esfingolípido =ceramida = esfingosina + ácido graso).

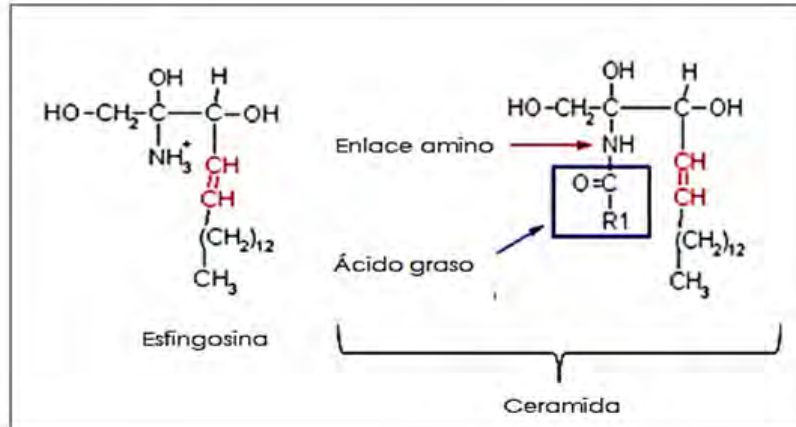


Fig.14. Estructura básica de un esfingolípido. Imagen modificada de: http://www.uib.es/facultat/ciencias/prof/josefa.donoso/campus/modulos/modulo8/modulo8_1.html

Del mismo modo que lo fosfolípidos, los esfingolípidos también poseen grupos adicionales esterificados con el alcohol amino terminal de la fracción de esfingosina, dividiéndose en dos tipos principales.

Cuando las ceramidas se combinan con fosforilcolina, la molécula es una esfingomielina (esfingolípidos más comunes) y si el sustituyente es un carbohidrato, la molécula es un glucoesfingolípido o, simplemente glucolípido. A su vez, los glucoesfingolípidos se dividen en cerebrósidos y gangliósidos atendiendo a si el carbohidrato es un azúcar simple o un oligosacárido respectivamente.

- Ⓢ Esfingomielina
- Ⓢ Glucoesfingolípido
 - Azúcar simple (cerebrósido)
 - Oligosacárido (gangliósido)

Los cerebrósidos poseen principalmente glucosa, galactosa y sus derivados como N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina, mientras que los gangliósidos son el grupo más complejo de los esfingolípidos ya que contienen una o más unidades de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) en su estructura.

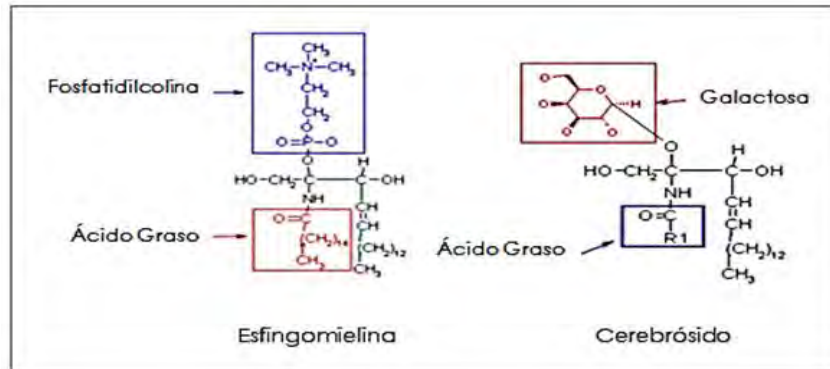


Fig.15. Estructura de un Cerebrósido. Imagen modificada de:

http://www.uib.es/facultat/ciencias/prof/josefa.donosocampus/modulos/modulo8/modulo8_1.html

-Colesterol.

El principal esteroide de las membranas es el colesterol y es el más pequeño y menos anfipático en comparación con otros lípidos de membrana. Se dispone con el grupo hidroxilo hacia el exterior de la célula (ya que ese hidroxilo interactúa con el agua). Las moléculas de colesterol son un factor importante en la fluidez y permeabilidad de la membrana; los anillos hidrófobos son planos y rígidos lo que interfiere con los movimientos de las colas de ácido graso de los fosfolípidos, además; ocupa los huecos dejados por otras moléculas confiriendo mayor rigidez y menor permeabilidad.

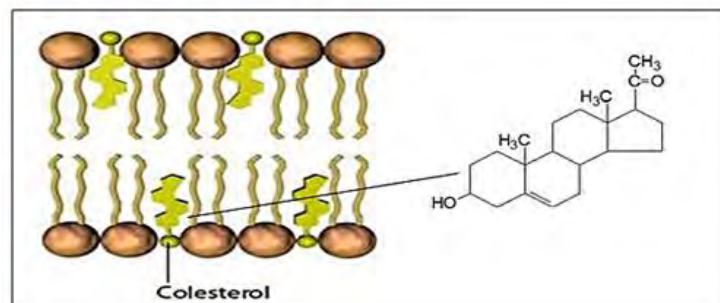


Fig.16. Colesterol en la membrana, las moléculas se disponen con su grupo hidroxilo hacia la superficie de la membrana y el resto de la molécula referente a los anillos planos permanece incrustada en la bicapa lipídica inmovilizando las cadenas de los fosfolípidos. Imagen modificada de: http://www.wikillerato.org/La_membrana_plasmatica.html

1.3.2.2. Proteínas.

Mientras que los lípidos ejercen principalmente una función estructural, las proteínas no sólo desempeñan esta labor de soporte; además, son las macromoléculas que determinan el grado de especialización celular siendo responsables de las funciones dinámicas específicas y esenciales de las membranas biológicas.

Miles de proteínas en extremo diversas en su conformación de aminoácidos y estructura, están incrustadas en la bicapa fosfolipídica de la membrana o unidas a ella en su superficie. En relación a la manera en el que se asocian y se localizan las proteínas en la bicapa de fosfolípidos, se reconocen dos tipos principales de proteínas de membrana:

- ⊕ Proteínas integrales o intrínsecas.
- ⊕ Proteínas periféricas o extrínsecas.

-Proteínas integrales.

Las proteínas integrales, son proteínas transmembranosas que se encuentran embebidas en la bicapa lipídica; esto es que en su conformación primaria tienen al menos uno o más segmentos polipeptídicos o dominios que atraviesan completamente la membrana celular, además; los dominios transmembrana están flanqueados por regiones hidrofílicas que sobresalen por ambos lados de la misma, tanto en el medio extracelular como citoplasmático. Por tanto, en ellas se pueden distinguir tres dominios principales:

-Dominio transmembrana (TMD): También llamado dominio integral de membrana, atraviesa la membrana con residuos hidrofóbicos introduciéndose como una hélice alfa dextrógira que en su extensión interactúa con los lípidos de la bicapa lipídica uniéndose a ella.

-Dominio citosólico: En contacto con el interior celular (citosol). Residuos de naturaleza hidrofílica.

-Dominio externo: En contacto con el exterior de la célula. Residuos de naturaleza hidrofílica.

Desde el punto de vista estructural los dominios transmembrana mantienen a la proteína en su sitio anclada y alineada a la membrana debido a la afinidad e interacción de su estructura continua de residuos hidrofóbicos con el interior hidrofóbico de los ácidos grasos en el ambiente de la bicapa lipídica. Estos dominios, contienen secuencias que en la mayoría de los casos consisten en una cadena de 20 a 30 aminoácidos consecutivos de predominio no polar que adoptan una orientación especial definida por una estructura secundaria de alfa hélice helicoidal, la forma más común y termodinámicamente estable para que la cadena polipeptídica cruce la bicapa lipídica. También, se suelen presentar casos en los que el dominio transmembrana está formado por un barril beta.

Como resultado de este arreglo estructural, las interacciones hidrofóbicas sellan a la proteína dentro de la pared de lípidos de la membrana, de modo que no pueden extraerse sin destruir la bicapa mediante el uso de agentes tensoactivos conservándose así la barrera semipermeable donde la proteína queda en contacto directo con las moléculas de líquido circundantes.

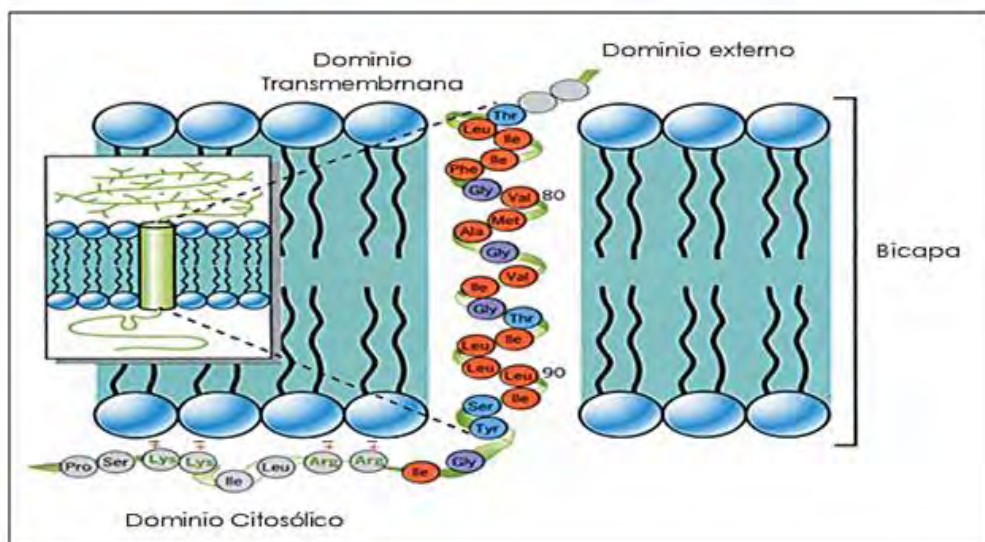


Fig.17. Una proteína integral con un solo dominio transmembrana. La hélice alfa que pasa por la membrana consiste sobre todo en residuos hidrofóbicos como leucina isoleucina, valina, alanina. Los cuatro aminoácidos con carga positiva del dominio citoplasmático de la membrana forman enlaces iónicos con los grupos cabeza de los lípidos que tienen cargas negativas para estabilizarse. Imagen modificada de: Karp, Gerald. *Biología Celular y Molecular*. McGraw Hill Interamericana, 4ª Edición. México, 2007.

En términos estructurales, existen muchos tipos de proteínas integrales en función del número de veces que atraviesen la membrana, las que tienen un segmento transmembrana, atraviesan la membrana una sola vez y se denominan proteína de paso único o unipaso mientras que las que atraviesan la membrana varias veces (hasta 17 hélices alfa), se llaman proteínas multipaso, las cuales; poseen varias regiones hidrofóbicas insertadas en la matriz de la membrana alternadas con segmentos hidrofílicos que los conectan entre sí exponiéndose hacia los medios acuosos.

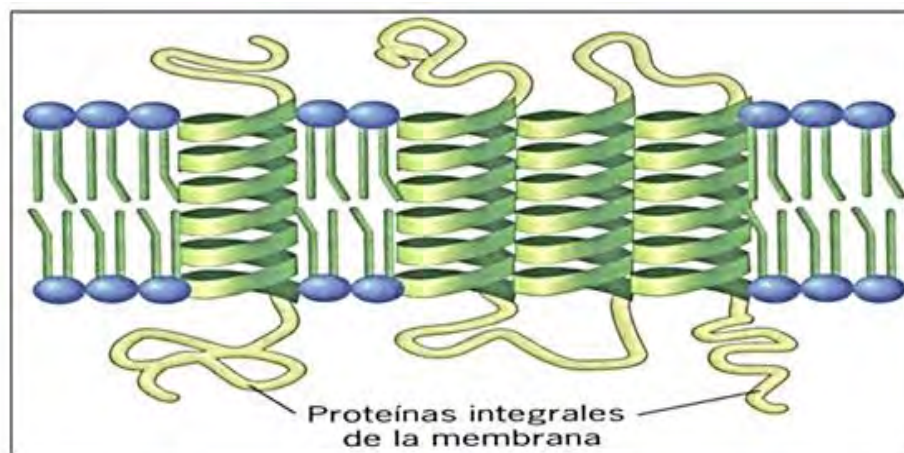


Fig.18. Por lo general las proteínas integrales tienen una o más hélices. Las regiones hidrofóbicas residen en el interior de la membrana mientras que las regiones hidrofílicas sobresalen a cada lado de la misma. Imagen modificada de: Karp, Gerald. *Biología Celular y Molecular*. McGraw Hill Interamericana, 4ª Edición. México, 2007

Asimismo, funcionalmente hay varios tipos de proteínas integrales, algunas son proteínas de transporte que actúan como barreras de permeabilidad selectiva con papeles críticos al regular el intercambio de sustancias o controlar la frecuencia de paso de cierto tipo de moléculas hacia el interior y hacia el exterior de la misma como las proteínas de canal en donde las alfa-hélices no están alineadas sino que están agrupadas para formar poros acuosos interiores, los cuales; proporcionan vías de paso hidrofílicas permitiendo a determinados iones y otras moléculas solubles en agua atravesar la membrana, a las que no se unen específicamente.

Otras proteínas de transporte llamadas proteínas portadoras o acarreadoras, tienen sitios de unión que pueden interactuar

específicamente con la molécula que transportan, tras lo cual sufren un cambio conformacional (complejo molécula-proteína) que permite que dichas moléculas se desplacen libres al otro lado de la membrana. Estas moléculas pueden ser polares (aminoácidos, azúcares, nucleótidos, etc.) o de carácter iónico. El transportador permanece inalterado tras el proceso.

En esta categoría también se encuentran las ATPasas, las cuales; utilizan energía ATP para bombear solutos o iones a través de las membranas. Estas proteínas son las que más interesan desde el punto de vista de la absorción puesto que están implicadas en los mecanismos especializados de eflujo.

Algunas más son receptoras, encargadas del reconocimiento y unión de moléculas señalizadoras que vienen del exterior de la célula ya que cada tipo de estas proteínas tiene una forma tal que permite a una molécula específica unirse con ella. Las hormonas neurotransmisores y sustancias que promueven el crecimiento son ejemplos de señales químicas que interactúan con estos receptores específicos para desencadenar un tipo de respuesta intracelular. Por último, ciertas proteínas transmembrana son proteínas enzimáticas, que participan directamente en catalizar reacciones metabólicas específicas.

-Proteínas periféricas.

En comparación con las proteínas integrales de membrana, las proteínas periféricas no atraviesan la bicapa lipídica, y por tanto; son proteínas de carácter mucho más hidrofílico al no presentar segmentos hidrófobos en su estructura. Estas proteínas se localizan en la superficie de la membrana en donde su zona hidrofílica se une solo a la cara externa (medio extracelular) o a la cara interna (medio citoplasmático) de la bicapa misma mediante enlaces con la cabeza polar de un fosfolípido, o bien; con las regiones hidrofílicas de una proteína integral.

Las proteínas periféricas se relacionan con la superficie de la membrana y se mantienen en su sitio por medio de interacciones débiles no covalentes de tipo iónico que pueden interrumpirse y separarse fácilmente de la membrana mediante sacudidas suaves o por cambios de pH sin fragmentar la bicapa lipídica.

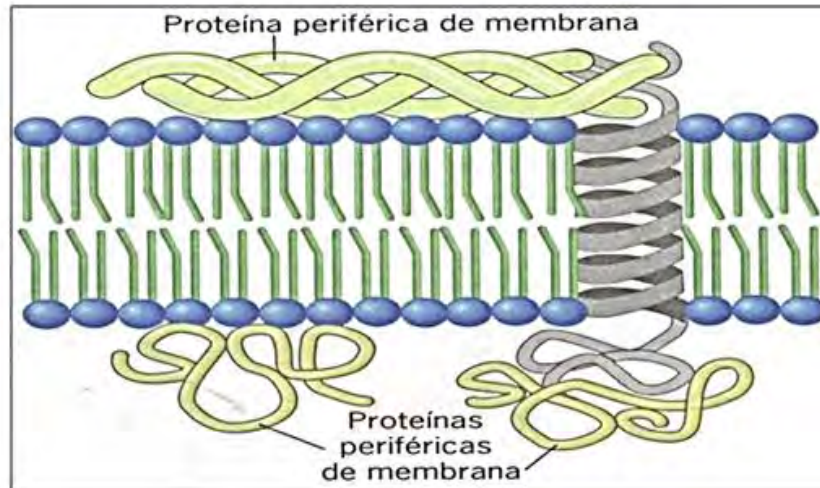


Fig. 19. Las proteínas periféricas se unen mediante enlaces no covalentes con los grupos polares de la bicapa de lípidos o a una proteína integral de membrana o a ambos. Imagen modificada de: Karp, Gerald. *Biología Celular y Molecular*. McGraw Hill Interamericana, 4ª Edición. México, 2007

Las proteínas mejor estudiadas se localizan en la superficie interna (citoplasmática) de la membrana donde suelen tener funciones estructurales de estabilización ya que brindan soporte mecánico a la membrana mediante la conformación de una red fibrilar que actúa como anclaje para el citoesqueleto y para las proteínas integrales.

-Proteínas unidas a lípidos.

Inicialmente cuando Springer y Nicholson propusieron su modelo de mosaico fluido, todas las proteínas se catalogaban como proteínas periféricas o como proteínas integrales de membrana. Ahora, sin embargo; se reconocen una tercera clase de proteínas de membrana que no son ni específicamente periféricas ni integrales, pero que tienen algunas características de ambas. Las proteínas ancladas a lípidos, son esencialmente hidrofílicas y por esto residen en la superficie de la

membrana extracelular o citoplasmática pero unidas covalentemente con una molécula de lípido que se sitúa dentro de la bicapa.

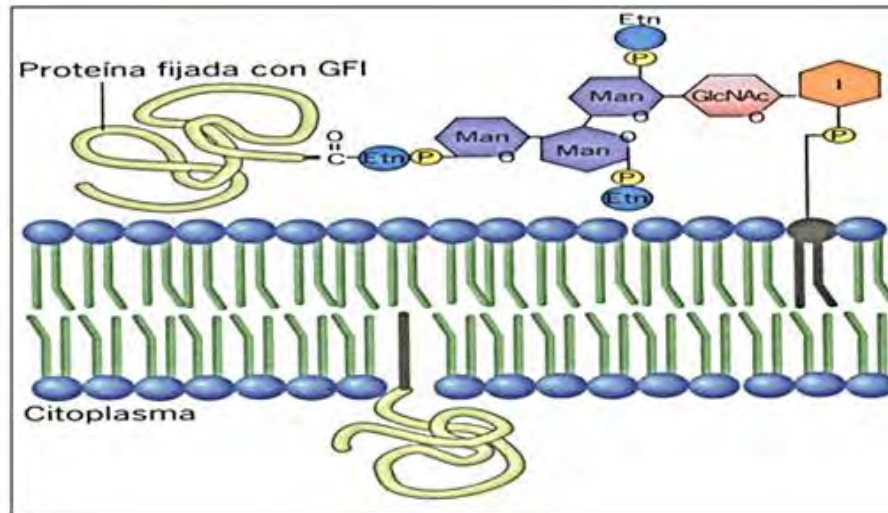


Fig.20. Las proteínas fijadas a lípidos, se unen mediante enlaces covalentes con un grupo que reside en la membrana. El lípido puede ser Glicosilfosfatidilinositol (GPI). Imagen de Karp, Gerald. *Biología Celular y Molecular*. McGraw Hill Interamericana, 4ª Edición. México, 2007

1.3.2.3. Carbohidratos.

Las membranas plasmáticas de células eucariotas contienen carbohidratos incluyendo azúcares simples como monosacáridos o bien disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Según sean la especie y el tipo de célula, el contenido de carbohidrato de la membrana plasmática varía entre 2 y 10% de su peso.²³ Más del 90% de los carbohidratos se une mediante enlaces covalentes a las proteínas integrales de membrana para formar glicoproteínas, los carbohidratos restantes se unen a los lípidos para formar glucolípidos. Además, todas las cadenas de carbohidratos de la membrana plasmática (glucolípidos y glicoproteínas) solo están en la cara exterior sobresaliendo al espacio extracelular.

-Glicoproteínas

Podría decirse que la membrana plasmática esta “recubierta de azúcar”. Lo anterior, en virtud de que muchas proteínas integrales son glicoproteínas, las cuales incluyen una cadena de carbohidratos unidas covalentemente a cadenas laterales de aminoácidos.

²³ Ecker, Gerhard and Chiba, Peter. *Transporters as Drug Carriers: Structure, Function, Substrates*. Wiley-VCH. 2009.

La adición de una cadena lateral de carbohidratos a varios aminoácidos de una proteína se llama *glicosilación*.²⁴ La glicosilación implica dos tipos principales de enlace, el enlace del carbohidrato al átomo de nitrógeno de un grupo amino (N-glicosilación) o al átomo de oxígeno de un grupo hidroxilo (O-glicosilación). Los carbohidratos ligados a **N** están anclados al grupo amino de la cadena lateral de una **aspargina** mientras que los carbohidratos ligados a **O** están normalmente unidos a los grupos hidroxilo de **serina o de treonina**, en algunos casos; los carbohidratos ligados a O están unidos a un grupo hidroxilo de **hidroxilisina o de hidroxiprolina** que son derivados de los aminoácido lisina y prolina respectivamente.

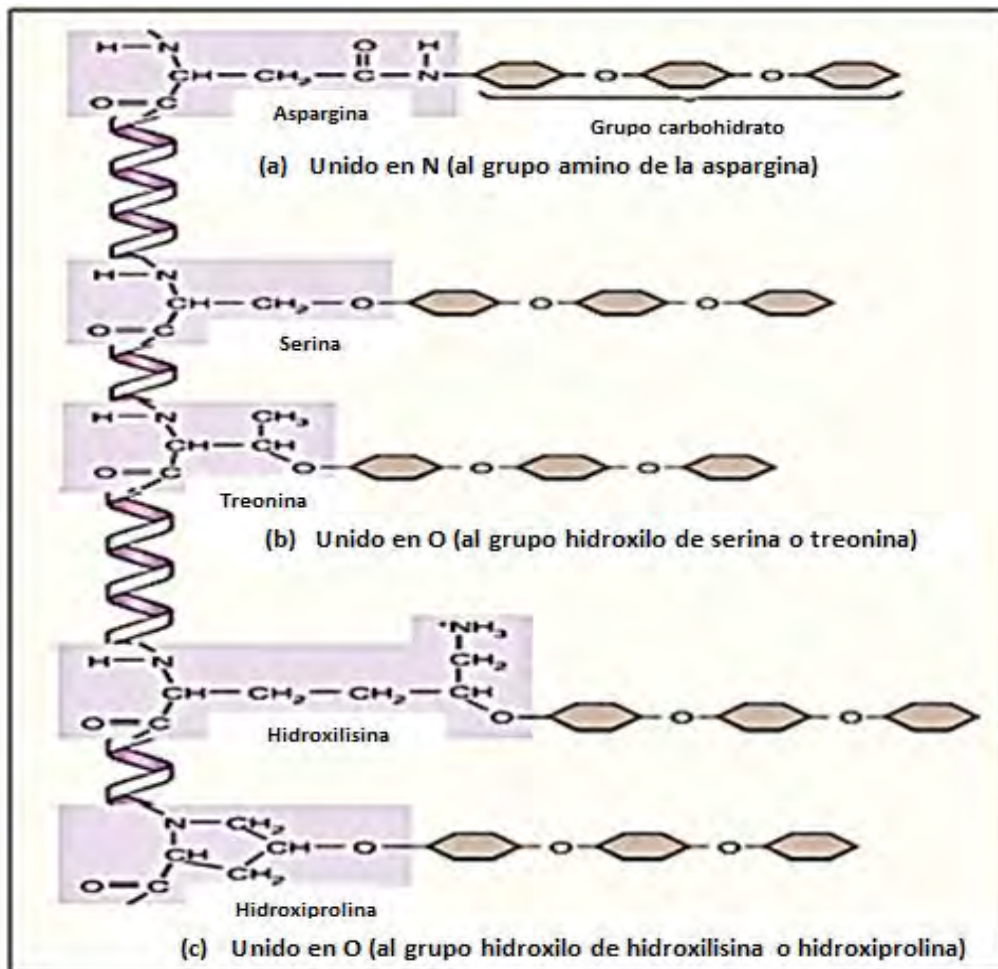


Fig.21. Glicosilación en N y O de las proteínas de membrana. a) El enlace N-glicosídico entre un grupo amino de la aspargina. b) El enlace O-glicosídico entre el grupo OH de la serina y treonina c) o bien entre el grupo de la Hidroxilisina. Imagen modificada de: Becker W. M. and Hardin J. *El mundo de la célula*. Editorial Pearson-Addison Westey. 6ª edición. 2007

²⁴ Becker W. M. y Hardin J. *El mundo de la célula*. Editorial Pearson-Addison Westey. 6ª edición. 2007.

Los carbohidratos presentes en las glicoproteínas se encuentran en forma de varias cadenas de oligosacáridos que pueden ser lineales o ramificadas. La posible diversidad en composición y estructura de estas cadenas es enorme, ya que el número de moléculas de azúcar es variable (aunque usualmente son cadenas cortas de menos de 15 azúcares, puede variar en longitud de 2 a 60 residuos de azúcar). Los azúcares predominantes para contruir estas cadenas son la glucosa, galatosa, manosa, fucosa, N-acetilglusamina y ácido siálico.

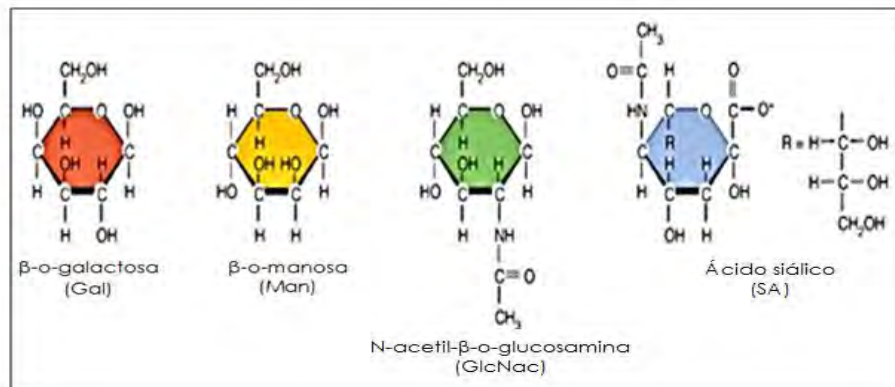


Fig.22. Azúcares encontrado habitualmente en las Glicoproteinas Imagen de: Becker W. M. y Hardin J. *El mundo de la célula*. Editorial Pearson-Addison Westey. 6ª edición. 2007

Las glicoproteínas que predominan en las membranas plasmáticas, desempeñan diversas funciones:

- Ⓢ Reconocimiento intercelular de moléculas de unión.
- Ⓢ Protección, glicoproteínas especialmente destinadas a la secreción.
- Ⓢ Transporte.
- Ⓢ Soporte
- Ⓢ Identificación, las cadenas de carbohidratos sirven como huellas digitales de una célula
- Ⓢ Procesos de adhesión intercelular
- Ⓢ Formar una cubierta de superficie denominada glucocálix

1.3.2.4. Uniones entre células.

Especializaciones de las superficies celulares.

En los organismos multicelulares, para lograr la integridad y funcionalidad de las células de un tejido de manera coordinada; es necesario que interactúen las membranas plasmáticas de células

adyacentes, esto se consigue manteniendo unidos cúmulos de células y creando rutas mediante las cuales existe comunicación celular con sus vecinas. Dependiendo del organismo y del tipo de célula, pueden establecerse tres tipos de conexiones intercelulares especializadas.

-Desmosomas o uniones adherentes.

Los tejidos animales tienen uniones llamadas desmosomas que mantienen unidas a las células. En un desmosoma, las membranas de células adyacentes se pegan mediante placas citoplasmáticas internas compuestas por un complejo de filamentos glucoproteicos transmembranosos de anclaje intracelular que se fijan de manera firme en el citoesqueleto de cada célula. De esta manera, la disposición estructural de los desmosomas ayuda a mantener la integración celular y contribuye a la estabilidad general de las células y tejidos.

-Uniones estrechas.

Los espacios entre las células se sellan con fibras de proteína para formar uniones estrechas mejor conocidas como “tight junctions”. Las membranas adyacentes casi se fusionan a lo largo de una serie de crestas, formando prácticamente empaques a prueba de fugas entre las células. Las células de los tejidos que sirven como barreras se mantiene juntas gracias a este tipo de unión; en el intestino, las sustancias permanecen fuera de la sangre gracias a este tipo de uniones.

-Uniones de abertura.

En organismos eucariontes, muchas células se comunican mediante canales proteicos idénticos de la membrana que conectan directamente los interiores de células adyacentes al formar pequeñísimos túneles llenos de líquido. Estos canales intercelulares se denominan uniones de abertura o “gap junctions”. Confieren resistencia a las células al mismo tiempo que permite el paso de moléculas pequeñas entre ellas tal es el caso de iones, hormonas, nutrimentos e incluso señales eléctricas.

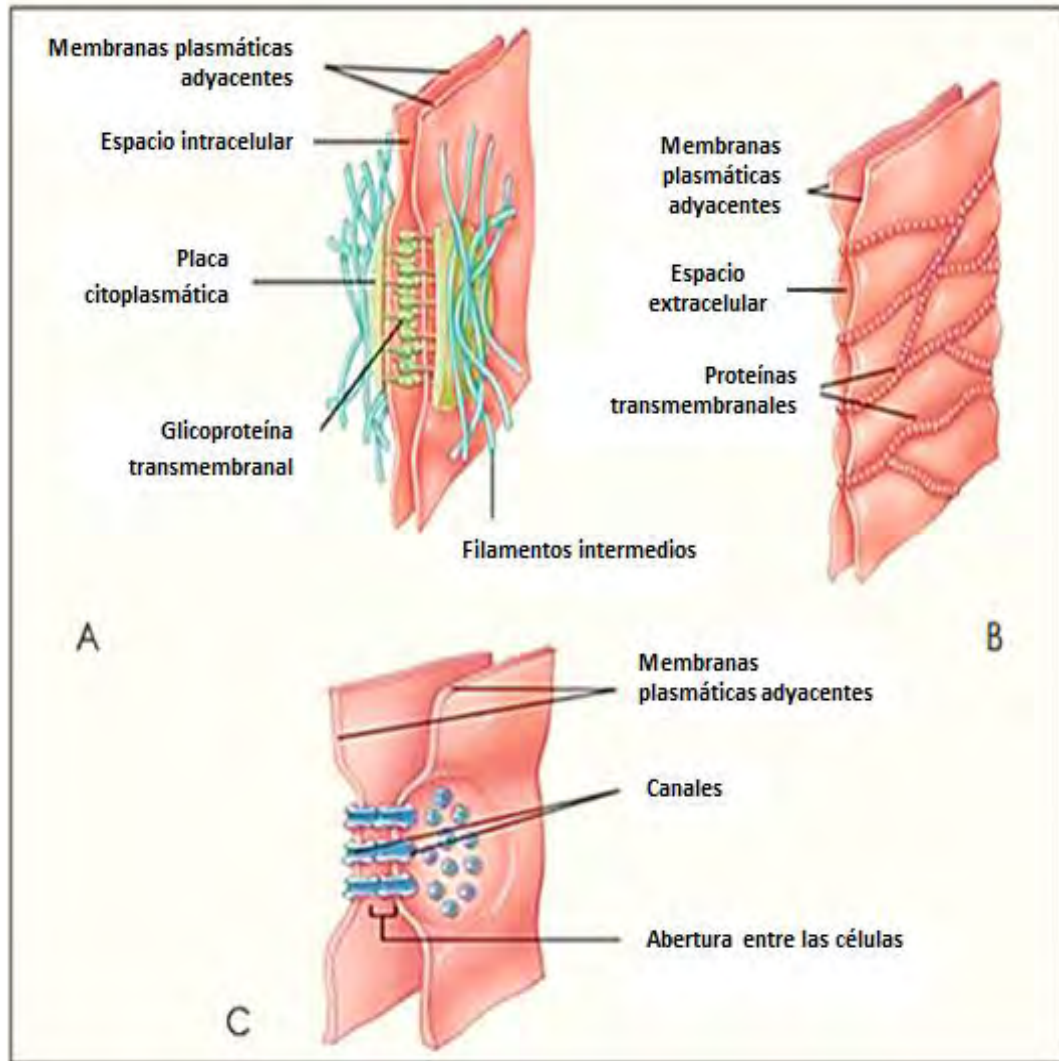


Fig.23. Uniones intercelulares. a) Desmosomas b) Tight junctions c) Gap junctions. Imagen modificada de: <http://www.uaz.edu.mx/histo/html>.

1.4 Absorción gastrointestinal.

El tracto digestivo es un sistema enrollado de 5 a 9 m que se abre en la boca y termina en el esfínter anal voluntario. Su principal función consiste en aprovechar para el organismo las sustancias nutritivas procedentes del exterior, capaces de subvenir a sus necesidades energéticas y plásticas. Es también la vía de administración más fisiológica para los medicamentos, que se ha denominado la vía oral, o tal vez con mayor propiedad, vía peroral, cuyos lugares de absorción están localizados, básicamente en el intestino delgado, pero también en el intestino grueso y el estómago (lugares de carácter más inespecífico).

El estudio anatómico-fisiológico del tracto digestivo no constituye en realidad un objeto directo de la absorción, pero las diferencias existentes en este proceso, hacen necesaria la consideración de algunos de estos aspectos en sus líneas más generales.

1.4.1. Anatomía general del tracto digestivo.

El tracto gastrointestinal es un sistema complejo en el que existen diferentes condiciones de pH, enzimas, electrolitos, fluidez y superficies. En relación a las superficies, todo el revestimiento interno del tubo digestivo está cubierto por epitelios que son muy diferentes unos de otros; algunos poseen células con funciones digestivas, secretoras, o bien; absorptivas que trabajan en conjunto con un propósito en común, preparar el alimento ingerido para su absorción hacia el aparato circulatorio y el sistema linfático a fin de que se distribuya por todo el organismo y llegue a todas las células.

Anatómica y funcionalmente lo conforman siete partes bien caracterizadas: *boca, faringe, esófago, estómago, Intestino delgado* (duodeno, yeyuno e íleon), *intestino grueso* (ciego, colon, recto) y ano.

Además, para funcionar requiere de órganos digestivos accesorios directamente interconectados como los dientes, lengua, glándulas salivales, hígado, vesícula biliar y páncreas.

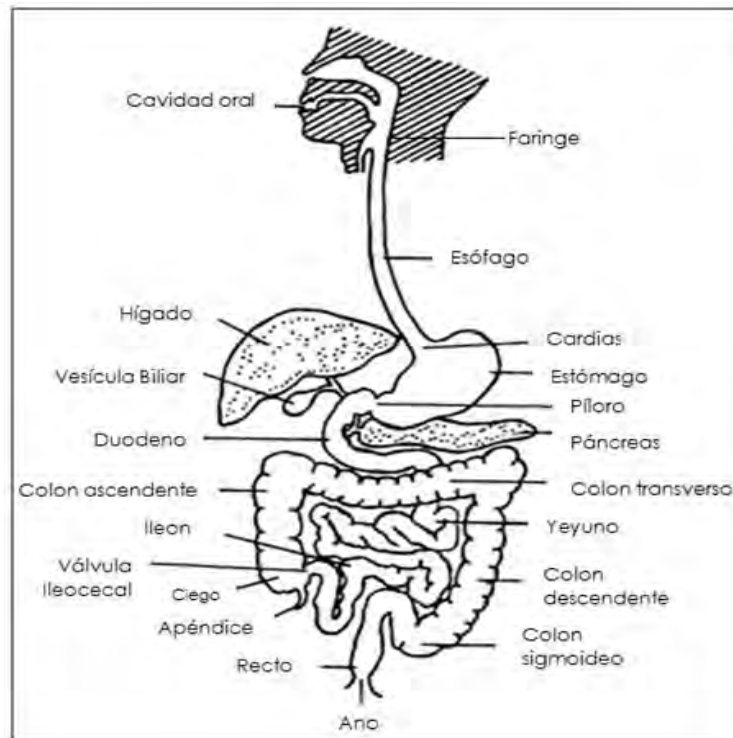


Fig.24. Estructura aparato digestivo. Imagen modificada de http://www.medicalook.com/Digestive_system/

La *boca* es el orificio de entrada que comunica con el exterior a voluntad gracias al movimiento de las mandíbulas y los labios.

La *faringe* es la segunda porción del sistema gastrointestinal con 12 cm de longitud, donde convergen los aparatos respiratorio (laringe) y digestivo (esófago) desde la base de la lengua y a nivel de la epiglotis.

El *esófago* conecta la faringe con el estómago y puede considerarse ya como propiamente digestivo. Es un tubo conducto colapsado de unos 25 cm de longitud y de 1-3 cm de anchura que discurre a lo largo del cuello, tórax, abdomen y da origen al cardias, un esfínter muy débil que se considera como la parte inicial del estómago.

El *estómago* conecta el esófago con el intestino delgado y es la parte más dilatada o expandida del tracto digestivo ya que mide 25 cm de longitud por 10 cm de ancho cuando está vacío y posee una capacidad de 1.2 litros cuando está lleno, no obstante; es considerado como un lugar poco propicio de absorción por su histología y función fisiológica. Se divide en 4 porciones: *fondo o fundus*, *cuerpo*, *antro gástrico* y finaliza con el *esfínter pilórico* o *píloro*. Propiamente; consta de un tramo izquierdo vertical (segmento cardial) y otro más pequeño, derecho horizontal (el segmento pilórico). El primero comprende el fundus, situado por encima del cardias, y el cuerpo, que queda por debajo del mismo y se extiende hasta la incisura angular. El segmento pilórico consta de una porción vestibular o antro, y el píloro o canal pilórico, un esfínter potente que comunica con el duodeno (primera fracción del intestino delgado) y regula el tránsito del contenido gástrico hacia este.

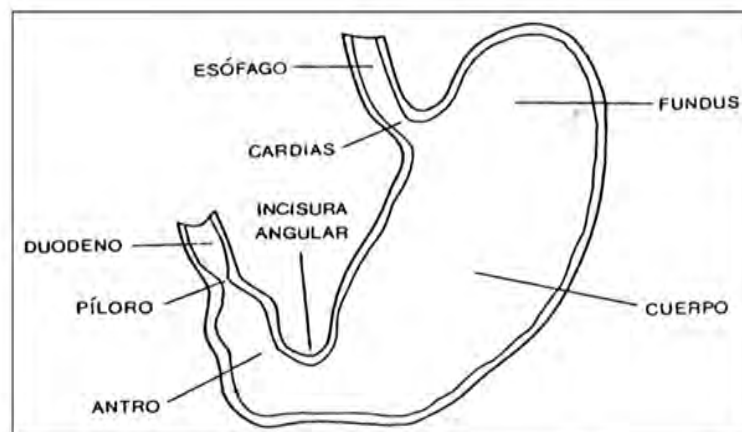


Fig.25. Esquema anatómico del estómago humano, con sus principales elementos distintivos. Imagen de: Doménech Berrozpe, José. et. al. *Biofarmacia y Farmacocinética* Vol.II. Editorial Síntesis. 2008

El *intestino delgado* es un tubo que mide aproximadamente 2.5 cm de diámetro y en conjunto unos 6-7 metros de largo, por lo que es la porción más larga del sistema gastrointestinal. Está localizado en la cavidad abdominal rodeado por el peritoneo; tiene como función finalizar la digestión y favorecer el mecanismo de absorción de la mayor parte de nutrientes y xenobióticos. Se considera arbitrariamente dividido en 3 secciones anatómicamente similares pero diferentes en cuanto a la

capacidad de absorción y secreción. Desde el estómago hacia el intestino grueso se encuentran una porción fija o duodeno y otra móvil llamada yeyuno-íleon (comprenden 5%, 50% y 45% de longitud respectivamente); su porción proximal se conecta con el estómago a través de píloro y con el intestino grueso, en su porción distal mediante el esfínter o válvula ileocecal.^{25,26}

-El *duodeno* es la fracción más corta (20-30 cm); de pared profundamente plegada que describe una curva casi circular o en C al adaptarse en torno al páncreas antes de enlazar con el yeyuno. Dos conductos entran al duodeno; unos 10 cm después del píloro, desemboca el conducto colédoco procedente de la vesícula biliar y por lo tanto del hígado y el conducto de Wirsung (procedente del páncreas). Estos conductos se unen a través de un orificio denominado esfínter de Oddi, que regula el vertido de las secreciones de ambas glándulas al duodeno.

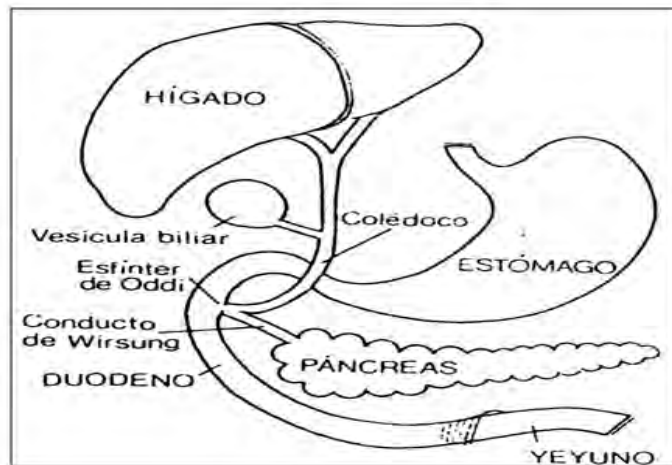


Fig.26. Esquema de la zona duodenal del tracto digestivo, mostrando su disposición anatómica y la de los conductos adyacentes que vierten sus secreciones en el duodeno. Imagen modificada de: Doménech Berrozpe, José. et. al. *Biofarmacia y Farmacocinética* Vol.II. Editorial Síntesis. 2008

-El *yeyuno* y el *íleon*, miden en conjunto casi 7 m (3 y 4 respectivamente) y su diámetro va decreciendo desde 5 cm en la fracción inicial del yeyuno hasta 2.5 cm en la fracción terminal del íleon que desemboca en el intestino grueso por el esfínter ileocecal, semejante al píloro.

²⁵ Ascencio Peralta, Claudia. *Fisiología de la nutrición*. McGraw-Hill. México. 2012.

²⁶ Oostendorp L., Roos; Beijnen H. Jos and Schellens H.M., Jan. *The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier*. *Can. Traeat. Rev.* 2009, 35 (2), 137-147.

El *intestino grueso*, es la porción final del tubo digestivo, mide alrededor de 1.5 m de longitud con un diámetro que oscila entre 2.5 y 7.6 cm en promedio, está diferenciado en 4 porciones: El *ciego* que incluye al apéndice, el *colon* que ocupa la superficie mayor del intestino grueso caracterizado a su vez por tres zonas: colon ascendente, colon transverso y colon descendente. Por último, el *recto* es el extremo final del intestino grueso que termina y comunica con el exterior por el canal anal (ano).

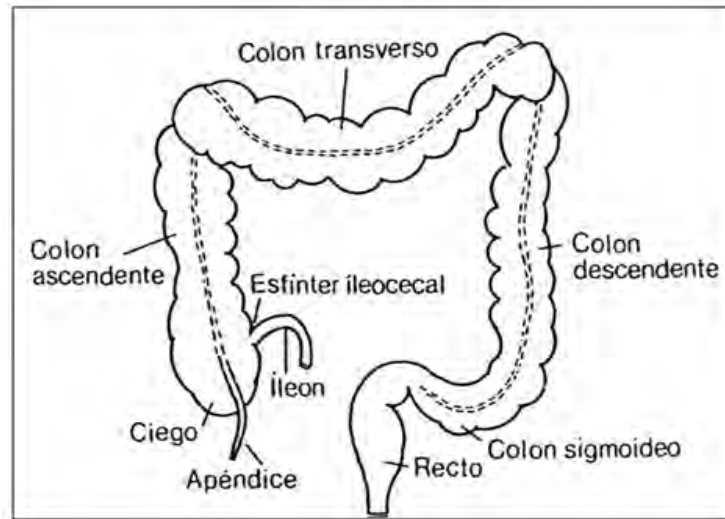


Fig. 27. Esquema del intestino grueso humano (ciego, colon y recto) con sus principales elementos anatómicos. Imagen modificada de: Doménech Berrozpe, José. et. al. *Biofarmacia y Farmacocinética* Vol.II. Editorial Síntesis. 2008

1.4.1.1. Bosquejo histológico.

La pared del tubo digestivo desde el esófago hasta el conducto anal presenta una estructura histológica en común, está organizado en capas con un tipo dominante de tejido que realiza funciones determinadas en todo el proceso de digestión y absorción. En general, estas capas pueden diferenciarse estructuralmente de exterior a interior de la siguiente manera:

- Zona o capa serosa*. Extensión del peritoneo formada por células mesoteliales planas que completa exteriormente la pared del tubo digestivo como la envoltura del cilindro fundamental.
- Zona muscular*. Caracterizada y constituida a su vez por dos capas: Una capa externa o longitudinal con fibras alargadas (fibras longitudinales) y una capa interna adyacente a la anterior con fibras dispuestas en sentido

transversal (fibras circulares) responsables de los movimientos peristálticos. Ambas capas están constituidas por músculo liso excepto en sus dos extremos boca y ano que son de carácter voluntario.

-*Zona glandular*, dividida en cuatro partes de espesor muy desigual:

a) Capa submucosa, formada básicamente por tejido conjuntivo adyacente a la capa muscular que proporciona solidez y consistencia. Es la zona más vascularizada e innervada.

b) La mucosa muscular o “*muscularis mucosae*” está constituida por una finísima trama de fibras musculares lisas. Responsable también de las contracciones segmentarias y de los movimientos peristálticos a lo largo del tubo digestivo.

c) Capa intermedia o lámina propia, conjuntivo-muscular con multitud de células del sistema inmunitario (linfocitos y macrófagos) que proporcionan la defensa contra los antígenos ingeridos que llegan a esta capa desde el tracto gastrointestinal y elementos no celulares (colágeno, elastina). Comprende un conducto de capilares sanguíneos y linfáticos que nutren a las células epiteliales y que permiten el transporte de las sustancias absorbidas hacia circulación sistémica. Además, la lámina propia rodea a las criptas de Lieberkühn por lo que rellena el centro de las vellosidades intestinales constituyendo la base en la que se asientan y es, de hecho; el soporte estructural inmediato a la capa de las células epiteliales.

d) La capa mucosa o epitelial propiamente dicha, reviste la luz del tubo digestivo y está en contacto directo con los contenidos gastrointestinales. Se conforma de tejido conjuntivo y músculo liso cuya superficie está formada por células poliestratificadas en el esófago, pero por una sola capa continua de células epiteliales en estómago e intestino a las que se debe su función absorbente y de secreción.

Esta monocapa de células epiteliales, contiene células madre que proliferan y migran a lo largo del eje cripta-villus, las cuales; conforme migran reciben diferentes señales para diferenciarse generando así a diferentes tipos de células.

-El sistema nervioso entérico compuesto por dos plexos nerviosos.

La inervación del aparato gastrointestinal se realiza a través de nervios extrínsecos procedentes del sistema nervioso autónomo que forman una capa de fibras entre las dos zonas musculares (plexo mientérico de Auerbach) y otra entre la zona muscular circular y la submucosa (plexo submucoso o de Meissner). Actúan como reguladores de la circulación sanguínea zonal, la emisión de secreciones gastrointestinales y la motilidad.

Esta disposición de capas determina que cualquier sustancia que llegue al intestino y se absorba hasta la circulación sanguínea, deba atravesar el epitelio, parte de la lámina propia y la pared capilar del vaso sanguíneo; siendo la pared epitelial la barrera limitante en el proceso de absorción intestinal.

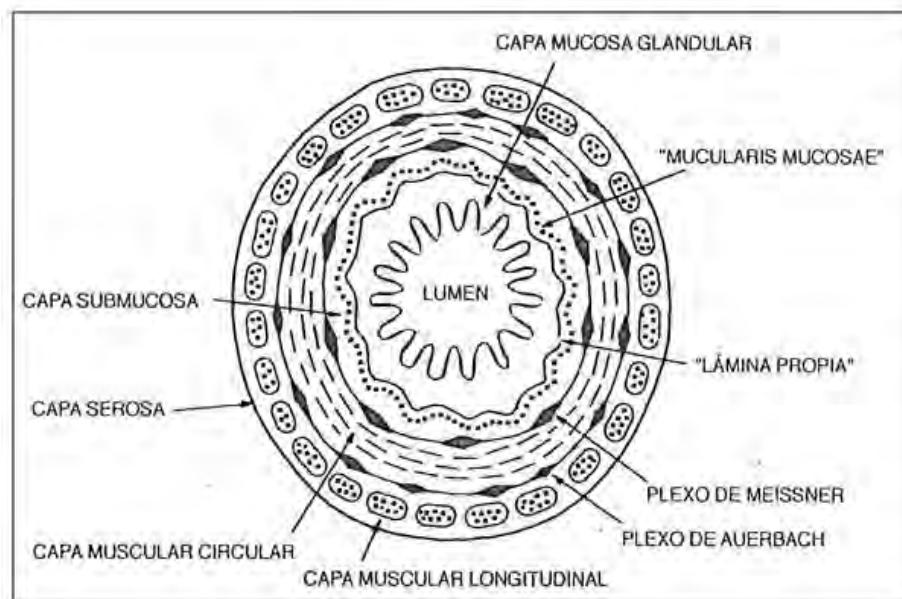


Fig.28. Esquema estructural común de las capas del tubo digestivo. Imagen de: Doménech Berrozpe, José. et. al. *Biofarmacia y Farmacocinética* Vol.II. Editorial Síntesis. 2008

1.4.1.2. Fisiología del tracto digestivo.

Se considerara el aspecto fisiológico más importante en lo que atañe la absorción de fármacos: las secreciones en las distintas partes del tracto digestivo.

-Secreciones digestivas y pH

El tracto digestivo es el sustrato de varias secreciones necesarias para la digestión y absorción de alimentos, distribuidas a lo largo de todo su recorrido. En la boca, las glándulas salivales producen una secreción líquida llamada saliva, el pH de la saliva fluctúa entre 6 y 7 adecuado para la acción de enzimas salivares como las amilasas y lipasas.

La mucosa del estómago muestra dos tipos de glándulas, las oxínticas y las pilóricas formadas por varios tipos de células. Las glándulas pilóricas contienen células mucosas que secretan moco, mientras que en las glándulas oxínticas se encuentran las células parietales que secretan ácido clorhídrico (HCl), las células principales productoras de pepsinógeno, que; por contacto con el HCl, pasa a la enzima hidrolítica pepsina e inicia la degradación de las proteínas; también, existen células G productoras de gastrina y células enterocromafines productoras de histamina. El jugo gástrico es entonces el conjunto de todas estas secreciones y proporciona un pH del orden de 1.0 cuando el estómago está vacío mientras que durante las comidas, debido al efecto regulador de los alimentos, el pH es más elevado, entre 2.5 y 3.5. El contenido gástrico que vacía al duodeno es pues, fuertemente ácido.

En el intestino delgado coexisten varios tipos de secreciones destinadas a neutralizar esta acidez y con importantes funciones digestivas. Una de estas secreciones es el jugo entérico con un pH propio de 7.5 -8.0 que contiene una elevada proporción de mucina, bicarbonato y la enzima enteroquinasa que pasa el tripsinógeno a pepsina, así como cierta cantidad de peptidasas, lipasas y amilasas. Pero al intestino delgado vierten también sus secreciones el hígado (bilis) y el páncreas (jugo pancreático). La bilis provee sales biliares que son derivadas del ácido cólico como el ácido taurocólico o glicólico que actúan como emulsificantes e incluso solubilizantes de las grasas además de lecitina y colesterol. El jugo pancreático con un pH propio de 8.5-9.0 es rico en bicarbonato y contiene la mayoría de las enzimas digestivas lipasas,

amilasas y tripsinógeno. La alcalinidad de estas secreciones motiva un cambio abrupto de pH respecto al gástrico; en el duodeno y yeyuno proximal, el pH oscila entre 5.0 y 7.0 pero va aumentando progresivamente en el yeyuno medio distal y el íleon (7.0-7.8) hasta alcanzar un valor del orden de 8.0 en el esfínter ileocecal. En el intestino grueso el pH es alcalino (8.0) y la principal secreción es la mucina.

1.4.2. Lugares de absorción.

La absorción de fármacos como la de los nutrientes y otros xenobióticos, en general se produce principalmente en el intestino delgado; lugar especializado por excelencia aunque también una mínima absorción se puede llevar a cabo en el colon e incluso en el estómago.

Al margen de la vía a través de la cual se produce la penetración del soluto, el paso de éste a la circulación una vez atravesada la barrera natural, discurre a nivel de los capilares sanguíneos y linfáticos situados en la zona mucosa adyacente a la pared celular basal. Conviene puntualizar que la absorción por vía sanguínea es incomparable con la vía linfática, debido fundamentalmente al flujo de sangre que recorre los capilares.

Respecto a la morfología de los lugares de absorción, es interesante detenerse en el estudio de los caracteres morfológicos del epitelio digestivo a nivel macroscópico así como a nivel celular por sus estrechas relaciones con la función absorbente.

1.4.2.1. Mucosa del intestino delgado.

El intestino delgado representa el principal sitio de absorción del sistema gastrointestinal para cualquier compuesto ingerido ya sea dietético, terapéutico o tóxico por varias razones; a nivel macroscópico debido al rango de pH intestinal, a la disposición anatómo-fisiológica del órgano y, a nivel microscópico; debido a la presencia de estructuras y de una organización celular en la capa mucosa adecuada a su función

específica donde prevalecen todos los mecanismos que conducen a la incorporación de los fármacos al organismo y una gran variedad de proteínas transportadoras con características únicas que le confieren una morfología bastante compleja y especializada a fin de aumentar la superficie útil para que el proceso de absorción pueda llevarse a cabo de una manera sumamente eficaz.

a) Aumento de la superficie de absorción.

La superficie lineal del intestino delgado es de aproximadamente de medio metro cuadrado, pero su superficie real de absorción asciende a 200 m² (el tamaño de una cancha de tenis). Esta tendencia se hace evidente por la presencia de tres adaptaciones morfológicas bien definidas que se desarrollan a partir de la estructura cilíndrica del tubo digestivo encaminadas a aumentar su superficie y por tanto, su capacidad de absorción.

- ⊗ Válvulas conniventes o pliegues de Kerkring.
- ⊗ Velloidades intestinales o villi.
- ⊗ Enterocitos y Microvellosidades

-Válvulas conniventes o pliegues de Kerkring.

De la pared fundamental de la mucosa surgen las llamadas válvulas conniventes o pliegues de Kerkring que son los repliegues gruesos y transversos formados por elevaciones prominentes semicirculares perfectamente observables a simple vista en el duodeno y el yeyuno de casi todos los mamíferos y también, aunque en menor proporción, en el íleon. Estos pliegues multiplican 3 veces el área superficial absorptiva del intestino delgado (1 m²).

-Villi o velloidades intestinales.

La superficie de pliegues, esta a su vez cubierta por unos pliegues secundarios que constituyen los villi o velloidades intestinales similares a minúsculos dedos que confieren un aspecto aterciopelado al intestino y

que se proyectan también de la capa mucosa hacia la luz o lumen intestinal. Individualmente, tienen alrededor de 1 mm de longitud y se encuentran de 20 a 40 por cm^2 , además; cada vellosidad contiene en su interior a modo de esqueleto interno un capilar sanguíneo con una arteriola, una vénula tributaria a las venas mesentéricas y un capilar linfático que confluyen formando una profusa red de capilares ascendentes en forma de asa que irrigan a los enterocitos ubicados sobre la misma para el proceso de transporte de los xenobióticos y nutrientes absorbidos. Complementando este contexto estructural, entre cada vellosidad (base), se encuentran las criptas intestinales o de Lieberkühn, invaginaciones interiores de forma tubular del epitelio intestinal donde se sitúan las células madre que dan lugar a la mayoría de los tipos celulares que componen el intestino.

Las vellosidades en combinación con las válvulas conniventes, incrementan la superficie de absorción de la mucosa en aproximadamente 30 veces o bien en un factor de 10 (10 m^2).

-Enterocitos y microvellosidades.

Los villi, por su parte; están tapizados por una monocapa que contiene diferentes tipos de células epiteliales con funciones endocrinas, exocrinas y absorptivas desde la punta hasta la cripta de la vellosidad. De todas las células intestinales, las que presentan un especial interés ya que se especializan en la absorción y secreción de sustancias, son los enterocitos (maduros) o células absorptivas. Se trata de células cilíndricas que miden aproximadamente $25 \mu\text{m}$ de alto y $7 \mu\text{m}$ de diámetro y son las más abundantes ya que aproximadamente cubren un 80-90% de toda la superficie mucosa dejando algunos huecos ocupados por otros tipos celulares y glándulas a nivel de las criptas como las células calciformes secretoras de moco que suponen entre un 10 y 25% de la población celular total.²⁷

²⁷ Calatayud Arroyo, Marta. Tesis doctoral *Estudio in vitro de mecanismos de transporte y toxicidad de especies arsenicales a nivel intestinal*. Universidad de Valencia, 2012.

Los enterocitos son células muy polarizadas, lo que significa que poseen varias caras o superficies con diferencias morfológicas y funcionales, es decir; presentan diferentes composiciones de proteínas y lípidos y, por lo tanto; diferentes propiedades de permeabilidad:

-*Membrana apical*, es la membrana en contacto con el contenido intestinal y corresponde a la cara mucosa del epitelio. La membrana apical recibe también el nombre de membrana de borde o ribete en cepillo, por presentar multitud de microvellosidades.

-*Membrana basal*, es la membrana en contacto con los vasos sanguíneos y linfáticos, mira hacia el espacio intersticial frente a tejidos subepiteliales. Corresponde a la cara serosa del epitelio.

-*Membrana lateral*, rodea el espacio intercelular. Las características funcionales de la membrana basal y la membrana lateral son muy similares, por lo que se puede hablar de una membrana basolateral.

Además de estas estructuras, las células absortivas están unidas entre sí por medio de complejos de unión intercelulares, conocido como uniones estrechas “tight junctions” siendo los componentes más significativos de los complejos de unión al localizarse en el extremo apical de la membrana lateral de células adyacentes; actúan como barrera física ya que limitan la absorción de los compuestos hidrofílicos debido a su pequeño tamaño de poro (de apenas 0.4-0.8 nm en humanos).²⁸

La superficie que adquiere mayor importancia desde el punto de vista absorbtivo, es la membrana apical del enterocito ya que está constituida en su totalidad por los llamados microvilli o microvellosidades intestinales; estructuras igualmente difigitiformes densamente empacadas que miden alrededor de 1 μm de alto y 0.1 μm de diámetro. Cada enterocito contiene en promedio 1.700 microvellosidades, lo que hace mejorar 20 veces más la superficie de absorción en comparación con la de los villi, resultando en

²⁸ Herrera Ruiz, Dea, et.al. *Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos*. Rev Mex Cienc Farm. 2012, 43 (1), 18-32.

una especialización anatómica que aumenta notablemente la superficie o área de contacto en un factor total de 600 facilitando así el proceso de absorción (200 m²). Esta existencia de microvilli es el carácter diferencial por excelencia de los enterocitos; aparte de esta diferencia fundamental, el enterocito contiene todos los elementos comunes a las demás células.

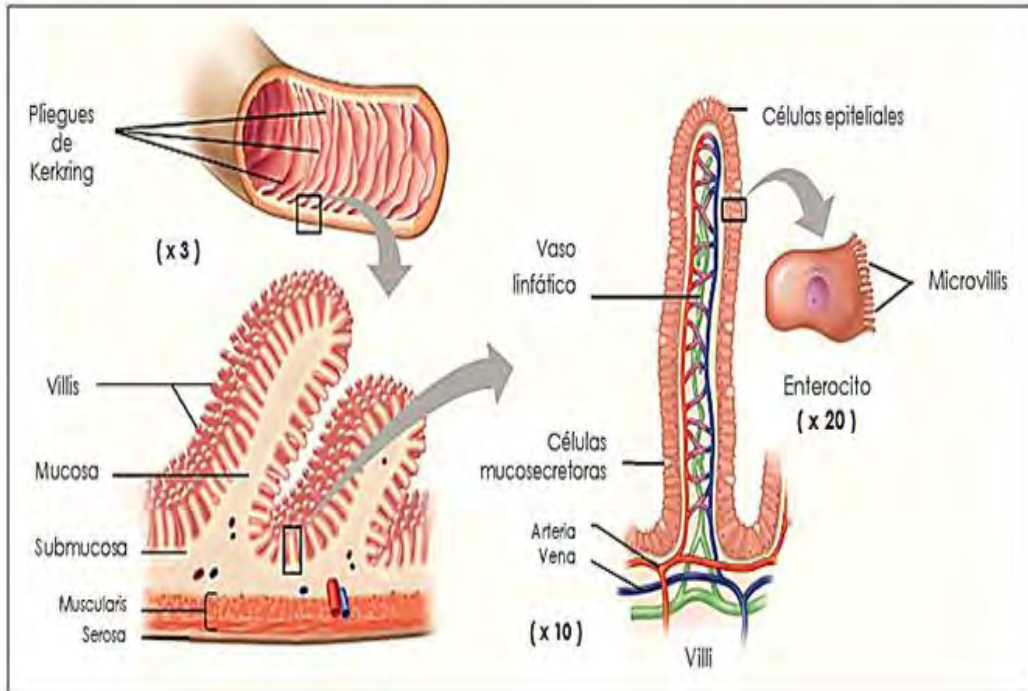


Fig.29. Esquema de la superficie de absorción intestinal. En la parte izquierda se puede observar la pared interna del cilindro intestinal con los pliegues de Kerckring o válvulas conniventes; en la derecha, más ampliado; el esquema de la sección de un villi y el esquema de un enterocito con la superficie de borde en cepillo formada por los microvillis. Imagen modificada de: http://bioserv.fiu.edu/fallspring/digest_nutrition/html.

b) Membrana plasmática.

La estructura de membrana de las microvellosidades se basa en el modelo de mosaico fluido donde la barrera es una bicapa lipídica con una variedad de proteínas. Sin embargo, las características individuales de esta membrana son: su espesor superior al resto de las membranas biológicas (9.5 a 11.5 nm) y su composición química con un elevado contenido de proteínas (la relación proteína/lípido es tres veces superior a la normal) lo que es indicativo de la existencia de enzimas y, principalmente; de una amplia gama de proteínas de transporte cuya función es la de actuar como sistemas específicos para la absorción importancia que hace que se traten en el **inciso c**.

La siguiente barrera potencial de difusión que separa la luz intestinal de la sangre es la membrana basal. Se trata de una membrana de 7.0 a 9.0 nm de espesor y sus propiedades de permeabilidad son similares a las demás membranas biológicas.

-Microambiente

Las microvellosidades están revestidas por glicoproteínas y mucopolisacáridos que dan origen al llamado glucocáliz, en el microscopio; aparece como una zona compacta de filamentos entrelazados los cuales no solo protegen a las microvellosidades de su autodigestión sino que además contiene multitud de enzimas que intervienen en la digestión terminal de dipéptidos y disacáridos hasta sus monómeros elementales. El pH de este microambiente es de 5.2, independiente del pH luminal. Inmediatamente adyacente al glucocáliz existe una capa de agua sin agitación, con un grosor que varía entre 30 y 100 μm que limita con el fluido luminal. Contiene una elevada proporción de glicoproteína y un 90% de oligosacáridos.²⁹

El reconocimiento de la función coordinada de estos elementos tanto del microambiente como de los sistemas de transporte de membrana y las enzimas extra e intracelulares, han llevado a que la vasta superficie formada por los microvillis y los enterocitos se considere actualmente como una barrera de naturaleza selectiva que sirve como la primera línea de defensa importante del organismo.

El carácter selectivo de esta barrera se sustenta en la necesidad del epitelio intestinal para permitir y, de hecho; facilitar la absorción de los nutrientes y otros constituyentes esenciales de la dieta y al mismo tiempo protegerlo limitando la absorción de compuestos extraños como microorganismos, fármacos y xenobióticos en general potencialmente tóxicos.

²⁹ Herrera Ruiz, Dea, et.al. *Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos*. Rev Mex Cienc Farm. 2012, 43 (1), 18-32.

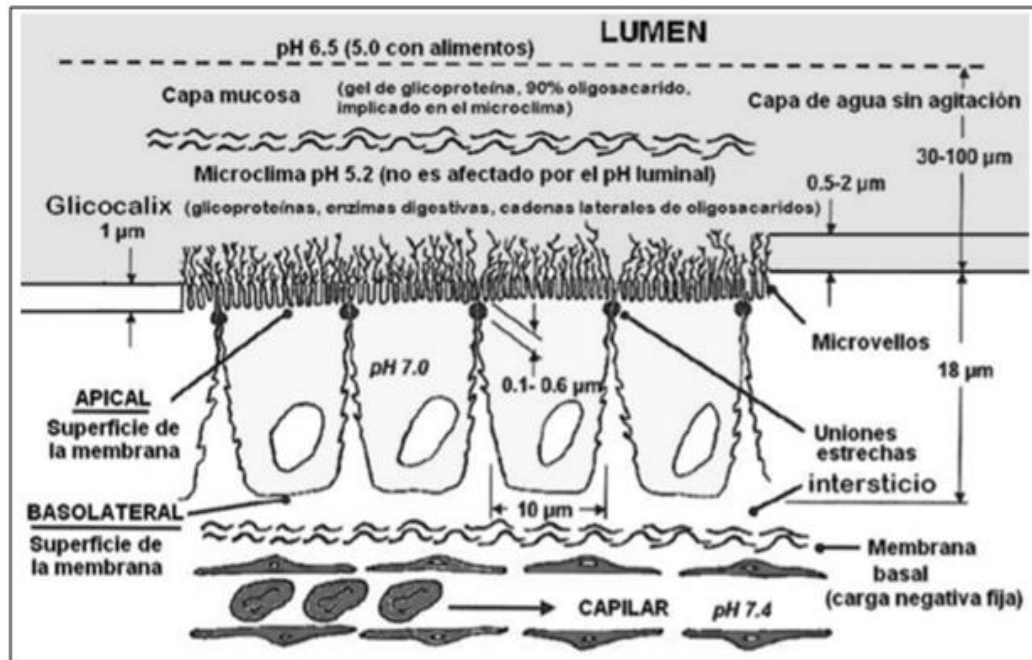


Fig.30. Dimensiones y características particulares del microambiente de las células absorbentes. Imagen de: Herrera Ruiz, Dea, et.al. *Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos*. Rev. Mex. Cienc. Farm.2012, 43 (1), 18-32.

c) Transportadores de membrana expresados en el intestino.

Los transportadores de membrana han sido reconocidos como una clase de proteínas integrales con gran riqueza y diversidad de estructuras que actúan como “porteros” al facilitar o, en algunos casos; impedir el flujo de moléculas endógenas y xenobióticos dentro y fuera de la célula regulando el equilibrio fisiológico de líquidos y solutos.

En el intestino delgado, los enterocitos poseen un número de transportadores críticos para la absorción de constituyentes de la dieta.

Cabe mencionar, que su función natural es transportar y asistir en la absorción de nutrientes y sustratos endógenos como azúcares, lípidos, aminoácidos, ácidos biliares, esteroides, hormonas, nucleótidos, péptidos pequeños, iones, oligoelementos, vitaminas y otros compuestos esenciales así como en la eliminación de los productos del metabolismo celular y otros productos de deshecho.

Igualmente, el papel fisiológico de su expresión en diversos órganos importantes como el intestino, hígado, riñón, vejiga, además de otros tejidos también les permite funcionar como una barrera biológica selectiva al proteger al cuerpo y a las células de daños potenciales producidos por toxinas y xenobióticos del ambiente.

En virtud de esta multifuncionalidad, las proteínas de membrana no involucran el transportar fármacos en específico, sin embargo; su especificidad no es privativa de los sustratos fisiológicos con los que interaccionan, en otras palabras; los fármacos que guardan una estructura significativamente similar a sus sustratos fisiológicos originales, tienen la posibilidad de ser reconocidos y transportados por estos transportadores.

Este comportamiento hace que sean identificados como factores clave en los procesos farmacocinéticos y, por ende; que asuman un profundo efecto en la determinación de la Biodisponibilidad oral interviniendo en el control de la absorción y disposición de varios fármacos sustrato.

-Clasificación

El dominio apical de la membrana enterocítica, contiene una serie de proteínas transportadoras que no se encuentran presentes en la membrana basal. Esta distribución asimétrica determina la dirección específica de transporte de un gran número de sustancias a través del epitelio intestinal.

En consecuencia, para muchos fármacos, las acciones combinadas y a menudo complementarias de estos transportadores describen la extensión y dirección de su movimiento a través de los órganos. Así, el transporte neto se puede desarrollar en la dirección apical-basal o en la dirección basal-apical lo que da paso a que los transportadores sean funcionalmente clasificados en 3 diferentes maneras:

De acuerdo a la dirección en la cual transportan sus sustratos a través de las membranas celulares.

En esta clasificación se encuentran los *transportadores de influjo* o de entrada (*influx transporters*), los cuales; transportan su sustrato en la dirección de absorción, es decir; dentro de la célula y los transportadores de eflujo o de salida (*efflux transporters*) que lo expulsan o bombean fuera de la célula.³⁰

Desde un punto de vista farmacocinético.

El transportador que transfiere su sustrato hacia la circulación sanguínea es llamado de *absorción*, independientemente si son de influjo o eflujo mientras que el transportador que excreta su sustrato desde la circulación sanguínea o el medio intracelular en la bilis, orina o en el lumen intestinal se conoce como transportador de *secreción*.³¹

De acuerdo a su expresión genética.

Finalmente, la clasificación estándar que rige propiamente la nomenclatura de las proteínas transportadoras de membrana fue originalmente propuesta por la Organización del Genoma humano (HUGO) por conducto del Comité de Nomenclatura de Genes Humanos, el cual; los clasificó en dos grandes superfamilias basándose en su identidad molecular de secuencia de aminoácidos y en su mecanismo de acción como proteínas ABC o transportadores de eflujo ABC (*ATP-binding-cassette*) y transportadores acarreadores de solutos SLC (*solute carrier transporters*). Generalmente, la familia de transportadores SLC consiste de proteínas con un peso molecular en el rango de 40-90 kDa conteniendo 300-800 residuos de aminoácidos, mientras que la familia ABC tiene pesos de 140-180 kDa y contienen de 1200-1500 residuos.³²

^{30, 31} Guofeng You, Marilyn E. Morris. *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*. John Wiley & Sons, Inc., Publications. 2007.

³² Estudante, M. et al., *Intestinal drug transporters: An overview*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012, 65 (10),1340-1356.

En conjunto estas dos superfamilias de transportadores conforman hasta ahora más de 400 miembros en el genoma humano, sin embargo; a pesar de esta diversidad, solo unos cuantos han demostrado tener una participación definida en el transporte de fármacos clínicamente relevantes.³³

-Transportadores ABC

Los transportadores ABC son proteínas grandes, construidas a partir de una combinación de dominios característicos, incluidas las regiones transmembrana y dominios de unión a ATP citoplasmáticos.

Las 3 principales subfamilias de los transportadores ABC involucradas en la absorción de fármacos son la Glicoproteína P (*multidrug resistance protein* o *MDR1*, gene *ABCB1*), las proteínas de resistencia asociada a múltiples fármacos (*multidrug resistance-associate proteins*, *MRPs*, genes *ABCC1-5*) y la proteína de resistencia de cáncer de mama (*breast cancer resistance protein* *BCRP*, gene *ABCG2*).³⁴

La ubicación de estos transportadores situados en la membrana apical y basolateral de los enterocitos es crítica en la determinación de la extensión y dirección del movimiento en el intestino y en última instancia contribuye al perfil farmacocinético de un fármaco sustrato en el cuerpo.

Dentro de este contexto, P-gp, MRP2, MRP4 y BCRP están idealmente localizadas en la superficie apical de la membrana por lo que funcionalmente constituyen un mecanismo que reduce los niveles de fármaco en el enterocito impidiendo y limitando su absorción en la sangre al expulsarlo desde el interior de la célula de nuevo en el lumen intestinal.

³³ The International Transporter Consortium. *Membrane transporters in drug development*. Nat. Rev. Drug. Discov. 2010, 9(3), 215–236.

³⁴ Oostendorp L., Roos; Beijnen H. Jos and Schellens H.M., Jan. *The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier*. Can. Traeat. Rev. 2009, 35 (2), 137-147.

En cambio, las proteínas MRP1, MRP3, MRP4, y MRP5 están expresadas en la membrana basolateral de los enterocitos; también se clasifican como transportadores de eflujo pero funcionan para transportar el fármaco desde las células en el líquido intersticial al bombear de vuelta sus sustratos hacia la circulación sanguínea, en otras palabras; facilitan la entrada del fármaco en la circulación en lugar de moverlos hacia fuera en la luz intestinal probablemente para proteger al enterocito de la acumulación excesiva de sustratos tóxicos. Desafortunadamente, poco se sabe del transporte basolateral en el epitelio intestinal.^{35,36}

Todos estos transportadores son ATPasas que constituyen sistemas de transporte activo primario al utilizar la hidrólisis de ATP como fuente de energía, lo que les permite el suministro energético necesario para promover el movimiento vectorial transmembrana de sus sustratos afuera de la célula en contra de un gradiente de concentración.

-Transportadores SLC

Los transportadores acarreadores de solutos que se encuentran de manera relevante en el intestino incluyen la familia de transportadores de péptidos (PepT1, gene SLC15A1), la familia de los transportadores polipéptidos de aniones orgánicos (OATPs, gene SLCO: OATP1A2, SLCO1A2; OATP2B1, SLCO2B1), el transportador de ácidos monocarboxílicos MCT1; gene SLC16A1), transportador de sodio- multivitamínico (SMVT; SLC5A6), la familia de transportadores de cationes orgánicos electroneutros (OCTNs, gene SLC22A: OCTN1, SLC22A4; OCTN2, SLC22A5), los transportadores equilibradores de nucleósidos (ENT, SLC29), los transportadores concentradores de nucleósidos (CNT, SLC28) y el transportador de ácido biliar (ASBT).³⁷

³⁵ E. Rosenbaum, Sara. *Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: An Integrated Textbook and Computer Simulations*. John Wiley & Sons, Inc., Publications. 2011.

³⁶ Jeevan R. Kunta and Patrick J. Sinko. *Intestinal Drug Transporters: In Vivo Function and Clinical Importance*. Current Drug Metabolism. 2004, 5 (1), 109-124.

³⁷ El-Kattan, Ayman and Varma, Manthena. Capítulo 1. *Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability*. Topics on Drug Metabolism. 2012, 1-21.

Algunos otros transportadores incluyendo a los transportadores de aniones orgánicos (OATs) y a los transportadores de cationes orgánicos (OCTs), han sido también identificados en el intestino pero parecen tener menor importancia en la absorción oral de fármacos demostrado gran relevancia en transportar sustancias endógenas en la vejiga.

La superfamilia SLC principalmente se caracteriza por contener genes que codifican transportadores de influjo aunque existen algunas excepciones de eflujo. Los transportadores apicales facilitan la entrada del fármaco al enterocito mejorando la absorción de los fármacos, mientras que los transportadores de influjo basolaterales transportan a los fármacos desde la sangre hacia la célula.

Estas proteínas no requieren de ATP para funcionar ya que son transportadores activos secundarios acoplados a iones que residen en diversas membranas celulares, es decir; transfieren sus sustratos al obtener energía creada del intercambio o translocación de iones intra o extracelulares en relación a un gradiente electroquímico.

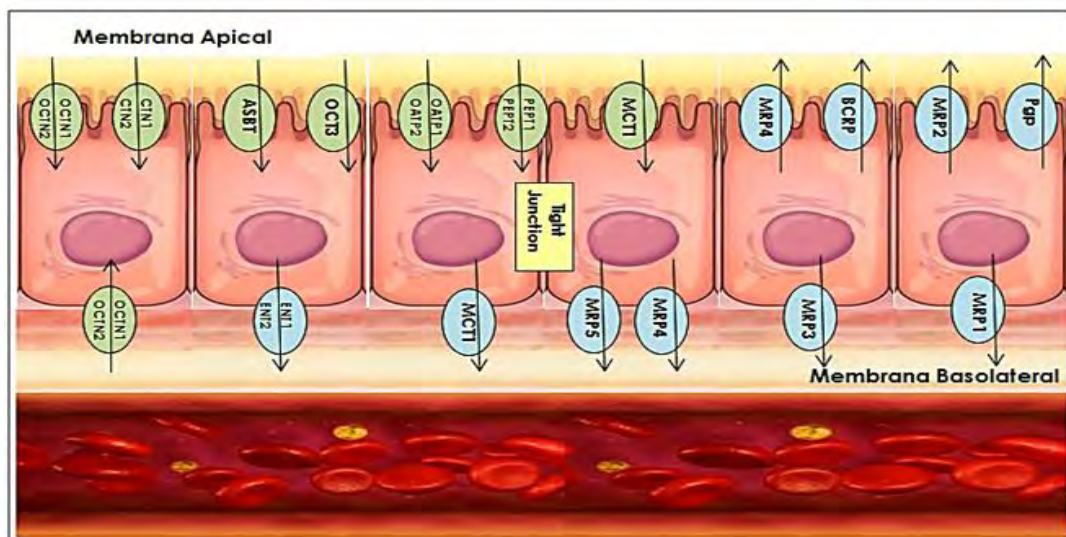


Fig.31. Interacción dinámica entre los transportadores de influjo (verdes) y eflujo (azules) dentro de cualquier célula epitelial dada. La traslocación de fármacos puede ser impedida o facilitada por la localización de los transportadores que están expresados en la membrana basolateral (MRP1, MRP3, MRP4, MRP5, MCT1, ENT1/2, y OCT1/2) y en la membrana luminal (Pgp, MRP2, BCRP, MRP4, PEPT1/2, MCT1, OATP1/2, OCT3, ASBT, CNT1/2 and OCTN1/N2). Imagen modificada de: Weili Huang, Sau Lawrence Lee and Lawrence X. Y. *Mechanistic Approaches to Predicting Oral Drug Absorption. The AAPS Journal, 2009, 11 (2), 217-223*

1.4.2.2. Otros lugares de absorción.

-Mucosa del colon.

La característica más importante de la mucosa cólica es la ausencia de microvillis. Tampoco puede decirse que existan vellosidades propiamente dichas, pero si innumerables pliegues de forma variable con tendencia semiesférica denominados *pliegues semilunares*, que aumentan el área del cilindro fundamental en un factor de 15 a 20. Ello supone que la superficie útil de absorción sea considerablemente más baja que la que posee el intestino delgado, así como mucho menos especializada por la ausencia de portadores que median el transporte activo de muchos compuestos. Por lo demás, la disposición de la membrana lipoidea y la de sus interfases es análoga a la descrita en el intestino delgado.

Es de notar, sin embargo; que el colon pese a su inespecificidad, puede superar en ocasiones al intestino delgado en capacidad absorbente de xenobióticos; este caso se presenta frente a los compuestos básicos de pKa relativamente elevado que están casi totalmente ionizados a pH intestinal y que mantienen en cambio, un porcentaje considerable de forma no ionizada a pH cólico.

1.4.3. Mecanismos de absorción de fármacos a través del epitelio intestinal.

Los mecanismos por los cuales los fármacos atraviesan las membranas celulares son sumamente importantes ya que de ellos depende que culmine el proceso de absorción y que el fármaco adquiera finalmente la concentración más conveniente en los sitios fisiológicos de acción.

En el intestino delgado existen al menos siete posibles mecanismos de transporte distintos para la absorción de fármacos. Una forma muy simple de clasificarlos atiende al punto de vista del requerimiento energético; el transporte que no utiliza energía se define como transporte pasivo mientras que el que la consume se denomina transporte activo.

Además del criterio anterior, existe la posibilidad de dividir estas modalidades de transporte en otros dos subgrupos de acuerdo a si necesitan la presencia de una proteína transportadora de membrana o no dividiéndose a su vez conforme a su funcionamiento en influjo y eflujo activo.

Particularmente, el transporte intestinal hace una distinción adicional en transporte paracelular (entre células adyacentes) y transcelular (a través de las células). El transporte transcelular consiste en tres pasos desde el lumen hasta la sangre: la absorción del fármaco a través de la membrana apical del enterocito seguida por el desplazamiento en el citoplasma, y finalmente; la salida a través de la membrana basolateral hasta alcanzar los capilares que llevan a la vena porta. El transporte paracelular se refiere al paso del fármaco entre los enterocitos por los poros de las uniones estrechas, los cuales; constituyen una vía acuosa para fármacos hidrosolubles.

1.4.3.1. Transporte pasivo.

Este tipo de transporte se caracteriza porque la fuerza impulsora del proceso utilizada para vencer la barrera de energía que impone la bicapa lipídica a las moléculas de fármaco, se obtiene de la formación de un gradiente electroquímico (gradiente de concentración en moléculas sin carga o el gradiente electroquímico en iones). Puede tratarse de una difusión a través de membrana lipídica, o bien; de difusión acuosa o facilitada que comprenden el paso a través de proteínas integrales de membrana como poros, canales, portadores o acarreadores y en el caso del intestino, mediante las uniones intercelulares estrechas.

Difusión simple.

La difusión es un proceso espontáneo en el que las moléculas se mueven libremente a favor de gradientes de concentración que se convierten en la fuerza de conducción, es decir; se fundamenta en la diferencia de concentraciones, pasando el fármaco desde el lado de la membrana con

mayor concentración hacia el otro lado de menor concentración hasta alcanzar el equilibrio a ambos lados de la membrana donde el flujo neto es de cero al estar las moléculas distribuidas por igual y el proceso se detiene. Se trata entonces de un mecanismo de transporte que no precisa gasto energía ya que depende del movimiento aleatorio de las moléculas el cual es un proceso exergónico (energía cinética y térmica).

Se ha observado que sólo la fracción de fármaco no ionizada es capaz de atravesar la membrana celular. Por tanto, el grado de ionización es fundamental y depende del pH del medio y del pKa del fármaco. Además, este tipo de transporte depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas del fármaco como la permeabilidad (que incluye la liposolubilidad), polaridad, tamaño, peso y carga iónica de la molécula. Dependiendo de dichas características, esta modalidad de transferencia puede llevarse a cabo a través de poros acuosos formados en las uniones estrechas o por la doble capa lipídica tal cual.

-Difusión lipídica.

Se lleva a cabo cuando el fármaco atraviesa directamente la bicapa fosfolipídica. La mayoría de los fármacos administrados por vía oral atraviesan las membranas biológicas mediante este mecanismo debido a su carácter hidrofóbico; además, el espesor de la membrana y la velocidad que puede alcanzar una molécula que se desplaza por difusión desde el medio gástrico, hacen que este mecanismo sea bastante eficiente.

-Difusión acuosa.

Uniones Estrechas.

Otra vía de entrada que se clasifica dentro de la difusión pasiva es la que ocurre a través intersticios celulares, es decir; entre las uniones estrechas o “tight junctions” de células epiteliales adyacentes. Este tipo de transporte constituye una vía de transporte extracelular donde las moléculas del fármaco pasan a través de los espacios intercelulares

existentes entre las células formadas por uniones estrechas similares a poros junto a las moléculas de agua en la cual están disueltos.

La absorción por esta vía es en general baja, ya que las uniones restringen el movimiento libre entre las células epiteliales debido a su pequeño tamaño de poro y a que corresponden sólo al 0.01% del superficie total de la membrana intestinal. Además, se van compactando progresivamente desde el yeyuno hacia el colon. No obstante, hay evidencia de que su diámetro puede incrementarse mediante un proceso regulatorio celular. Existen esfuerzos para incrementar la permeabilidad paracelular mediante la co-administración de agentes que modulen la apertura de las uniones estrechas como el taurocolato sódico, EDTA, papaína, bromelina, tensoactivos, quitosanos, ácido poliacrílico o polímeros tiolados.³⁸

Los factores que intervienen en la difusión acuosa son el número, tamaño y diámetro de los poros, es decir; sólo pasará agua y lo que lleve disuelto de tamaño inferior al mismo, al igual que grado de ionización, tamaño y peso de la molécula, el gradiente de potencial electroquímico, la presión hidrostática y la selectividad del canal.

Difusión facilitada

El transporte de moléculas que son demasiado grandes o demasiado polares para atravesar la membrana por difusión acuosa es mediado por la presencia de sistemas de transporte en su mayoría constituidos por proteínas integrales. Este mecanismo de transporte es la difusión facilitada y es menos usual en comparación con las diferentes variantes de la difusión simple (5-10%). Consiste en el paso de moléculas a favor del gradiente de concentración (de mayor concentración a menor concentración) con la diferencia de que requiere la existencia de intercambios asistidos por proteínas, las cuales; contienen algunos o

³⁸ Herrera Ruiz, Dea, et.al. *Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos*. Rev Mex Cienc Farm 43 (1) 2012.

incluso muchos segmentos transmembranales para formar canales, poros o acarreadores que se intercalan y atraviesan la membrana comunicando las partes acuosas que se hallan a uno y otro lado de la misma lo que facilita el movimiento de moléculas polares o iones con carga sin interaccionar directamente con su interior hidrofóbico.

Poros o canal.

Los canales son estructuras proteicas que forman un conducto en la membrana a través del cual consiguen pasar determinados solutos por difusión; pueden ser abiertos o de compuerta (gating).

Los de compuerta se caracterizan por alternar entre dos posiciones: un estado cerrado e inactivo y un estado activo o abierto. El hecho de que adopten una u otra posición depende de múltiples factores, como la unión al canal de un determinado ligando, cambios en el potencial de membrana, deformación mecánica, etc. La mayoría de estos canales son pequeños y muy selectivos y casi todos intervienen en el transporte de iones por lo que son descritos también como canales iónicos.

Un canal puede ser altamente selectivo para un determinado ión o soluto, o bien; puede limitar únicamente el tamaño, permitiendo el paso a su través de cualquier ión de calibre inferior. La tasa de movimiento del soluto a través del canal abierto puede llegar a ser de 10^6 a 10^9 iones/seg tasa mayor que la catalítica para muchas enzimas y que se podría igualar con el movimiento por difusión libre en un medio acuoso.

Los canales abiertos son denominados poros de membrana; al ser relativamente más grandes y más inespecíficos permiten la libre difusión de cualquier molécula del tamaño y carga apropiados. Se ha calculado que para los poros localizados en el intestino delgado tienen un radio ente 0.4 y 1 nm.³⁹

³⁹ Doménech Berrozpe, José. et. al. Biofarmacia y Farmacocinética Vol.II. Editorial Síntesis, 2008.

Proteínas Acarreadoras.

Los portadores o acarreadores de membrana se distinguen de los canales y poros en que son proteínas alostericas, es decir; alternan entre dos estados conformacionales y disponen de un lugar de unión que les permite reconocer y asociar en forma específica la molécula que será transportada. Este proceso implica cuatro pasos: unión reversible del soluto al portador, cambio conformacional del portador, desplazamiento del complejo intermedio hacia la superficie opuesta de la membrana y disociación del complejo en contacto directo con el citoplasma del enterocito.

En resumen, después de unir el soluto experimenta un cambio conformacional alternativo formado por el complejo intermedio proteína-sustrato que le permite realizar la transferencia del mismo liberándolo hacia el otro lado de la membrana a la vez que el transportador retoma su conformación original.

Este tipo de transporte es mucho más lento que el que se realiza a través de canales, pues se movilizan de 10² a 10³ moléculas/seg. La capacidad del sistema dependerá del número de proteínas transportadoras que haya en la membrana en un momento dado y del número de moléculas que sea capaz de unir cada una de ellas ya que este mecanismo es saturable a una concentración que ocupe todos los sitios de unión de la proteína transportadora y, por ende; es competitivo.

En consecuencia, dentro de las características más notables de estas proteínas destacan su selectividad en cuanto a que solo un determinado tipo de moléculas con determinadas características afines o estructurales pueden unirse al portador; su capacidad de saturación referida a que el número de moléculas que se absorben depende del número de portadores existentes en la membrana absorbente y su variabilidad de expresión regional.

Desde el punto de vista biofarmacéutico, la selectividad y saturabilidad son muy importantes. La selectividad implica la existencia de fenómenos de inhibición ya que dos compuestos parecidos estructuralmente pueden competir por la unión a su portador, inhibiéndose la absorción de uno de ellos o de ambos; se trata por lo tanto de un fenómeno de inhibición competitiva que se podrá reflejar en una pérdida o aumento de la Biodisponibilidad. Por otra parte, la saturabilidad implica dependencia de la dosis, es decir; si se aumenta la dosis se produce una saturación del portador existiendo una dosis máxima o límite a partir de la cual no se incrementa la velocidad de transporte de fármaco. Por ende, los fármacos que son sustrato muestran una cinética no lineal.

Se distinguen tres tipos de procesos según el número y dirección de movimiento de los solutos a transportar:

Uniportadores: son proteínas que transportan a las moléculas en un solo sentido a través de la membrana

Simportadores o Contranportadores: transportan dos solutos simultáneamente en la misma dirección.

Antiportadores: Transportan dos solutos en direcciones contrarias.

Otro grupo de proteínas transportadoras requiere de la provisión de energía externa para realizar el transporte, por lo que constituyen sistemas de transporte activo.

1.4.3.2. Transporte Activo

Este tipo de transporte no ocurre de forma espontánea de modo que se requieren sistemas específicos que promuevan tal mecanismo además de un consumo externo de energía dado que el movimiento se realiza en contra de gradiente de potencial químico.

El transporte activo, es una modalidad de transferencia altamente especializada y mediada por un complejo transportador de carácter

fundamentalmente proteico que tiene las mismas propiedades que las que realizan la difusión facilitada; es decir, se unen en forma selectiva con su soluto particular y lo mueven en un proceso impulsado por los cambios de conformación de la proteína con la diferencia de que para su funcionamiento requieren el ingreso de energía (ATP ó gradiente de concentración electroquímico).

Al igual que la difusión facilitada, los sistemas de transporte activo utilizan proteínas transportadoras con un número finito de sitios de unión al ligando, por lo tanto; poseerán cinética saturable y serán susceptibles de inhibición competitiva con sustancias afines como su sustrato endógeno, o bien; con agentes que interfieran con la producción de energía o con la carencia de sustancias necesarias para la síntesis y funcionamiento de la proteína transportadora.

Dependiendo de la fuente de fuerza motriz utilizada para producirlo, el transporte activo se subdivide en dos tipos:

Transporte activo primario (directo): Utiliza la energía libre almacenada en los enlaces del adenosintrifosfato (ATP) al hidrolizarlo. Las proteínas que realizan este tipo de transporte a menudo se conocen como bombas o ATPasas ya que su funcionamiento es análogo al de las bombas hidráulicas que elevan agua hacia tanques ubicados a grandes alturas a expensas del aporte de energía externa.

Transporte activo secundario (indirecto): También llamado cotransporte, utiliza la energía de la disipación de un gradiente de iones (H^+ , Na^+ y Ca^{++}) previamente generado por los transportadores primarios. Es decir, el transporte activo secundario usa indirectamente la energía derivada de la hidrólisis del ATP para que la molécula pase a través de la membrana a favor de un gradiente de concentración iónico.

- Eflujo.

Especialmente interesantes son las llamadas bombas de expulsión. En contraste con los transportadores que promueven la absorción, existen otros transportadores que presentan el efecto contrario. Los transportadores ABC son claros ejemplos de transporte activo primario al controlar el contraflujo unidireccional de solutos a través de las membranas biológicas desde el citoplasma celular hacia el lumen intestinal lo que les confiere la capacidad de limitar la absorción. Este mecanismo es llamado eflujo y se atribuye a proteínas localizadas en la membrana apical de los enterocitos tales como la Glicoproteína P, la proteína de resistencia asociada a múltiples fármacos MRP2 y la proteína de resistencia al cáncer de mama BCRP.

Los transportadores de eflujo presentan baja selectividad y se consideran una limitante para la absorción de fármacos y un problema importante para sus aplicaciones terapéuticas por lo que el estudio de sus características y afinidades resulta de gran relevancia.

1.4.3.3. Otros mecanismos de transporte.

Transporte por vesículas.

En este tipo de transporte las sustancias pueden atravesar la membrana celular sin establecer relación alguna con los componentes de la misma sea cual sea el gradiente de concentración. Para ello, utilizan la formación de vesículas con la propia membrana y en el interior de las mismas se sitúan fluidos, partículas o materiales para su desplazamiento. Existen varias modalidades.

-Endocitosis: Es un proceso en el que la entrada del soluto se realiza mediante la formación de una vesícula intracelular gracias a la invaginación de la membrana plasmática que se rompe en el interior de la célula; cuando las sustancias son partículas sólidas de gran tamaño el proceso recibe el nombre de fagocitosis, si están en solución se le denomina pinocitosis.

Esta ruta compleja tiene reducida capacidad aplicable para fármacos que son considerados como macromoléculas altamente potentes y que son activos a bajas concentraciones.

Transporte por formación de pares iónicos.

Para algunos fármacos electrolitos fuertes o moléculas altamente ionizadas que mantienen su carga a cualquier pH fisiológico, se puede dar su absorción por unión de los mismos a compuestos de carga contraria, dando lugar a un complejo neutro que difunde a través de la membrana.

Cabe resaltar que la modalidad de transporte por pares de iones es un mecanismo propuesto para explicar el paso de ciertos compuestos fuertemente ionizados a través de la membrana, donde la formación de complejos neutros (pares de iones) con sustancias endógenas como la mucina permiten su difusión.

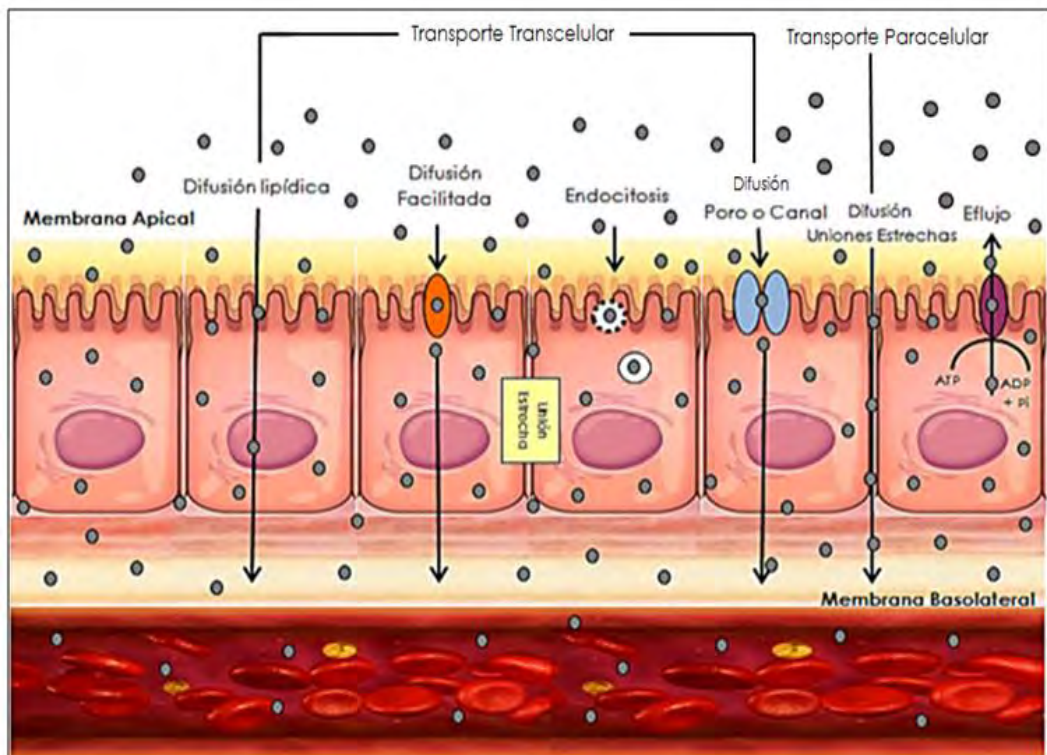


Fig.32. Representación esquemática del epitelio intestinal y los mecanismos de transporte de membrana disponibles en los enterocitos para la absorción de fármaco después de la administración oral.

2. GLICOPROTEÍNA P

2.1. Antecedentes.

Orígenes evolutivos de la resistencia a múltiples fármacos (MDR).

Los primeros indicios sobre el origen de la Glicoproteína P datan a partir de 1901 cuando el químico alemán Paul Ehrlich, llamado el padre de la quimioterapia moderna; creó el primer compuesto sintético derivado del arsénico (*salvarsán o arsfenamina*) ideado específicamente para curar una enfermedad infecciosa causada por protozoos que aquejaba en esa época a la humanidad, la sífilis (*Treponema pallidum*). Durante mucho tiempo el salvarsán fue el medicamento viable más eficaz contra el brote de la sífilis, sin embargo; en 1907 Ehrlich observó en sus experimentos una extraña reacción, en el curso del tratamiento con su agente quimioterapéutico arsenical algunas cepas de estos parásitos tripanosomas sobrevivían al efecto letal del fármaco desarrollando así una especie de resistencia o quimioresistencia.

Desde ese momento se lamentó que este fenómeno persiguiera el desarrollo de nuevos fármacos "como una sombra fiel" ⁴⁰ ya que después de años de experimentos, el mismo patrón se observó con el descubrimiento de los antibióticos y su introducción clínica (1940) reconociéndose como un proceso biológico de carácter genético y heredable entre los miembros de la misma especie donde la continua exposición y presión selectiva por fármacos específicos ocasionaba que los mismos microorganismos desarrollaran complejos mecanismos de resistencia adicionales como un claro ejemplo de adaptación y evolución que incluyen el concepto básico de la selección natural.

La solución al problema parecía entonces ser bastante simple. En teoría, el tratamiento junto con la administración de otros fármacos que actuaran de manera diferente debería excluir la consecuencia de la resistencia

⁴⁰ G. J., Ebrahim. *Bacterial resistance to antimicrobials*. Journal of Trop. Pediatrics. 2010, 56 (3), 141-143.

porque la probabilidad de que la misma célula se volviera resistente a ambos tratamientos era muy pequeña. En base a este razonamiento, la quimioterapia de combinación parecía ser la respuesta, sin embargo; la situación se volvió alarmante cuando la resistencia se hizo simultánea a múltiples antibióticos; tal fue el caso de las penicilinas y cefalosporinas en enterobacterias como *Escherichia coli*, *Shigella sp.* y *Salmonella sp.* a comienzos de la década de 1960.⁴¹

En el transcurso de la historia, se identifica análogamente este factor de resistencia en células cancerosas con la introducción y aplicación de la era de la quimioterapia contra el cáncer. Dado que la quimioterapia anticancerígena tenía sus raíces en la quimioterapia antimicrobiana que se desarrolló desde el cambio de siglo, la resistencia clínica a los fármacos contra el cáncer no era del todo inesperada.

Poco después de la Segunda Guerra Mundial (1948), Sidney Farber uno de los pioneros de la quimioterapia oncológica, desarrolló los primeros fármacos antagonistas del ácido pteroilglutámico comúnmente llamado ácido fólico como la aminopterina y ametopterina (hoy metotrexato) que eran capaces de producir la remisión en niños con leucemia linfocítica aguda. No obstante, aunque la remisión era breve, demostraron su potencial en el tratamiento de quimioterapia y los dos principios de sus investigaciones habían quedado establecidos: los antimetabolitos podían suprimir la proliferación de células malignas y podían de esta forma restablecer el funcionamiento normal de la médula ósea y dos; todos incluyendo microorganismos y células cancerosas, tenían la capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia progresivos que llevaban a reincidir después de un tiempo a la enfermedad tanto infecciosa como en el cáncer por lo que la causa subyacente debía ser en principio la misma.

⁴¹ Alvarado Ávila, Ana Karen. *Tesis: Participación de las bombas de expulsión en la resistencia de las bacterias a los antibióticos*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, 2012.

La resistencia a fármacos se documentó experimentalmente por primera vez en 1950 por Joseph H. Burchenal al reconocer en líneas celulares de leucemia murina que la incidencia de uso de los antagonistas del ácido fólico como el 4-amino-N¹⁰-metil-ácido pteroilglutámico podía inducir a la aparición progresiva de un patrón de resistencia cruzada a fármacos antineoplásicos diferentes lo que sugería un mecanismo renuente en común.⁴²

En consecuencia, la mayor parte de los postulados de la quimioterapia antimicrobiana fueron adoptados para remediar la resistencia cruzada que se presentaba ahora ante el cáncer, de esta manera los investigadores de esa época se dedicaron a la producción de nuevos fármacos anticancerígenos y al desarrollo de protocolos para la administración de fármacos en combinación.

Estas estrategias produjeron victorias reales en la práctica clínica con altas tasas de curación en algunas leucemias infantiles, sin embargo; pusieron en evidencia que la mayor parte de los pacientes con cáncer que respondían inicialmente a la quimioterapia presentaban recaídas en su evolución y terminaban siendo insensibles al tratamiento por la llamada en ese entonces resistencia adquirida a fármacos antineoplásicos debido a la aparición de probables mecanismos que adoptaban las células tumorales o malignas para su propia protección ante los efectos de la quimioterapia.⁴³ Además, los fallos más desconcertantes eran en particular los de la quimioterapia combinada, ya que parecían desafiar toda comprensión al estar en contradicción con el principio fundamental que hasta entonces imperaba en las bases de la terapia antitumoral, el uso de una combinación de fármacos no relacionados debía de eliminar la aparición de una enfermedad resistente.

⁴² Callao Molina, Virginia. *Tesis Resistencia a múltiples fármacos. Estudio in vitro del efecto modulador de PSC 833 y Tamoxifen en un modelo experimental.* Universitat de Lleida. Departamento de Medicina, 1997.

⁴³ Ling, Victor. *Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance.* Cancer Chemother. Pharmacol. 1997, 40 (1), S3–S8.

Desde entonces; los tumores empezaron a ser ampliamente estudiados y aislados en sistemas experimentales para intentar aclarar los mecanismos implicados. Muchas teorías se propusieron para explicar este fenómeno tan heterogéneo pero pocas pudieron ser comprobadas adecuadamente.

Inicialmente, se llegó al planteamiento que la resistencia simultánea a un número de fármacos era una ocurrencia común de forma inesperada. No fue sino hasta finales de 1960, que la investigación sobre genética y mecanismos de resistencia bacteriana así como la naturaleza heredable del fenotipo de resistencia a fármacos en modelos murinos trasplantados y en cultivos de células tumorales resistentes junto con la rápida aparición y comprensión de los mecanismos bioquímicos de acción de ciertos agentes antineoplásicos paulatinamente introducidos, que contribuyeron a retomar una tendencia de los primeros investigadores para proporcionar una explicación racional de los fracasos de la quimioterapia de combinación, centrándose en las características genéticas de las células tumorales como los determinantes de la sensibilidad y resistencia de los fármacos.

Este enfoque fue el punto de partida que suscitó algunos de los descubrimientos más importantes en la genética, farmacología y la biología celular ya que se definieron las primeras ideas sobre las propiedades fundamentales de lo que hoy se conoce como el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos.

En 1968 David Kessel demostró que uno de los mecanismos por los cuales las células cancerosas se volvían resistentes era una disminución en la acumulación intracelular del fármaco en células leucémicas murinas resistentes a alcaloides de la vinca.⁴⁴ Los datos obtenidos indicaban que la incapacidad de las células para retener la Daunomicina o Daunorrubicina (fármaco quimioterapéutico de la familia de las

⁴⁴ Kessel, D.; Botterill, V.; Wodinsky, I. *Uptake and retention of Daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response*. Cancer Res. 1968, 28 (5), 938–41.

antraciclina para tratar concretamente algunos tipos específicos de leucemia) la ocasionaba algún tipo de barrera o un determinante celular de respuesta a los fármacos a nivel membrana que mantenía fuera al medicamento y que le impedía alcanzar el interior de la célula, donde tendría su efecto letal.

La disminución intracelular de fármaco, fue probablemente el mecanismo de resistencia más estudiado y los avances en esta línea investigación se vieron reflejados con la primera introducción a literatura científica del concepto de resistencia a múltiples fármacos (**MDR**) por sus siglas en inglés *multidrug resistance*, que se estableció como un fenómeno bien caracterizado en el trabajo pionero de June Biedler y Rihem H. en 1970. Experimentalmente identificaron en orden decreciente una resistencia cruzada a un amplio grupo de fármacos antineoplásicos: Mitomicina, Vinblastina, Vincristina, Puomicina, Daunomicina, Demecolcina, y Mitomicina C en líneas de células tumorales seleccionadas para ser resistentes a la Actinomicina D y a la Daunomicina.⁴⁵

El fenómeno MDR lo definieron como la capacidad que tienen las células para desarrollar resistencia a un fármaco que se usa como agente de selección y, además; presenta simultáneamente resistencia cruzada a múltiples fármacos después de su exposición, todos ellos con características bioquímicas, estructurales y funcionales no relacionadas o diferentes al fármaco que se usó en la selección.

Estas investigaciones apoyaron la hipótesis de Kessel en donde el desarrollo de la resistencia a la Actinomicina D era debido a la diferencia cualitativa en la membrana de la célula, que resultaba en una disminución de la permeabilidad de la misma Actinomicina D y otros fármacos.

⁴⁵ Biedler, J.L. and Rihem, H. *Cellular Resistance to Actinomycin D in Chinese Hamster Cells in Vitro: Cross-Resistance, Radioautographic, and Cytogenetic Studies*. Cancer Res. 1970, 30 (4), 1174–1184.

La historia propiamente de las proteínas causantes del fenómeno MDR se inicia en 1973; Keld Dano y sus colaboradores estudiaron el mecanismo previamente reportado de la disminución de la acumulación de Daunomicina y lo compararon en células tumorales ascíticas de Ehrlich “wyld type” y resistentes.⁴⁶ Confirmaron que el fenotipo MDR se debía a un descenso en la acumulación intracelular de los fármacos en las células resistentes ya que la tasa de absorción neta de Daunomicina era menor en resistentes que en las células de tipo salvaje, sin embargo; aportaron un elemento desconocido hasta el momento, la disminución de la concentración intracelular del fármaco era causada por el aumento de un mecanismo de extrusión dependiente de energía al que denominaron como eflujo llevando a la hipótesis de la existencia de un transportador o bomba a nivel de membrana en las células resistentes que excluyera activamente al fármaco fuera de la célula una vez que este había conseguido entrar en su interior. Estos hallazgos proporcionaron las pautas para sugerir que los fármacos que presentaban resistencia MDR estaban relacionados por la acción del mismo mecanismo de eflujo.

En 1974 se obtuvieron resultados para confirmar que la resistencia a múltiples fármacos era causada por un mecanismo dependiente de energía. Este modelo experimental se basó en las observaciones de la cinética de flujo de fármacos dentro y fuera de las células. Se encontró que cuando una célula resistente temporalmente era “envenenada” con cianuro, compuesto utilizado para inhibir la producción de energía; la célula se comportaba sensible a los fármacos, es decir; no podía mantener fuera de su estructura al fármaco. En cambio, cuando el cianuro era lavado y eliminado de la célula, el metabolismo normal se restauraba y la célula una vez más lo excluía.⁴⁷

⁴⁶ Dano, Keld. *Active outward transport of Daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells.* Biochim. Biophys. Acta 1973, 323(3), 466–83.

⁴⁷ See, Y. P.; Carlsen, S. A.; Till, J. E.; Ling, V. *Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide.* Biochem. Biophys. Acta 1974, 373 (2), 242–52.

La primera evidencia fehaciente de una correlación específica entre el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y el transporte de eflujo fue descubierta en 1976 por Victor Ling en colaboración con Rudolph L. Juliano. Encontraron al estudiar las células de ovario de hámster chino seleccionadas en cultivo para la resistencia a la Colchicina con resistencia cruzada a una amplia gama de fármacos anfifílicos que el fenotipo MDR se debía a una alteración proteica de la membrana que reducía la permeabilidad de los mismos.⁴⁸

Estudios de marcaje de superficie celular y electroforesis revelaron que las células en sus membranas expresaban un único componente que aparentemente contenía carbohidratos y que no se observa en las células de tipo salvaje. A través de estudios de incorporación metabólica de precursores de hidratos de carbono y proteínas, y mediante el uso de la proteólisis selectiva, este componente demostró ser una glicoproteína de superficie celular o de membrana de elevado peso molecular (170 000 daltons) que se correlacionaba cuantitativamente con el grado de quimiorresistencia de la célula y con la disminución de la permeabilidad del fármaco.

En virtud de que esta proteína de membrana mostraba una cadena de hidratos de carbono asociados covalentemente en forma de oligosacáridos y parecía inicialmente ser la responsable de conferir los trastornos de permeabilidad de la membrana con respecto a un número de fármacos aparentemente no relacionados, la nombraron Glicoproteína P (*Permeability Glycoprotein*, abreviada como *P-gp/MDR1/ABCB1/Pgp-170/PGY1/antígeno CD243*) que por sus características; parecía una buena candidata para ser una bomba de expulsión. Además, debido a que su sobreexpresión en la membrana (3-4% del total de proteínas de

⁴⁸ Juliano, R. L.; Ling, V. *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim. Biophys. Acta 1976, 455 (1), 152–162.

membrana) parecía ser exclusiva del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos se le reconoció también como MDR clásica o típica.^{49,50}

Poco después de este descubrimiento, varios trabajos obtuvieron resultados similares en sistemas de cultivo de tejidos diferentes. Una variedad de células de ratón, hámster y humano seleccionadas para la resistencia a cualquiera de una variedad de fármacos: Colchicina, Daunomicina, Vinblastina, Vincristina, etc. mostraron una amplia resistencia cruzada reduciendo la acumulación intracelular del fármaco control, al igual que alteraciones en la membrana donde la más consistente era la sobreexpresión de una glicoproteína de la superficie celular de alto peso molecular similar en tamaño a la Glicoproteína P.

Perfeccionando el modelo MDR, en 1979 se realizó la primera purificación de la Glicoproteína P en sistemas de lípidos sintéticos como vesículas de membrana aisladas y una fuerte evidencia en apoyo de su papel en la resistencia a los medicamentos se produjo en 1982, cuando se demostró que el ADN mediaba la transferencia del fenotipo MDR ya que al traspararlo de líneas celulares resistentes a las células no resistentes era capaz de conferir resistencia a estas últimas lo que al mismo tiempo se relacionaba con la expresión de la Glicoproteína P.^{51,52,53}

Tiempo más tarde en 1984 se demostró la correlación del fenómeno MDR con la amplificación de una secuencia específica de DNA. En otras

⁴⁹ Sánchez Suárez, Patricia y Benítez Bribiesca, Luis. *Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Fármacos*. Cancerología 1. 2006, 187-199.

⁵⁰ A. Sheps, Jonathan and Ling, Victor. *Preface: the concept and consequences of multidrug resistance*. Pflugers Arch - Eur J Physiol. 2007, 453, 545–553.

⁵¹ Riordan, J. R.; Ling, V. J. *Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability*. J. Biol. Chem. 1979, 254 (24), 12701–12705.

⁵² Debenham, P. G.; Kartner, N.; Siminovitch, L.; Riordan, J. R.; Ling, V. *DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression*. Mol. Cell. Biol. 1982, 2 (8), 881–889.

⁵³ Robertson, S.M., Ling, V. and Stanners, C.P. *Co-amplification of double minute chromosomes, multiple drug resistance, and cell surface P-glycoprotein in DNA-mediated transformants of mouse cells*. Mol. Cell. Biol. 1984, 4 (3), 500–506.

palabras, un solo gen podría ser responsable de la resistencia cruzada múltiples a fármacos (gen MDR).⁵⁴

Finalmente, la culminación de estas observaciones tuvo lugar al clonar y secuenciar en 1986 el gen que confería la resistencia a fármacos en líneas celulares humanas mediante transfección. De esta manera, fue posible determinar su estructura primaria llegando al descubrimiento que este mismo gen codificaba la expresión de la Glicoproteína P en la superficie de membrana por lo que lo denominaron MDR1 (*multidrug resistance 1 gene*) siendo la prueba conclusiva de la función putativa como una bomba dependiente de energía y de la competencia de su mecanismo de acción como el primer transportador de membrana eucarionte para unir y expulsar múltiples fármacos a través de una bicapa.

Esta teoría fue postulada en base a las homologías de secuencia con las proteínas de transporte bacterianas ABC, muchas de ellas; factores de virulencia o de resistencia a los antibióticos como la proteína de secreción hemolisina B HlyB (*hemolysin translocation ATP-binding protein*), el sistema malk para el transporte de maltosa en *E. coli*, así como el complejo HisP (*Histidine transport ATP-binding protein*) en *Salmonella typhimurium*.^{55,56,57,58}

⁵⁴ Roninson, I. B.; Abelson, H. T.; Housman, D. E.; Howell, N.; Varshavsky, A. *Amplification of specific DNA sequences correlates with multidrug resistance in Chinese hamster cells*. Nature 1984, 309 (5969), 626–628.

⁵⁵ Ueda, K.; Cornwell, M. M.; Gottesman, M. M.; Pastan, I.; Roninson, I. B.; Ling, V.; Riordan, J. R. *The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986, 141 (3), 956–962.

⁵⁶ Shen, D. W.; Fojo, A.; Chin, J. E.; Roninson, I. B.; Richert, N.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. *Human multidrug-resistant cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification*. Science (New York, N.Y.) 1986, 232 (4750), 643–645.

Gros, P.; Croop, J.; Roninson, I.; Varshavsky, A.; Housman, D. E. *Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1986, 83 (2), 337–341.

⁵⁷ Gros, P.; Croop, J.; Housman, D. *Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins*. Cell 1986, 47 (3), 371–380.

⁵⁸ Chen, C. J.; Chin, J. E.; Ueda, K.; Clark, D. P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Roninson, I. B. *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells*. Cell 1986, 47 (3), 381–389.

Desde ese momento, la Glicoproteína P fue ampliamente estudiada y caracterizada bioquímicamente tanto en líneas celulares murinas como humanas realizándose numerosas aportaciones para elucidar su estructura y mejorar los conocimientos sobre su mecanismo de su acción.

Los recientes avances en técnicas más específicas de biología molecular y metodologías de caracterización inmunológica fueron de vital importancia para dar una lectura más precisa de su estructura al igual que en el establecimiento de la dirección que tomaría más tarde el rumbo de la investigación, sobretodo en relación de su función natural en ausencia de retos tóxicos ya que la conservación de su identidad génica a través de diferentes especies era indicativo de un componente imprescindible de la membrana plasmática celular.

Esta premisa, en concierto con el perfil de expresión en una serie de barreras farmacológicas, su conocida capacidad de transporte vectorial y la hipersensibilidad a los fármacos en ratones knockout, llevaron a la expectativa razonable de proponer una función adicional para esta proteína con diferentes finalidades en distintos tejidos (1987).^{59,60}

Su expresión constitutiva en numerosos órganos normales y en diferentes tipos celulares que tienen funciones secretoras (particularmente en el tracto gastrointestinal, hígado y riñón al igual que en tejidos sangre-barrera especiales como en el caso de cerebro, placenta y testículos) sugirió en 1989 que el papel fisiológico de la Glicoproteína P era precisamente de protección y resistencia desafiando la noción de que solamente estaba dispuesta para efluir fármacos al funcionar como un complejo sistema de defensa celular que probablemente evolucionó como

⁵⁹ Fojo, A.T.; Ueda, K.; Slamon, D.J.; Poplack, D.G.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. *Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987, 84 (1), 265–269.

⁶⁰ Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M. M.; Pastan, I.; Willingham, M. C. *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987, 84 (21), 7735–7738.

una estrategia de supervivencia adoptada por el organismo para el reconocimiento y eliminación de amenazas de toxinas exógenas, microorganismos y xenobióticos de naturaleza diversa e impredecible.⁶¹

Este hallazgo marcó una acentuada línea divisora en relación a su estudio entre la sobreexpresión ligada al concepto de resistencia a múltiples fármacos en células cancerosas y su expresión en células normales como uno de los transportadores más importantes en controlar la absorción y disposición de fármacos.

Casi una década después en 1997, se reconoció la importancia de la glicoproteína P en el epitelio intestinal ya que su expresión en la membrana apical de los enterocitos era el principal factor que limitaba la absorción y Biodisponibilidad oral de fármacos lipofílicos (como el Paclitaxel). Sin embargo, fue hasta el 2003 que su papel funcional de eflujo se estableció sólidamente en la Farmacocinética como un determinante de los fármacos administrados oralmente al interferir en los procesos absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Más 50 años han transcurrido desde las primeras publicaciones del fenómeno MDR que en su descripción inicial se relacionó con el descubrimiento de una proteína de membrana, el transportador Glicoproteína P; posteriormente se han descubierto otros mecanismos causantes del fenotipo celular multiresistente, como los ligados a otras proteínas transportadoras, a las alteraciones de enzimas como las topoisomerasas, o a sistemas detoxificantes como el del glutatión (GSH).

En años recientes, la familia de transportadores ABC ha continuado creciendo convirtiéndose en una superfamilia de proteínas transmembrana evolutivamente conservada con alta diversificación

⁶¹ Schinkel, A. H. et al. *Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs*. Cell 1994, 77 (4), 491–502.

prácticamente en todos los reinos de vida a tal grado de ser considerado el eflujo la base de la MDR en células procariotas y eucariotas.

En el genoma humano, se han descrito hasta el momento alrededor de 49 miembros de estas proteínas, su homología en secuencia de aminoácidos y organización revelaron que se pueden dividir a su vez en 7 subfamilias designadas con las letras de la A a la G: ABCA (12 miembros), ABCB (11 miembros), ABCC (13 miembros), ABCD (4 miembros), ABCE (un miembro), ABCF (3 miembros) y ABCG (5 miembros).

Aunque todavía existen muchos miembros con funciones desconocidas, sus características son múltiples y variadas que se extienden a transportadores de membrana, canales de iones e incluso receptores. Se identifican al menos 14 proteínas asociadas con diversas enfermedades o trastornos como resultado de mutaciones, por ejemplo; ABCB4 está relacionada con la colestasis intrahepática en el embarazo, fibrosis quística codificada por ABCC7, adrenoleucodistrofia (ABCD1) y síndrome de Dubin-Johnson (ABCC2).

Sólo los miembros de 3 subfamilias (B, C y G) están implicados en el así llamado fenotipo MDR actuando de manera simultánea como transportadores de eflujo: evidentemente la P-gp (MDR1/ABCB1) sobre la cual se enfoca este trabajo, las proteínas de resistencia asociada a múltiples fármacos MRP (ABCC1/MRP1, ABCC2/MRP2, probablemente también ABCC3-6, y ABCC10-11) y más recientemente la proteína de resistencia al cáncer de mama (ABCG2/BCRP/MXR/ABCP).

A pesar de las diferencias observadas en sus funciones, especificidad de sustrato, mecanismo molecular, y localización in vivo, comparten un alto grado de homología secuencial, reguladora y estructural.

Actualmente, la P-gp se reconoce ampliamente como un factor para limitar la Biodisponibilidad oral de numerosos fármacos al igual que como el marcador genético MDR mas representativo y factor pronóstico en la quimioterapia simbolizando uno de los principales retos para tratar varios tipos de cáncer.^{62,63,64,65,66,67}

Este enfoque en vías tanto fisiológicas como patológicas, ha promovido nuevos e importantes temas de investigación. Específicamente, en la farmacéutica se ha incursionado en la comprensión de su estructura, genética y funcionamiento para mejorar la previsibilidad de modelos dinámicos así como la introducción de elementos reguladores que controlen los niveles de P-gp como una estrategia terapéutica o de formulación ya sea para superar el problema de la resistencia a los medicamentos en el clínica o para mejorar la Biodisponibilidad de muchos fármacos que son sustrato de esta proteína. Además, su investigación se amplía en lo que respecta a su localización celular, niveles y patrones de expresión en tejidos, mecanismos de transporte, sustratos, desarrollo de inhibidores, interacciones fármaco-fármaco, variantes genéticas en términos de polimorfismos que pueden impactar en la especificidad de sustrato así como susceptibilidad a enfermedades y correlación de la actividad metabólica con el CYP3A4.

⁶² Sparreboom, A.; van Asperen, J.; Mayer, U.; Schinkel, A. H.; Smit, J. W.; Meijer, D. K.; Borst, P.; Nooijen, W. J.; Beijnen, J. H.; van Tellingen, O. *Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997, 94 (5), 2031–5.

⁶³ Judith Van Asperena, Olaf Van Tellingen and Josh Beninjen. *The pharmacological role of p-glycoprotein in the intestinal epithelium*. Pharmacological Research, 37 (6), 1998.

⁶⁴ Hunter J, Hirst BH. Intestinal secretion of drugs. *The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption*. Adv. Drug Deliv. Rev. 1997; 25 (2-3), 129-157.

⁶⁵ Schinkel, A. H.; Mayer, U.; Wagenaar, E.; Mol, C. A.; van Deemter, L.; Smit, J. J.; van der Valk, M. A.; Voordouw, A. C.; Spits, H.; van Tellingen, O.; Zijlmans, J. M.; Fibbe, W. E.; Borst, P. *Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997, 94 (8), 4028–4033.

⁶⁶ M. F. Fromm. *Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans*. European Journal of Clinical Investigation. 2003, 33 (2), 6–9.

Jiunn H. Lin and Masayo Yamazaki. *Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics Clinical Implications*. Clin Pharmacokinet 2003; 42 (1), 59-98.

Jiunn H. Lin and Masayo Yamazaki. *Clinical Relevance of P-Glycoprotein in Drug Therapy Drug Metabolism Rev*. 2003, 35 (4), 417–454.

⁶⁷ Martin F. Fromm. *Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers*. Trends in Pharmacological Sciences. 2004, 25 (8), 423-429.

2.2. Distribución tisular y función.

Adicionalmente a su función primaria en la resistencia de células tumorales, existe evidencia substancial que esta bomba de eflujo tiene funciones sobrepuestas para conferir defensa intrínseca a los tejidos sanos. Distinguir su localización celular es crucial para comprender el impacto en el comportamiento cinético in vivo de fármacos.

Dada su disposición funcional y expresión ubicua principalmente en el sitio apical de la membrana plasmática, permite el transporte fuera de la célula, o bien; fuera de compartimentos anatómicos específicos y sitios santuarios importantes para la protección de xenobióticos. Tal expresión polarizada es consistente con un papel en la desintoxicación celular natural.

Los análisis inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos monoclonales han proporcionado pruebas para la localización habitual de la Glicoproteína P en una amplia variedad de órganos y células especializadas. Predominantemente una alta expresión se encuentra en el intestino grueso y delgado, riñón, hígado, cerebro, glándulas adrenales, placenta, pulmones y testículos. Existen otros tejidos en los que la expresión proteica es moderada como útero y pequeños conductos del páncreas; mientras que los niveles más bajos se expresan en vejiga, esófago, estómago, corazón, bazo glándulas mamarias y salivales; próstata, ovario, piel, músculo esquelético y médula ósea. Incluso, se ha detectado en células madre hematopoyéticas, en células del sistema inmunológico como monocitos, leucocitos, linfocitos T (CD4 , CD8) y B y en otras subpoblaciones de sangre periférica, en células dendríticas presentadoras de antígeno al igual que en las células llamadas asesinas naturales (NK, CD56) y los macrófagos activados^{68,69,70}

⁶⁸ Sánchez Suárez, Patricia y Benítez Bribiesca, Luis. *Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Fármacos*. Cancerología 1. 2006, 187-199.

⁶⁹ Schinkel H., Alfred. *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins*. Seminars in Cancer Biology. 1997, 8 (3), 161-170.

También se localiza intracelularmente en la membrana de orgánulos celulares, incluyendo el retículo endoplásmico (ER), aparato de Golgi, endosomas y lisosomas.

Los niveles variables de expresión en estos diferentes tejidos, obedece a la diferenciación celular, funciones tejido-específico, aspectos genéticos y a la respuesta ante cambios ambientales.

-Funciones farmacológicas de la Glicoproteína P.

La función fisiológica de la P-gp se deduce de su patrón de distribución tisular estratégica indicando un papel en la absorción intestinal, distribución y eliminación renal y hepática de xenobióticos.

Ⓢ *Absorción.*

-Intestino. Se expresa en la totalidad del intestino aumentando gradualmente desde el duodeno hasta el recto. Representa la primera línea de defensa del organismo después de la exposición oral como resultado de su expresión apical en los enterocitos limitando la absorción intestinal y facilitando la eliminación activa de ciertos fármacos a través de las heces, condicionando su Biodisponibilidad.

Una vez que el fármaco se encuentra en la circulación sanguínea, promueve la eliminación de los fármacos y metabolitos en bilis y orina como resultado de su expresión en hígado y riñón respectivamente.

Ⓢ *Excreción Biliar.*

-Hígado. Ha quedado establecido que el hígado es el principal sitio de metabolismo de xenobióticos, dentro de este contexto; la P-gp es importante para la eliminación de fármacos y toxinas a través de su expresión en la membrana canalicular/biliar (apical) de los hepatocitos en

⁷⁰ Balázs, Sarkadi; László, Homolya; Gergely, Szakács and András, Váradi. *Human multidrug resistance abcb and abcg transporters: participation in a chemoinmunity defense system.* *Physiol Rev.* 2006, 86 (4) 1179–1236.

la bilis. Sin embargo, su desempeño es siete veces menor que en los enterocitos del intestino delgado. En consecuencia, los xenobióticos que son sustratos de esta proteína pero que han escapado de su acción directa en el intestino entrarán por la circulación porta hepática y serán excretados potencialmente en la bilis o en la sangre. Su expresión ha demostrado ser de protección al hepatocito contra cualquier daño inducido por el xenobiotico en cuestión.

Ⓢ *Excreción renal.*

-*Riñón.* Este órgano es el encargado por excelencia de la excreción de metabolitos endógenos y de xenobióticos. La P-gp se encuentra en la superficie apical/luminal de las células de los túbulos proximales del riñón y posiblemente en otras porciones de la nefrona tales como el asa de Henle donde media y acelera la exportación de ciertos xenobióticos desde el citoplasma de las células renales a la orina e impide la reabsorción de los compuestos que son filtrados en el glomérulo. Se cree que los fármacos que son sustrato de este transportador pueden tener una eliminación renal más alta que la esperada por filtración glomerular.⁷¹

Cuando el xenobiotico ha alcanzado la circulación sistémica, la P-gp es un componente importante que permite el transporte desde el órgano en el torrente sanguíneo, protegiendo de esta manera su distribución en compartimientos críticos o sensibles (por ejemplo, en el cerebro, testículos, linfocitos y circulación fetal).

Ⓢ *Distribución en barreras especiales.*

-*Cerebro: Barrera hematoencefálica (BHE).*

La BHE es una interfase importante entre la sangre periférica y el cerebro (*Sistema Nervioso Central, SNC*); localizada específicamente entre el plasma sanguíneo de los vasos cerebrales y el espacio extracelular del encéfalo. Está formada de una monocapa de capilares continuos con

⁷¹ S.F. Zhou. *Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition.* Xenobiotica, 2008, 38(7–8), 802–832.

células endoteliales íntimamente unidas, sin poros ni fenestraciones para formar una segunda barrera celular continua e impermeable. Estos capilares, están rodeados a su vez de otros tipos celulares como los pericitos y células astrogiales.

La P-gp se ubica selectivamente en la membrana apical/luminal de las células endoteliales capilares, pericitos y en prolongaciones de células de la glía (astrocitos), sin embargo; el efecto fisiológico más importante asociado a su expresión parece estar en la membrana luminal de las células endoteliales de los capilares sanguíneos cerebrales donde previene el pasaje, distribución de fármacos y minimiza o evita los efectos adversos de sustancias tóxicas endógenas producidas ya sea en el cerebro o en los órganos periféricos, por ejemplo, neurotransmisores, neuromoduladores y metabolitos de neurotransmisores. No obstante, también pueden limitar la distribución central de medicamentos que son benéficos para el tratamiento de enfermedades del SNC o bien contribuir en la eliminación de desechos intracelulares demostrando su papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del microambiente cerebral.

-Placenta. Barrera placentaria

Otra importante barrera sangre-tejido es la interfase materno-fetal. La barrera placentaria está constituida por el endotelio capilar y trofoblastos (sincitiotrofoblastos, capa ininterrumpida epitelial y una capa discontinua de citotrofoblastos). Los sincitiotrofoblastos forman la barrera funcional entre las circulaciones sanguíneas materna y fetal y es esencial para el intercambio de nutrientes y productos de desecho, pero también para la protección de la circulación fetal. La membrana apical de los sincitiotrofoblastos está directamente en contacto con la sangre materna y su superficie basolateral está en contacto con la capa de citotrofoblastos.

Análogamente a los demás órganos que se señalaron anteriormente, la placenta expresa múltiples transportadores de fármacos, incluyendo a los

transportadores P-gp, los cuales; son funcionales en la superficie de borde en cepillo apical de los sincitotrofoblasto donde contribuyen a la protección del feto durante su desarrollo que es altamente sensible a la exposición de fármacos y sustancias potencialmente nocivas presentes en la circulación materna que pueden conducir a la aparición de efectos teratogénicos.

-Testículo. Barrera testicular

La barrera testicular está formada por los capilares testiculares que constan de células endoteliales unidas estrechamente entre sí por una capa de células de Sertoli y por una capa de células mioides que rodean los túbulos seminíferos. La Glicoproteína P está expresada en la superficie luminal de las células endoteliales de los capilares donde protege a las células germinales que están en proceso de maduración de los efectos deletéreos de las sustancias nocivas, especialmente durante la división meiótica.

- Pulmón

Adicionalmente a mecanismos de protección presentes en las vías respiratorias bajas relacionados con el intercambio de gases, en el pulmón la P-gp está localizada en la superficie apical del epitelio bronquial y en la membrana plasmática de los de los macrófagos alveolares sugiriendo que su función puede ser la de remover compuestos del ambiente del lumen del pulmón.

-Linfocitos

Los linfocitos ejercen una actividad importante en la respuesta inmune al matar directamente o por la secreción de citocinas, células infectadas y tumorales. La expresión de P-gp en linfocitos, los protege de sustancias tóxicas y es probable que sea un factor determinante de éxito durante el tratamiento del VIH ya que se requieren concentraciones intracelulares de fármaco adecuados (por ejemplo, en los linfocitos CD4+) para la eficacia terapéutica. También, podría estar involucrada en la exportación de

ciertos factores de crecimiento importantes para una óptima diferenciación hematológica al igual que en el transporte de citocinas (interleucinas e interferones IL-2, IL-4), moléculas con acción citotóxica y mediadores de la inflamación.^{72,73}

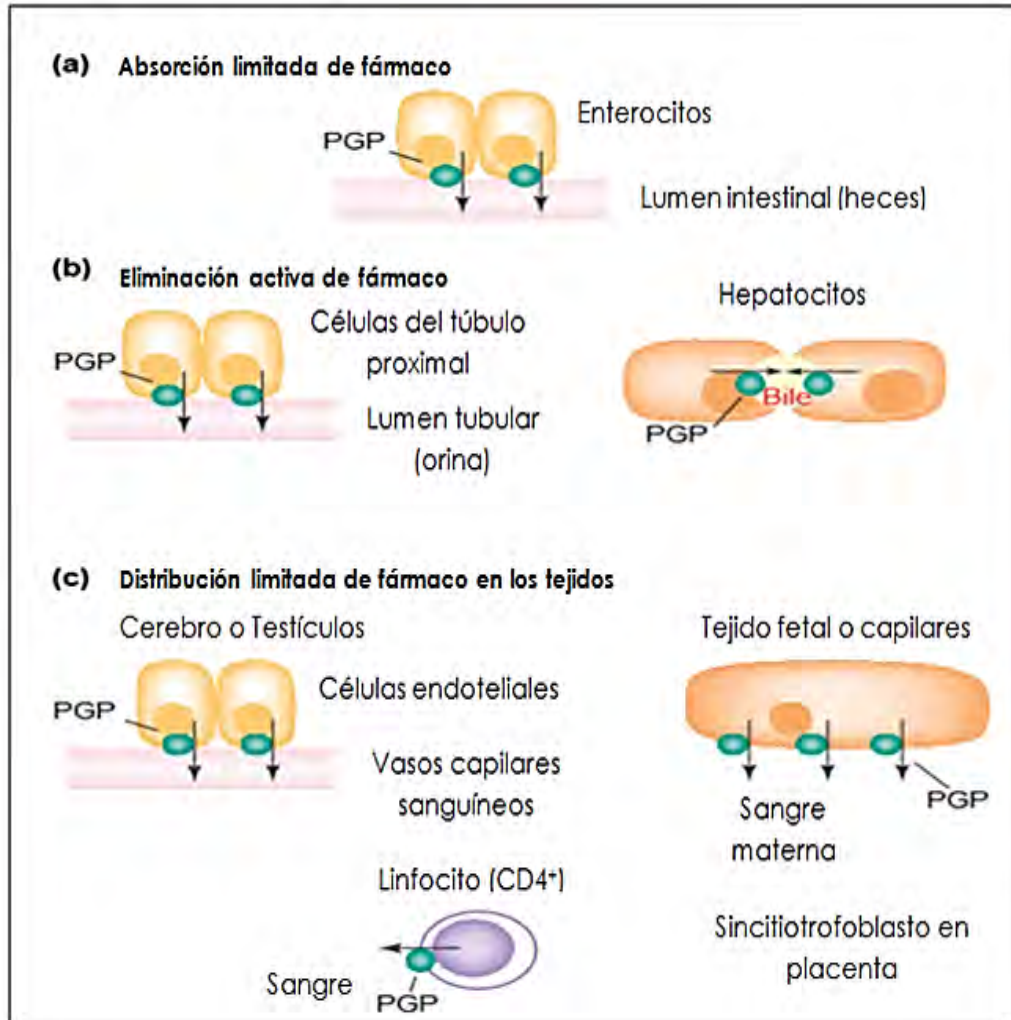


Fig.33. Expresión y función de la Glicoproteína P en varios tejidos. (a) La Glicoproteína P limita la entrada del fármaco en el organismo después de una administración oral como resultado de su expresión en la membrana luminal (apical) de los enterocitos. (b) La Glicoproteína P promueve la eliminación del fármaco en la bilis o en la orina como resultado de su expresión en la membrana luminal de las células del túbulo proximal en el riñón y en la membrana canalicular de los hepatocitos en el hígado. (c) Una vez que el fármaco ha alcanzado la circulación sanguínea sistémica, la Glicoproteína P limita su penetración en tejidos sensibles, por ejemplo; dentro del cerebro, testículos o en la circulación fetal y dentro de los linfocitos. Imagen modificada de: Martin F. Fromm. *Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers*. Trends in Pharmacological Sciences. 2004, 25 (8), 1-7.

⁷² M. Leslie, Elaine; Deeley G., Roger and Cole P.C., Susan. *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. Toxicology and Applied Pharmacology. 2005, 204 (3), 216-237.

⁷³ Schinkel H., Alfred. *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins*. Seminars in Cancer Biology. 1997, 8 (3), 161-170.

Asimismo, se ha sugerido que la citotoxicidad de células NK requiere la su función para el eflujo de productos líticos. En consecuencia, es factible la participación de la Glicoproteína P en la regulación de la apoptosis y en otros procesos inmunológicos.

La última función de la glicoproteína P está relacionada con su elevada expresión en órganos productores de hormonas y reproductivos lo que sugiere una estrecha función con el transporte típico intracelular de hormonas y esteroides naturales como cortisol, corticosterona, aldosterona y progesterona. Alternativamente, podría proteger de una manera rápida e instantánea a las células mismas de la glándula adrenal secretoras de esteroides en contra de la alta concentración local (potencialmente perjudicial) manteniendo niveles homeostáticos.

2.3. Estructura.

Con el fin de comprender el mecanismo por el cual la Glicoproteína P expulsa a los fármacos de la célula y en particular, los determinantes de la especificidad de sustrato; el conocimiento de su estructura es esencial.

2.3.1. Organización.

El gen MDR1 (ABCB1) se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (locus/banda 7q21.12.); esboza una región nuclear promotora, 28 intrones y 29 exones numerados del -1 al 28 con una longitud que varía en tamaño desde 49 a 587 pares de bases (pb).⁷⁴ Sin embargo, el tamaño real del gen ha variado conforme su estudio; el último reporte establece que se extiende en una longitud total de 209 kilo bases (kb) con 29 exones, 32 intrones y 6326 pb. El ARNm consiste en 4872 pb que codifican un único polipéptido de 1276 a 1280 aminoácidos dependiendo de la especie y tipo celular con una masa molecular aproximada de 170 kDa.^{75,76}

⁷⁴ Leung Fung, King and Gottesman M., Michael. *A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function.* Biochimica et Biophysica Acta. 2009, 1794, 860–871.

⁷⁵ Suresh V, Ambudkar; Chava, Kimchi-Sarfaty; Zuben, E Sauna and Michael, M. Gottesman. *P-glycoprotein: from genomics to mechanism.* Oncogene. 2003, 22, 7468–7485

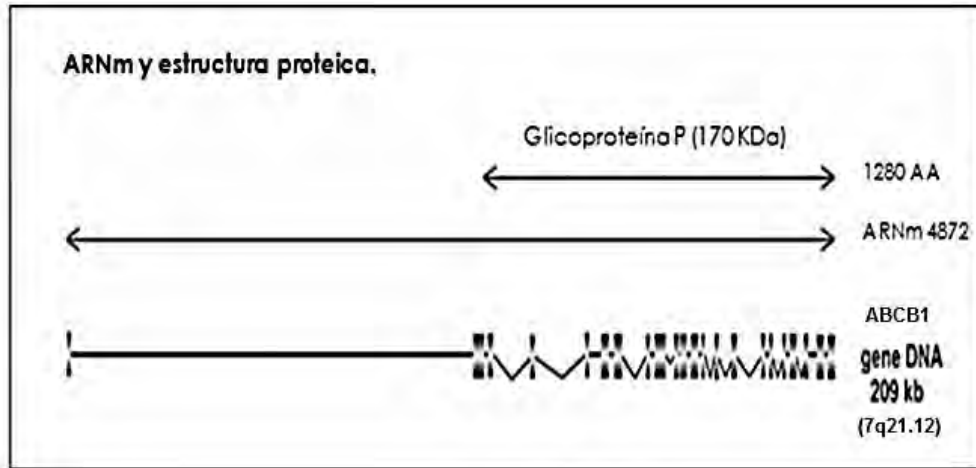


Fig.34. Estructura y organización genómica del gen MDR1 (ABCB1). Imagen modificada de: Staud, Frantisek; Ceckova, Martina; Micuda, Stanislav and Pavek, Peter. Chapter 10. *Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics*. MultiDrug Resistance in Cancer. Methods in Molecular Biology. 2012, 596, 199-222.

Basados en los análisis de secuencia primaria completa, la mayoría de los algoritmos estándar predicen un modelo topológico comúnmente aceptado en donde la cadena polipeptídica del transportador se encuentra dispuesta en una repetición en tándem, o bien; en una estructura de dos mitades homólogas y simétricas (cassetes) unidas entre sí que posiblemente corresponden a la duplicación de un gen ancestral y/o fusión de dos moléculas ancestrales.

Curiosamente, las dos mitades de la P-glicoproteína no son iguales en identidad de secuencia, y de los aminoácidos alineados; sólo el 43% son análogos compartiendo el 78% de similitud lo que sugiere que podrían haber evolucionado ya sea de forma independiente o han sido objeto de un movimiento importante de intrón después de un evento de duplicación de genes.^{77,78}

⁷⁶ Miklos Bodor, Edward; J. Kell and Rodney J. Ho. *Characterization of the Human MDR1 Gene*. The AAPS Journal 2005; 7 (1), E1-E5.

⁷⁷ Yang, Kanghui; Wu, Jifeng and Li, Xung. *Recent advances in research on P-glycoprotein inhibitors*. Bio. Science Trends. 2008; 2(4), 137-146.

⁷⁸ Krishna, Rajesh and D. Mayer, Lawrence. *Multidrug resistance (MDR) in cancer Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2000, 11, 265–283.

Cada mitad homóloga se compone de dos unidades básicas: un dominio citoplasmático de unión a nucleótido (*nucleotide binding domain, NBD*) de naturaleza hidrofílica y un dominio integral de membrana (TMD) formado de seis segmentos transmembranales alfa-hélice altamente hidrófobos situados en el espesor de la membrana y conectados por flexibles cadenas de aminoácidos llamados giros o loops hidrofílicos alternados extra e intracelularmente.

Esta disposición resulta en un total de 12 segmentos transmembrana que interactúan cooperativamente para formar a la proteína como única unidad funcional (*TM1-12, modelo topológico seis mas seis*).⁷⁹

Los extremos NH₂ y COOH terminales (residuos 1-637 y 638-1280 respectivamente), están situados intracelularmente y el primer loop extracelular que une los dos primeros segmentos transmembranales presenta una cadena de carbohidratos N-glicosilada.

Finalmente, las mitades de la molécula están separadas por una secuencia central altamente cargada (*linker o región conectora*) de aproximadamente 60-80 aminoácidos de longitud. Esta región de unión, conecta las dos mitades homólogas de la proteína y desempeña un papel crítico en su función para asegurar la adecuada interacción de las dos subunidades. Su estructura secundaria flexible es suficiente para la función coordinada de los dos sitios de unión a ATP y el transporte de fármacos.

-Fosforilación.

De acuerdo con recientes experimentos, los procesos de fosforilación/desfosforilación de la Glicoproteína P no juegan un papel esencial en mediar la resistencia a múltiples fármacos ya que las mutantes que carecen de todos los sitios potencialmente fosforilables

⁷⁹ Takano, Mikiyoshi; Yumoto, Ryoko and Murakami, Teruo. *Expression and function of efflux drug transporters in the intestine*. Pharmacology & Therapeutics, 2006, 109, 137-161.

exhiben las funciones normales de transporte. No obstante, se ha sugerido que tanto la afinidad de unión de algunos fármacos como la estabilidad del transportador posiblemente dependan del estado de fosforilación. Los cuatro residuos de serina que pueden ser fosforilados por proteínas quinasas A y C (*Ser-661*, *Ser-667*, *Ser-671* y *Ser-683*) se encuentran agrupados en la región conectora presente en la parte central de la secuencia de la proteína.

-Glicosilación.

La P-gp es objeto de varias modificaciones post-traduccionales; al menos 20 kDa de los 170 kDa de la proteína madura corresponden a los carbohidratos ya que presenta una masa molecular aproximada de 140 kDa como precursor no glicosilado. La secuencia primaria sugiere 10 sitios de glicosilación putativos, sin embargo; existen solo 3 sitios potenciales de glicosilación extracelular unidos a N. El uso de mutagénesis y análisis de delección han confirmado Asn-91, Asn-94, y Asn-99 en el primer bucle extracelular como sitios de glicosilación dentro del producto del gen humano MDR1.⁸⁰

La N-glicosilación tiene un papel biológico y celular importante para estas proteínas ayudando en su inserción, plegamiento, orientación, estabilidad en la membrana y, posiblemente; en su correcta rotación. Parece no ser necesaria para su función básica de transporte o reconocimiento de fármacos porque el tratamiento con tunicamicina, (bloqueador de la glicosilación) no interviene en la sensibilidad de las células resistentes a múltiples fármacos.⁸¹ Por otra parte, la naturaleza y secuencia de azúcares es compleja y desconocida. Actualmente se han descrito varias estructuras posibles; una de ellas contiene un alto complejo oligosacárido de manosa mientras que otras dos estructuras presentan ácidos siálicos terminales.

⁸⁰ Ursula A. Germann and Timothy C. Chambers. *Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein*. Cytotechnology 1998, 27, 31–60.

⁸¹ Fardel Oliver, Lecureur, Valérie and Guillouzo, André. *The P-Glycoprotein Multidrug Transporter*. Gen. Pharmac. 1996, 27 (8), 1283-1291.

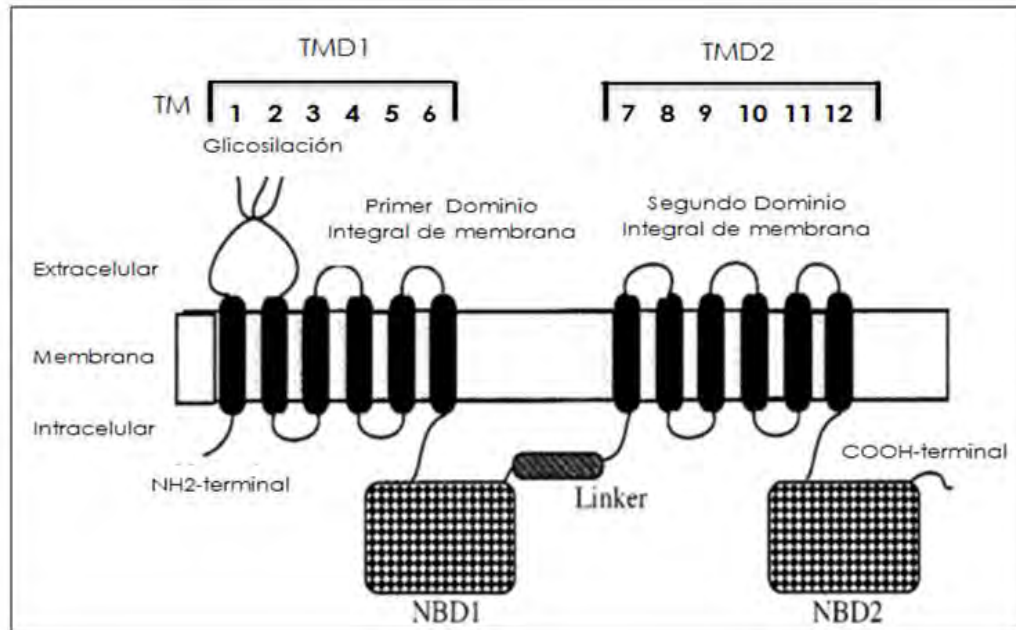


Fig.35. Mapa topológico y organización de dominios de la P-glicoproteína basado en su secuencia primaria. Cada NBD se asocia con un TMD de tal forma que NBD1 está asociado con TMD1 y NBD2 con TMD2. Imagen modificada de: Higgins, F. Christopher; Callaghan, Richard; Linto, J. Kenneth; Rosenberg, F. Mark and Ford, C. Robert. *Structure of multidrug resistance P-glycoprotein*. *Seminars in Cancer Biology*. 1997, 8, 135-142.

-Estructura tridimensional.

Usando microscopía electrónica de baja resolución de 2.5 nm y análisis de imagen, se obtuvo la primera estructura tridimensional de la P-gp.

Cuando es vista desde la cara extracelular de la membrana, la forma general de la P-gp es toroidal como de cilindro o anillo con un diámetro de aproximadamente 10 nm que rodea una gran poro central de segmentos transmembrana y altura máxima de aproximadamente 8 nm.

El anillo de proteína tiene dos características importantes. En primer lugar, presenta simetría séxtuple: Un modelo en el que los seis lóbulos corresponden a los seis giros extracelulares entre pares de hélices. En segundo lugar, se ha propuesto que una "abertura" adicional en las interfases entre los dos TMDs está presente en el anillo para proporcionar acceso lateral desde la fase lipídica hacia el poro central a los sustratos que van a ser efluídos.

Por su parte, el poro central acuoso (de aproximadamente 5 nm de diámetro), es la entrada a una cámara en forma de copa o embudo en el plano de la membrana, formado por los doce dominios transmembrana alfa-hélice. Esta cámara se abre hacia la superficie extracelular, se estrecha a medida que pasa a través de la membrana y se cierra en la cara citoplasmática de la membrana con un diámetro menor de 2.5 nm mediante las secuencias de los dominios de unión a nucleótidos y los giros citoplásmicos internos que conectan a los segmentos transmembrana. Dos lóbulos ampliamente separados de 3 nm en la cara citoplasmática, de un tamaño y orientación apropiada para los dos dominios de unión de nucleótidos completan el cuadro.

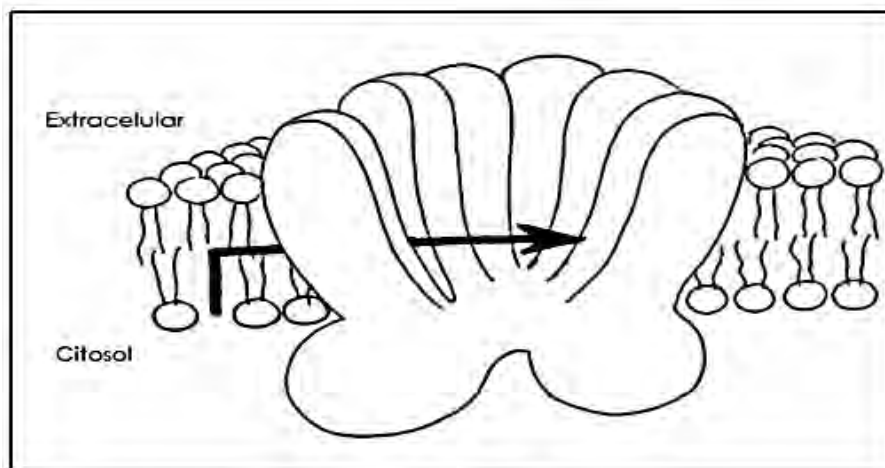


Fig.36. Estructura Tridimensional de la P-gp determinada a 2.5 nm mediante microscopía electrónica. Imagen modificada de: Higgins, F. Christopher; Callaghan, Richard; Linto, J. Kenneth; Rosenberg, F. Mark and Ford, C. Robert. *Structure of multidrug resistance P-glycoprotein*. *Seminars in Cancer Biology*. 1997, 8, 135-142.

2.3.3.1. Dominios integrales de membrana.

Los dominios transmembrana de la Glicoproteína P tienen dos funciones centrales. En primer lugar, forman la trayectoria de transporte a través de la cual las moléculas de fármaco atraviesan la membrana en forma de poro acuoso de modo que el sustrato no entre en contacto con los lípidos de la misma. En segundo lugar, proporcionan los residuos de aminoácidos que interactúan directamente con el sustrato y disponen de esta manera el sitio(s) de unión e interacción para que pueda ser transportado. Son de interés principal para la elucidación de las relaciones estructura-función de la proteína.

2.3.3.2. Dominios de unión a nucleótido.

Los dos dominios de unión a nucleótido (NBDs), también conocidos como dominios de unión a ATP o unidades ABC; están integrados de 200-250 aminoácidos y son regiones catalíticas altamente conservadas que comparten 30-50% de homología en la secuencia consenso de aminoácidos con otros transportadores ABC eucarióticos y procarióticos siendo los rasgos característicos de plegamiento.⁸² Estos NBDs unen e hidrolizan el ATP con una eficiencia similar; actúan como una ATPasa que convierte ATP en ADP proporcionando la energía necesaria para que sea posible bombear los sustratos a través de las membranas contra gradientes de concentración.

Aunque el mecanismo de transducción de energía es desconocido y los datos estructurales obtenidos reflejan una conformación estática, el modelo estructural-espacial de P-gp es dinámico tras la unión molecular del ATP ya que induce cambios conformacionales significativos en los dominios transmembrana de la proteína para lograr el eflujo activo.

Se asume que durante el ciclo catalítico de extrusión ambos NBDs interactúan fuertemente en extrema proximidad formando una sola estructura dimérica funcional comúnmente denominada “sandwich de nucleótido”. De manera que las dos moléculas de ATP se unen a lo largo de la interfaz del dímero formada por cada NBD. Este proceso juega un papel crítico en el ciclo catalítico y mecanismo de acción de la proteína ya que la formación del complejo de los dominios de unión a nucleótidos y la concomitante reestructuración dinámica de la interfaz están vinculados a los cambios conformacionales de los TMDS donde la nueva conformación tiene el sitio de unión de sustrato abierto al citoplasma promoviendo que se abra el poro en toda la profundidad de la bicapa lipídica exponiéndose alternativamente al lado opuesto para su liberación.

⁸² Laurretta, M.S.; Chan, Simon Lowes and Barry, H. Hirst. *The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004, 21 (1), 25–51.

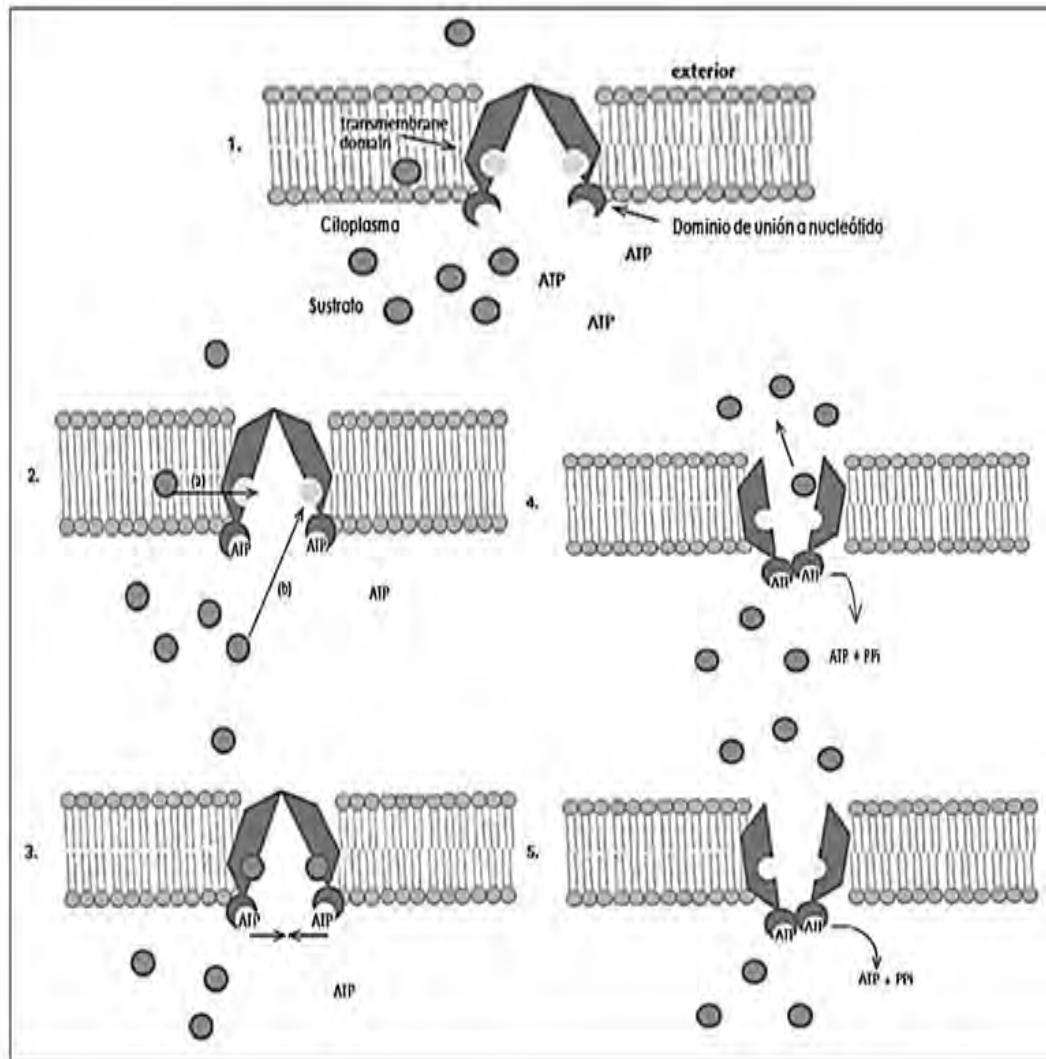


Fig. 37. Función del ATP en P-gp. Paso 1: Los dos dominios transmembranales están unidos a los dominios de unión a nucleótido ampliamente separados. Paso 2: *Asociación de nucleótidos*. El ATP y el sustrato se unen a sus dominios correspondientes. Paso 3: *Dimerización de los NBDs*. Una vez unido el ATP, los dos NBD se someten a un cambio conformacional acercándose como una sola unidad dimerizada. Paso 4: *Liberación de ADP + Pi*. El cambio conformacional de los NBDs propicia la hidrólisis de una molécula de ATP y el cambio conformacional en el bolsillo de unión de sustrato, el cual se abre hacia el espacio extracelular permitiendo el eflujo. Paso 5: La segunda molécula de ATP es hidrolizada y la proteína puede volver a su estado basal con el sitio de unión a sustrato dirigido hacia el interior. Imagen modificada de: Cox G., Arthur. Chapter 5. *Pharmacogenomics and Drug Transport/Efflux*. Concepts in Pharmacogenomics.2010.

A nivel de secuencia primaria, cada unidad ABC incluye 5 regiones altamente conservadas que están directamente involucradas en la unión de ATP y en su hidrólisis. Desde el extremo terminal NH₂ a COOH terminal estas regiones son los motivos A-loop (un residuo aromático de 25 aminoácidos arriba del Walker A), Walker A (Gly-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Ser/Thr-Ser/Thr) conocida también como loop de unión a fosfato

(P-loop), una secuencia rica en glicina, una región de glutamina conservada (Q-loop), el motivo Walker B (h-h-h-h-Asp) donde h es un residuo hidrofóbico, D-loop, región de histidina H-loop y un motivo Walker C también llamado C-loop, el cual; es un segmento aproximadamente de quince aminoácidos de longitud que generalmente comienza con la secuencia LSGGQ (Leu-Ser-Gly-Gly-Gln-Gln/Arg/Lys-Gln-Arg); se encuentra entre el Walker A y B y es la firma específica y diagnóstico para la familia de los transportadores ABC ya que sólo está presente en las proteínas ABC, mientras que los motivos Walker A y B se encuentran en muchas otras proteínas que utilizan ATP.

Un residuo Lisina altamente conservado dentro de motivo Walker A, está involucrado en la unión de ATP y un residuo de Aspartato altamente conservado en el motivo Walker B sirve para unir los iones Mg^{2+} a los NBDs ya que la P-gp requiere tanto de la unión e hidrólisis del ATP como de un ión divalente como el magnesio para funcionar como transportador multifármacos. También, se ha propuesto que el magnesio puede desempeñar un papel en la estabilización del sitio de unión a ATP. Por último, los motivos Firma C probablemente participan en acelerar la hidrólisis de ATP coordinando la interacción con los TMDs y también se ha sugerido que están involucrados en la transducción de energía para conducir los cambios conformacionales en los dominios integrales de membrana que se requieren para la translocación del sustrato.⁸³

-Ciclo catalítico del ATP.

Dilucidado el ciclo catalítico de la P-gp se encontró que se compone de dos procesos acoplados con papeles distintos para la hidrólisis de ATP, uno en el transporte de sustrato y el otro en efectuar cambios conformacionales para restablecer la bomba a su estado basal y comenzar el siguiente ciclo catalítico.

⁸³ R. Tandon, Vishal; B., Kapoor; G., Bano; S. Gupta; Z., Gilani and D., Kour. *P-glycoprotein: Pharmacological relevance*. Indian J. Pharmacol.2006, 38 (1), 13-24.

A fin de generar una rápida y eficiente traslocación, el ciclo catalítico requiere que la proteína cambie de un estado de alta energía (para promover la asociación del fármaco) a un estado de baja energía o de relajación (para promover la disociación del fármaco).

En teoría, una sola rotación del ciclo puede subdividirse en los siguientes pasos intermedios donde dos moléculas de ATP se hidrolizan para el transporte de una molécula de sustrato.

Inicialmente, el fármaco y las dos moléculas de ATP se unen a la proteína en sus propios sitios de unión; el NBD1 lleva a cabo la hidrólisis de ATP y los productos catalíticos intracelulares ADP y fosfato inorgánico son liberados lo que resulta en el impulso para el transporte de sustrato seguido de un cambio conformacional en la proteína que reduce drásticamente la afinidad del sustrato terminando de esta manera el primer ciclo catalítico. Una vez que el fármaco ha sido liberado al lado al ambiente extracelular, el segundo ciclo catalítico comienza por la hidrólisis de la otra molécula de ATP en el NBD2, la energía liberada se utiliza para reorientar la proteína a su conformación nativa. Tras la liberación de ADP por parte del NBD2 se completa otro ciclo catalítico, devolviendo a la molécula de P-gp a su estado original donde se pueden unir de nuevo tanto el sustrato como los nucleótidos para iniciar el ciclo siguiente.

La fase de “reseteado” implica otra vez la alteración de la interacción de los NBDs y reordenamiento de los TMDs para restaurar el sitio de unión de sustrato a un estado de alta afinidad. De este modo, la unión de ATP parece conducir los grandes cambios conformacionales que reducen la afinidad de unión de fármacos y favorecen la exposición del sitio de unión al medio extracelular. La transición de esta conformación está gobernada por consideraciones termodinámicas representadas por un equilibrio constante y ΔG .

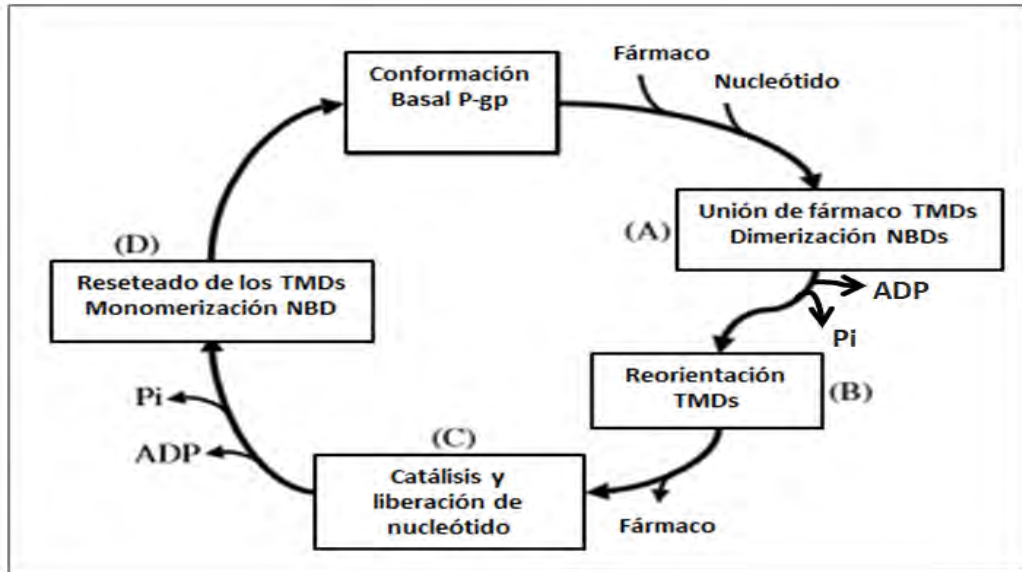


Fig.38. Resumen ciclo catalítico de P-gp. El proceso de translocación de fármaco comprende cuatro etapas distintas: (A) Unión del fármaco y nucleótidos a la P-gp: (B) Reorientación de sitios de unión de fármaco cambiando de un estado de alta a baja afinidad; (C) hidrólisis de nucleótido y (D) fase de reseteado. Imagen modificada de: Callaghan, Richard; C. Ford, Robert and D. Kerr, Ian. *The traslocation mechanism of P-glycoprotein*. FEBS Letters. 2006, 580, 1056–1063.

2.3.3.3. Sitios de unión a sustrato.

La característica más desconcertante de la glicoproteína P es su capacidad de reconocimiento y transporte de una amplia variedad de sustratos. De hecho, para encontrar una respuesta razonable a tal fenómeno se ha pensado que evolucionó a través de mutaciones que ampliaron su especificidad desde sustratos endógenos hasta productos químicos potencialmente tóxicos.

Para la comprensión de este comportamiento, es necesario identificar los péptidos segmentos y los residuos de aminoácidos que pueden estar implicados en la interacción con el sustrato.

Los estudios de unión de radioligandos utilizados para caracterizar los sitios de interacción farmacológica P-gp, revelaron sitios de unión a fármacos independientes divididos equitativamente en dos categorías: transporte y regulación. Por su parte, estudios de mutagénesis dirigida y mapeo de proteínas han determinado la presencia de sitios potenciales de unión de sustrato intracelulares en ambas mitades de la proteína.

Específicamente, se cree que los sitios importantes para el reconocimiento y unión del sustrato están situados en algunos residuos de aminoácidos en TM1 junto con TM5 y 6 y los sitios TM11 y 12. Adicionalmente, TM4 y TM10 también presentan sitios de interacción.

La ubicación de estos sitios de unión es opuesta, lo que sugiere que los TM se someten a rotación para formar una cavidad y exponer el sustrato unido desde la membrana hasta el poro. Los residuos que intervienen directamente con el sustrato aún no se han definido, no obstante; se tiene conocimiento que los aminoácidos en TM1 están involucrados en la formación de un bolsillo de unión con función en la determinación del tamaño de sustrato adecuado mientras que los residuos de Glicina en TM2 y TM3 son importantes para establecer la especificidad de sustrato.

Además de los dominios transmembrana, se ha sugerido que los loops intracelulares son también trascendentales para el reconocimiento y unión de sustrato. La mutagénesis sistemática de 20 residuos de Glicina en estos bucles citoplasmáticos reveló que Gly141 y Gly187 entre TM2 y TM3, Gly288 entre TM4 y TM5, Gly812 y Gly830 entre TM8 y TM9 participan en el proceso. De manera integral, estos datos sugieren que los residuos de aminoácidos que afectan a la especificidad de sustrato de la P-glicoproteína se encuentran dispersos a lo largo de la molécula; ya sea en los dominios transmembrana, en los loops citoplasmáticos e incluso hasta en los dominios de unión a ATP.

A pesar de la riqueza de estos estudios de mutagénesis y fotomarcación que se han realizado en los últimos años, la base estructural de la inespecificidad del transportador sigue siendo desconocida; la ubicación exacta de la interacción del sustrato con la proteína así como el número preciso de sitios de unión todavía no está bien resuelto. No obstante, la teoría generalmente aceptada es que tiene múltiples sitios de unión para sus ligandos cada uno de naturaleza flexible o con una especificidad

definida; lo cual, podría proporcionar una explicación de la amplia gama de compuestos conocidos para interactuar con esta proteína.^{84,85}

Por último, se ha propuesto la hipótesis acerca de la reorganización de los TM en donde la conformación tridimensional de P-gp representa dos estados funcionales diferentes correspondientes a los nucleótidos libres y nucleótidos enlazados. En ausencia de ATP en los NBDS, los dos dominios transmembrana forman un solo barril de 5-6 nm de diámetro y 5 nm de longitud con un poro central que está abierto a la superficie extracelular y se extiende por gran parte de la profundidad de la membrana, mientras que después de la unión de ATP, los dominios transmembrana se reorganizan en tres dominios compactos cada uno con 2-3 nm de diámetro y 5-6 nm de profundidad que pueden abrir el poro central a lo largo de su longitud de una manera que permiten el acceso de los fármacos hidrófobos directamente desde la bicapa lipídica al poro central de la proteína.

Este modelo de rotación de hélice proporciona una explicación de cómo el sitio de unión a sustrato de la P-gp puede exponerse alternativamente a la fase lipídica y después reorientarse a la fase acuosa de la cámara central.

2.4. Mecanismo de Acción.

El preciso mecanismo de extrusión de la P-gp es desconocido, sin embargo; varios modelos se han propuesto para explicarlo. En un sentido fenomenológico, se fundamentan en el transporte directo de fármacos una vez que entran en la célula desde un sitio de unión de alta afinidad "carga" localizado en el compartimento intracelular o transmembrana en la bicapa, a un sitio extracelular de baja afinidad "descarga".

⁸⁴ Ruiz Gómez, M. J., Souviron Rodríguez, A. y Martínez Morillo, M. *La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer*. AN. MED. INTERNA (Madrid). 2002, 19 (9), 477-485.

⁸⁵ Ilza K. Pajeva, Christoph Globisch and Michael Wiese. *Structure-Function Relationships of Multidrug Resistance P-Glycoprotein*. J. Med. Chem. 2004, 47, 2523-2533.

Los fármacos interactúan dentro de las regiones transmembrana mediante el ajuste en un gran **bolsillo de unión** flexible que se forma en su interior y que puede acomodar varias moléculas de sustrato. Superpuesto al ciclo de transporte, está la maquinaria catalítica, lo que implica la unión de ATP, la formación del dímero e hidrólisis. El eflujo se realiza unidireccionalmente y transfiere sólo una molécula de fármaco a la vez, por lo tanto, es una proteína transportadora uniporter.⁸⁶

En la actualidad, existen tres modelos predominantes: modelo de poro o bomba clásica, modelo flippasa y modelo de la aspiradora hidrofóbica (*hydrophobic vacuum cleaner, HVC*).

2.4.1. Modelo bomba clásica o de poro.

El modelo se sustenta en las teorías tradicionales sobre el mecanismo de acción de los transportadores de membrana al actuar como bombas.

La P-gp forma un poro de membrana por el arreglo de los 12 segmentos hidrófobos. La unión del sustrato se asume que tendrá lugar a través de un sitio específico en el transportador, que por lo general; puede acomodar sólo unos pocos compuestos estrechamente relacionados. La interacción inicial del sustrato con este sitio está prevista como algo que ocurre desde el citoplasma, en ese momento; el cambio conformacional en el transportador promueve su expulsión directamente en la fase acuosa en el otro lado de la membrana.

A pesar de que prevalece una gran cantidad de evidencia apoyando este modelo para transportadores de sustratos hidrofílicos y hay muchas razones para creer que las proteínas ABC que transportan moléculas polares también funcionan de una manera similar; si es para explicar el mecanismo por el que la P-gp bombea a los fármacos, es evidente que varios aspectos no están completamente explicados, incluyendo la

⁸⁶ Raghava Srivalli, Kale Mohana and P. K., Lakshmi. *Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012, 48, (3), 1-16.

imperante naturaleza hidrofóbica de sus sustratos así como la multiespecificidad de sustrato.

2.4.2. Modelo de aspiradora hidrofóbica.

Para explicar estas discrepancias donde la mayoría de los sustratos de la P-gp son hidrofóbicos y que por tanto se espera que difundan libremente y tengan una mayor solubilidad en la bicapa lipídica que en la fase acuosa, Higgins y Gottesman sugirieron el modelo de "aspiradora hidrofóbica", en el cual; la P-gp detecta a su sustrato en el ambiente de la membrana plasmática a medida que avanza a través de la misma antes de llegar a la fase acuosa del citoplasma como parte de un "bombeo preventivo".

Este modelo propone un proceso de reconocimiento de dos niveles: Primero, la P-gp interactúa con los fármacos que previamente llegaron al equilibrio embebidos directamente en la bicapa lipídica ya sea a partir de la membrana externa o de la membrana interna. En un segundo paso, la unión de nucleótidos y/o la hidrólisis de ATP provocan cambios conformacionales en la proteína favoreciendo la formación de un bolsillo profundo en su interior para remover o "limpiar" los sustratos alojados directamente al medio acuoso externo de la célula a través del poro formado.

El bolsillo de unión de fármacos se concibe morfológicamente como embudo o portal abierto en la interfaz inferior de las dos "mitades" de P-gp, más estrecho en el lado citoplásmico de la membrana donde la proximidad de TM2/TM11 y TM5/TM8 indica que estas regiones deben adjuntar el bolsillo y formar las "bisagras" necesarias para los cambios conformacionales durante el ciclo de transporte o bien formar aberturas desde donde pueden difundir los sustratos al interior del mismo.

Bajo esta concepción, el determinante principal de la especificidad de sustrato es la capacidad de un fármaco para interactuar con la bicapa

lipídica y, el determinante secundario; su capacidad para interactuar con el sitio de unión relativamente no selectivo dentro del transportador. Un sustrato con características afines a la membrana garantiza un mayor tiempo de permanencia en la misma con lo cual aumentaría la probabilidad de que la Glicoproteína P lo detecte y elimine de la célula.

El modelo HVC es el más aceptado y se ve reforzado por estudios realizados con sustratos fluorescentes que confirman que los sitios de unión del fármaco se encuentran dentro del plano de la membrana y que el transporte unidireccional es desde la membrana al entorno acuoso externo.

2.4.3. Modelo de Flippasa.

La naturaleza inusual del transportador P-gp en cuanto a su amplia especificidad de sustrato, llevó a establecer su función como una traslocasa o flippasa basándose en la analogía entre los fármacos anfipáticos y los fosfolípidos de membrana.

El modelo flipassa es el modelo más reciente y establece también un sistema de reconocimiento de dos niveles. Inicialmente, el sustrato debe intercalarse en la bicapa lipídica para tener acceso al núcleo de los dominios transmembrana dentro del bolsillo, después; interactuar con la región de unión a sustrato en el cual la P-gp lo voltea llevándolo desde el lado interno de la bicapa de fosfolípidos (capa citosólica) forzando al sustrato a su partición hacia la capa externa en donde se favorece su difusión lentamente al medio extracelular acuoso. Adicionalmente, la inercia de este movimiento, crea un gradiente de concentración, ya que el fármaco en cada lado está en equilibrio con la fase acuosa, la presencia de cantidades diferentes (es decir, un gradiente dentro de la membrana), generará un gradiente de concentración de fármaco a través de la membrana.

Para sustentar este modelo, un determinante principal de la especificidad es la capacidad de un sustrato para ser intercalado en la bicapa lipídica, para lo cual; el carácter anfipático del sustrato debe ser adecuado. Por otra parte, las interacciones con el sitio de unión es el otro componente donde el reconocimiento y la unión de diversos sustratos deben estar asociados con una ubicación preferida en la membrana, determinada por las propiedades moleculares e interacciones de los lípidos para que se ajuste en el sitio de unión de la proteína.

Aunque en el caso de los fosfolípidos de membrana este modelo es de muy baja frecuencia; el efecto neto de la translocación en flip-flop de fármacos dentro de la bicapa mediado por P-gp sería el mismo que el esperado para una bomba de membrana clásica. La actividad de flippasa se ha atribuido a la proteína homóloga MDR3, lo cual indica una posible conservación de la función entre las proteínas ABC.

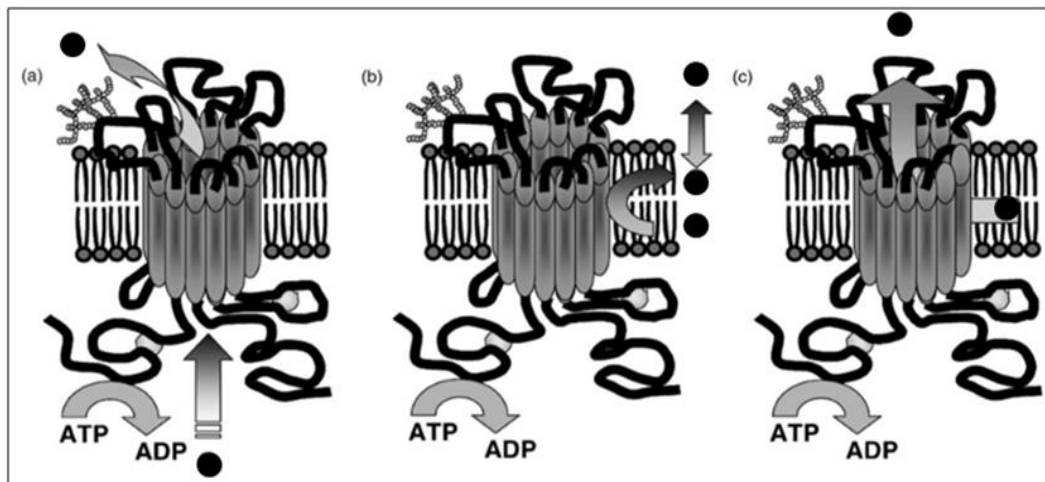


Fig.39. Modelos propuestos para explicar el mecanismo de eflujo de la glicoproteína P. (a) Modelo de poro o bomba (b) Modelo de flippasa y (c) Modelo de la aspiradora hidrofóbica. En el modelo de poro, los fármacos se asocian a la P-gp en el compartimento citosólico y son transportados afuera de la célula a través del poro formado gracias a la hidrólisis de ATP. En el modelo flippasa, los fármacos embebidos en la capa interna de la bicapa de fosfolípidos se unen a la P-gp dentro del plano de la membrana y son translocados hacia la capa externa de la bicapa donde difunden lentamente al fluido extracelular. El modelo de la aspiradora hidrofóbica, los fármacos interactúan con los lípidos de membrana, después con la P-gp, la cual, los gira dentro de la membrana y los libera en el medio extracelular. Los dos modelos de aspiradora y flippasa, predicen que la P-gp tiene una cavidad o cámara suficientemente flexible para acomodar un sustrato estructuralmente heterogéneo, en la que está atrapado antes de su expulsión. Imagen modificada de: Varma, V.S. Manthena; Ashokraj, Yasvanth; Dey, S. Chinmoy and Pachagnula Ramesh. *P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement*. Pharmacological Research. 2003, 48 (4), 347-359.

2.5. Sustratos.

Uno de los aspectos más interesantes de la Glicoproteína P es que una sola proteína integral de membrana pueda reconocer y transportar una gran cantidad de fármacos diferentes desde el punto de vista estructural y farmacológico incluyendo agentes clínicamente relevantes que van desde compuestos de espectro MDR utilizados en la quimioterapia del cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedad infecciosa, inmunosupresión, trastornos neurológicos, VIH y estados inflamatorios entre otras condiciones fisiopatológicas (*ver Anexos*). Exhibe también un alto nivel de actividad de ATPasa basal en ausencia aparente de sustratos atribuido a la presencia de sustancias endógenas potencialmente transportables como hormonas, esteroides, lípidos, péptidos, sales biliares y citoquinas.

Este amplio espectro de sustratos ha dificultado identificar alguna característica estructural que compartan. Numerosos estudios se han llevado a cabo para dilucidar los atributos moleculares y estructurales necesarios para la interacción entre esta proteína a fin de catalogar la huella química de un modelo de sustrato.

El sustrato "típico" P-gp transportado de manera eficiente es hidrófobo, anfipático, con un sistema de anillos aromáticos planos (al menos dos anillos) y neutros o de naturaleza débilmente básica, cargados positivamente a pH fisiológico permitiendo fácilmente su unión a los grupos cargados negativamente de las cabezas de los fosfolípidos de la membrana. Por lo general, son moléculas orgánicas que varían en tamaño con peso molecular entre un rango que oscila entre 200 a casi 2000 Da y con capacidad de unión a hidrógenos.

De manera contradictoria, no todos los sustratos de P-gp se ajustan a estos patrones y existen varias excepciones; se han descrito moléculas lineales o circulares no aromáticas e hidrofóbicas que no tienen carga a pH fisiológico así como también algunos compuestos ácidos pueden ser

transportados por ejemplo fenitoína, metotrexato aunque no muy eficientemente (sustratos débiles).^{87,88}

Adicionalmente, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que la mayoría de los sustratos de P-gp poseen dos o tres grupos donadores de electrones como átomos de O, N, S, F, Cl con una separación fija espacial de 2.5 y 4.6 Å^o respectivamente entre los dos donadores.

Todas estas propiedades reunidas en sola molécula sirven como predictores de reconocimiento directamente correlacionables; donde a mayor número de elementos en un determinado sustrato, mayor afinidad de unión por el transportador.

El cómo esta proteína gestiona bioquímicamente el reconocimiento y transporte de esta diversidad de estructuras sigue siendo en sí una cuestión no resuelta muy interesante hasta el momento. El único denominador común estructural identificado en todos los sustratos es su naturaleza anfipática. Esto probablemente se relaciona con el mecanismo de translocación de fármacos que puede ser dependiente de la capacidad del fármaco para insertarse en la capa interna de la bicapa de lípidos de membrana antes de ser 'volteado' para la capa exterior, o simplemente para acceder en la membrana y ser extruido directamente en el medio extracelular.

2.6. Interacciones fármaco-fármaco.

En pacientes, las interacciones fármaco-fármaco son frecuentemente un riesgo y pueden provocar efectos secundarios simples como leves molestias al paciente o, en casos extremos; efectos adversos graves y toxicidades potencialmente mortales.

⁸⁷ Laurretta, M.S.; Chan, Simon Lowes and Barry, H. Hirst. *The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004, 21 (1), 25–51.

⁸⁸ Schinkel H., Alfred. *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins*. Seminars in Cancer Biology. 1997, 8 (3), 161-170.

Al igual que las enzimas del citocromo P450, la alteración de la función de cualquiera de los transportadores de fármacos puede conducir a un desequilibrio fisiológico grave. Dos principales mecanismos subyacentes a la actividad de la P-gp han sido identificados como los causantes de las interacciones fármaco-fármaco: inducción e inhibición.^{89,90} Este alcance se ha ido detectado cada vez más en la práctica clínica sobre todo en fármacos cuyo margen terapéutico es estrecho.

Se acepta en general que las interacciones ocurren por la co-administración de moléculas que compiten por los sitios de unión con este transportador (como un sustrato, inhibidor o inductor) y que pueden afectar sustancialmente la farmacocinética y farmacodinamia del tratamiento, tal es el caso de la digoxina (sustrato)/quinidina (Inhibidor), digoxina-talinolol/rifampicina (inductor) o digoxina/hierba de San Juan (inductor).^{91,92}

Fármaco	Fármaco concomitante	Resultado	Mecanismo propuesto Para P-gp
Digoxina	Quinidina	Aumento <i>F</i>	Inhibición
	Hierba de San Juan	Disminución <i>F</i>	Inducción
Ciclosporina	Rifampicina	Disminución <i>F</i>	Inducción
Tacrolimus	Rifampicina	Disminución <i>F</i>	Inducción
Paclitaxel	Ciclosporina	Aumento <i>F</i>	Inhibición
	Elacridar	Aumento <i>F</i>	Inhibición
Docetaxel	Ciclosporina	Aumento <i>F</i>	Inhibición
Topotecan	Elacridar	Aumento <i>F</i>	Inhibición

Tabla.1. Ejemplos de cambios clínicamente importantes en la Biodisponibilidad resultado de alterar la actividad de la P-gp.⁹³

⁸⁹ M. F. Fromm. *Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans*. European Journal of Clinical Investigation. 2003, 33 (2), 6–9.

⁹⁰ Estudante, M. et al., *Intestinal drug transporters: An overview*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012, 65 (10) <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.042>. 1340-1356.

⁹¹ Oostendorp L., Roos; Beijnen H. Jos and Schellens H.M., Jan. *The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier*. Can. Traeat. Rev. 2009, 35 (2), 137-147.

⁹² Frantisek Staud, Martina Ceckova; Stanislav Micuda and Petr, Pavek. Chapter 10. *Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics*. J. Zhou (ed.), MultiDrug Resistance in Cancer, Methods in Molecular Biology. 2010.

⁹³ E. Rosenbaum, Sara. *Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: An Integrated Textbook and Computer Simulations*. John Wiley & Sons. 2011.

2.6.1. Inducción.

Clínicamente, la modificación de la función de la glicoproteína P intestinal por inducción es relevante ya que al estar más activa que en su estado basal, altera la absorción provocando la disminución de las concentraciones plasmáticas del fármaco sustrato y la reducción de su eficacia terapéutica. Hasta la fecha, la Inducción de P-gp no tiene un papel terapéutico.

En un estudio se informó que la Glicoproteína P intestinal es un factor determinante de la Biodisponibilidad de digoxina administrada por vía oral y que su inducción es un mecanismo para las interacciones farmacológicas entre rifampicina y digoxina. Después de la ingesta oral de rifampicina (600 mg/día durante 10 días), el ABC_{0-114h} y la Biodisponibilidad de digoxina (1 mg) se redujeron significativamente en un 30% y 19%, respectivamente.

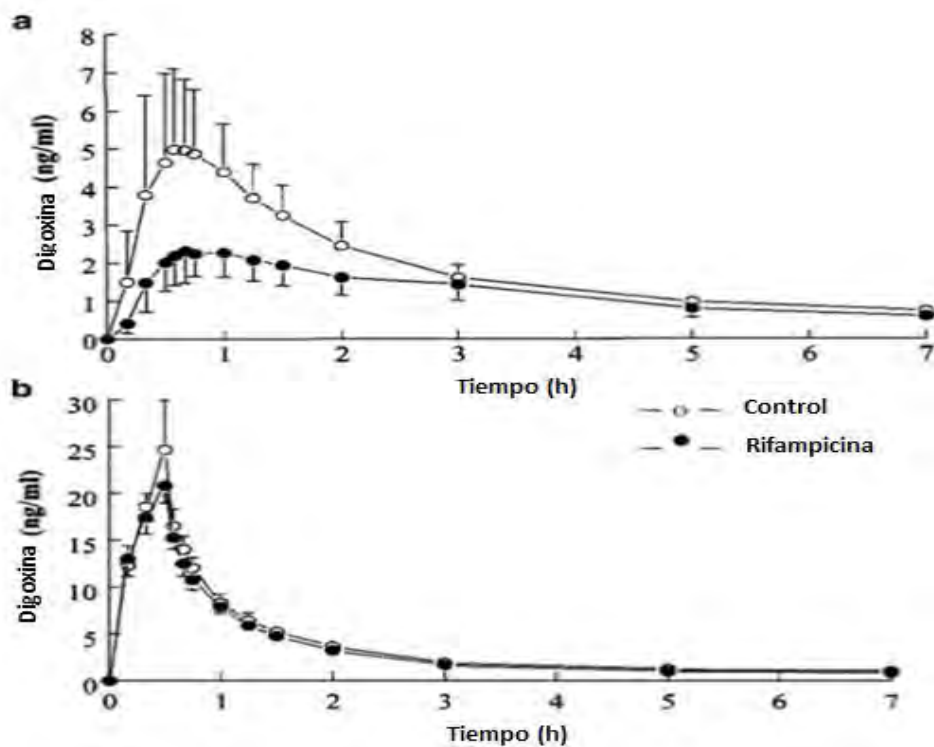


Fig.40. Influencia de la rifampicina en la farmacocinética de digoxina. (a) Media ($n = 8$) curvas de concentración plasmática-tiempo de digoxina administrada por vía oral (1 mg) antes (círculos abiertos) y durante (círculos rellenos) la coadministración de rifampicina (600 mg). (b) Media ($n = 8$) curvas de concentración plasmática-tiempo de digoxina se administra por vía intravenosa (1 mg) antes (círculos abiertos) y durante (círculos rellenos) la coadministración de rifampicina (600 mg). Imagen modificada de: Glaeser, Hartmut. *Importance of P-glycoprotein for Drug-Drug Interactions*. Drug Transporters. Handbook of Experimental Pharmacology. 2011, vol 201, 285-297.

Los inductores documentados son fármacos como la fenitoína, fenobarbital, dexametasona, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, probenecid, rifampicina y bromocriptina. Adicionalmente, esta proteína no sólo puede ser inducida por agentes farmacológicos; varios factores aumentan la cantidad y la actividad de transporte en los tejidos; el antidepresivo herbal hierba de San Juan, el estrés físico del medio como irradiación con rayos X, irradiación de luz ultravioleta, choque térmico, así como también agentes de diferenciación y hormonas pueden causar efectos detrimentos en la farmacocinética

Todos estos estímulos convergen en la región promotora de MDR1 y por lo tanto, incluye sitios para activar factores de transcripción.

La regulación de la expresión génica de un transportador ABC implica la participación de numerosos receptores nucleares. Los receptores nucleares constituyen una familia de factores de transcripción que actúan como heterodímeros, uniéndose a elementos promotores promoviendo la expresión de los genes codificantes.

La inducción de la expresión P-gp no se produce directamente a través de la unión de fármacos; está regulada por medio de la activación de un receptor nuclear, el receptor X de pregnano (PXR) a nivel transcripcional. De hecho, una amplia gama de compuestos que han demostrado inducir a la P-gp son ligandos para PXR. Después de la unión del ligando, PXR se transloca desde el citoplasma al núcleo, donde se une al receptor de esteroides y xenobióticos RXR.

El heterodímero formado posteriormente se une a secuencias de ADN conservadas dentro de las regiones promotoras del gen diana para activar la transcripción.

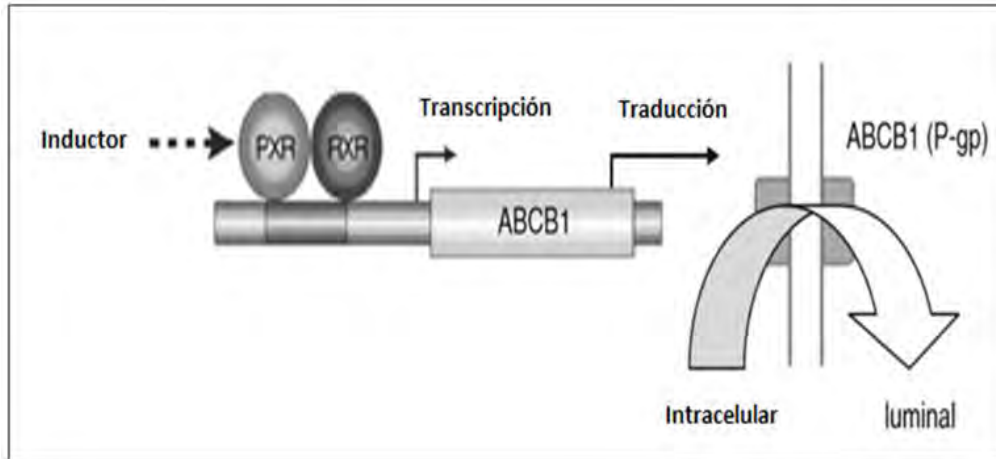


Fig.41. Inducción de ABCB1 a través del receptor nuclear PXR/RXR conduciendo a la extrusión acelerada de sustratos Glicoproteína P. Imagen modificada de: Cascorbi, Ingolf. *P-glycoprotein: Tissue Distribution, Substrates, and Functional Consequences of Genetic Variations*. Drug Transporters. Handbook of Experimental Pharmacology. 2011, vol 201, 261-283.

2.6.2. Inhibición.

La mayoría de los estudios sobre la inhibición de la P-gp, se han realizado con fármacos que están involucrados en la investigación de nuevos agentes con potencial de reversión de la resistencia MDR en células de cáncer. El protocolo terapéutico de estos inhibidores tiene lugar en la administración concomitante a fin de aumentar la biodisponibilidad de los fármacos inherentes al tratamiento.

Los inhibidores documentados con actividad farmacológica son moléculas como la ciclosporina A, eritromicina, quinidina, nifedipino, itraconazol, reserpina, tamoxifeno y verapamilo. Los flavonoides y otros ingredientes se ha encontrado que también modulan negativamente la función de P-gp. Asimismo, diversos factores dietéticos y fitoquímicos como el jugo de toronja, la piperina, un componente importante de la pimienta negra, capsaicina, curcumina, gingerol que inicialmente se creían que modificaba la absorción de fármaco por la inhibición de las enzimas CYP3A, también puede inhibir a este transportador.

Una de las interacciones ampliamente documentada de carácter grave y frecuente ocurre entre la digoxina y quinidina. Varios estudios han

demostrado un incremento 2 a 3 veces mayor en las concentraciones plasmáticas de digoxina después de la coadministración de quinidina en pacientes con enfermedad cardiovascular.⁹⁴ Las líneas adyacentes de evidencia, indican que este efecto es atribuido a la inhibición de P-gp intestinal como mecanismo potencial para la interacción clínica observada entre ambos fármacos ya que la digoxina es un sustrato representativo de este transportador que experimenta un metabolismo mínimo y la quinidina es un conocido inhibidor de su función.

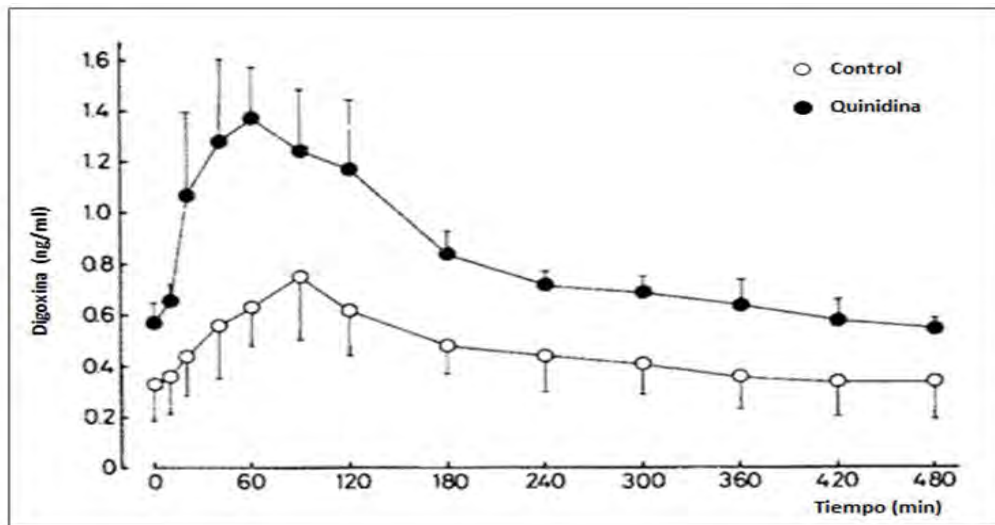


Fig.42. Influencia de la quinidina en la farmacocinética de digoxina. Media (n=7) curvas concentración plasmática-tiempo de digoxina administrada por vía oral antes (círculos abiertos) y durante (círculos rellenos) la coadministración de quinidina. Imagen modificada de: K. E. Pedersen, B. D. Christiansen, N. A. Klitgaard, and F. Nielsen-Kudsk. *Effect of Quinidine on Digoxin Bioavailability*. Eur J Clin Pharmacol. 1983, 24, 41-47.

En general, la P-gp puede ser inhibida por tres mecanismos: (1) de forma competitiva mediante el bloqueo de sus sitios de unión a fármaco por un sustrato con alta afinidad a la proteína (2) de forma no competitiva al interferir eficientemente con la hidrólisis de ATP en el sitio de unión a nucleótido y (3) por medio de la alteración de la integridad de los lípidos de la membrana celular. Recientemente, otro mecanismo ha sido propuesto para la inhibición de P-gp mediante un mecanismo alostérico.⁹⁵

⁹⁴ J. Matheny, Christopher; W. Lamb, Matthew; R. Brouwer, Kim and M. Pollack, Gary. *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Implications of P-glycoprotein Modulation*. Pharmacotherapy. 2001, 21 (7), 778-796.

⁹⁵ Föger, Florian. *Chapter 7 Strategies to Overcome Efflux Pumps*. Oral Delivery of Macromolecular Drugs. Springer. 2009.

Aunque la mayoría de los compuestos inhiben la función de P-gp bloqueando los sitios de unión a fármacos, la presencia de múltiples sitios de unión complica el proceso, además; obstaculiza el desarrollo de una verdadera técnica concluyente para la identificación de sustratos e inhibidores.

2.6.2.1. Inhibidores competitivos y no competitivos.

-Inhibidores competitivos.

Los inhibidores competitivos, rivalizan como sustratos naturales y ocupan todos los sitios de transporte de proteínas disponibles sin dejar espacio para la interacción P-gp y su sustrato verdadero. Si el fármaco sustrato y el inhibidor tienen una afinidad similar, cuanto mayor sea la concentración del inhibidor, menos posibilidades hay para el sustrato de entrar en los sitios activos de unión a fármacos. A la inversa, cuanto mayor es la concentración de sustrato, menos eficiente es la inhibición. Si el inhibidor tiene una baja afinidad relativa para los sitios de unión, se requiere una alta concentración del inhibidor para lograr el efecto previsto. Muchos inhibidores de la P-gp de primera y segunda generación son inhibidores competitivos.

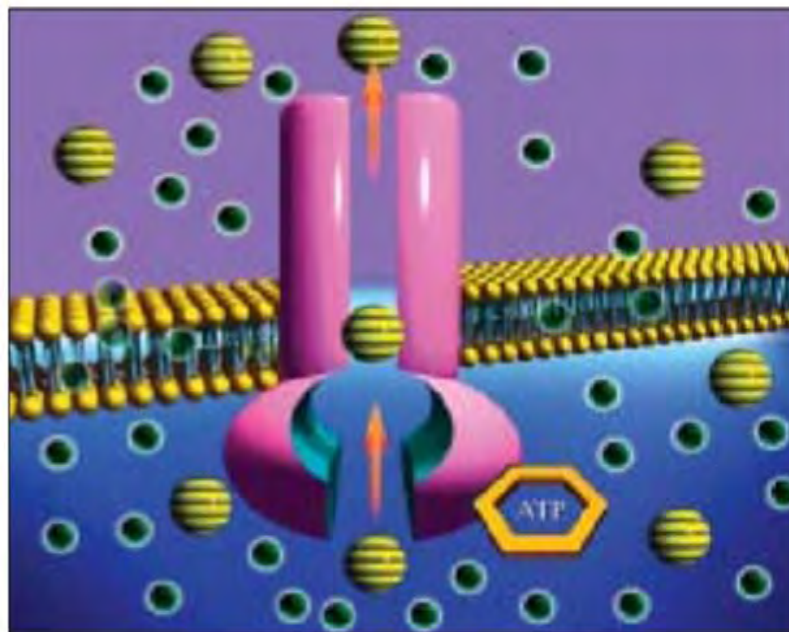


Fig.43. Inhibición competitiva del transportador P-gp. Imagen de: Thomas, Hilary and Coley, Helen M. *Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein*. Cancer Control. 2003, 10 (2), 159-165.

-Inhibidores no competitivos.

En contraste con sus homólogos competitivos, los inhibidores no competitivos no rivalizan con el sustrato por los sitios de unión activos y, por ende; no son transportados por la proteína.

Tales inhibidores generalmente se unen a una región distinta que es funcionalmente independiente de la proteína como los sitios de unión a ATP o un sitio modulador alostérico, los cuales; pueden evitar la hidrólisis de ATP y el transporte de los medicamentos fuera de la célula, lo que resulta en un aumento de la concentración intracelular; o bien, inducir un cambio conformacional a través de un patrón de unión que se ve afectado por la estructura del sustrato (o lo que es denominado un mecanismo de ajuste inducido) de modo que el sitio activo ya no es reconocible para los sustratos. En términos simples, el aumento de la cantidad de sustratos en la célula no tendrá ningún efecto sobre el nivel de inhibidor. Los inhibidores de tercera generación, se unen con alta afinidad al transportador, pero no son en sí mismos sustratos, así que por lo tanto entran en la categoría de los inhibidores no competitivos.

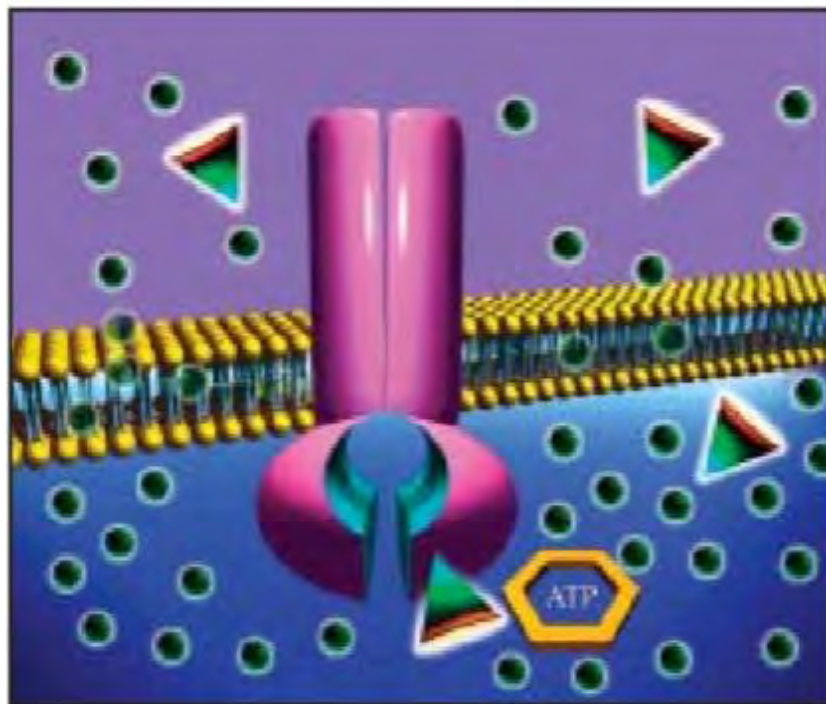


Fig.44. Inhibición no competitiva del transportador P-gp. Imagen de: Thomas, Hilary and Coley, Helen M. *Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein*. Cancer Control. 2003, 10 (2), 159-165.

2.7. Superposición de sustratos con CYP3A4.

En órganos tales como el intestino delgado y el hígado, el eflujo de P-gp puede estar acoplado a complejos enzimáticos para maximizar su efecto metabólico. Al respecto, se ha identificado una amplia e importante superposición de sustratos entre la P-gp y la principal enzima de biotransformación de fármacos CYP3A4.

Cabe señalar que además de este traslape molecular, existen otras combinaciones relevantes respaldando la idea de que estos dos sistemas funcionalmente interactúan. Por ejemplo, ambas proteínas son reguladas (inducidas e inhibidas) por los mismos compuestos aunque el solapamiento no es absoluto; nifedipino y midazolam conocidos sustratos de CYP3A4 no son transportados por la glicoproteína P. Debido a la similitud en inhibidores e inductores, estos mecanismos intervienen en diversas interacciones.

Otras coincidencias surgen a partir de que ambos genes están ubicados en el mismo cromosoma en estrecha proximidad, 7q22.1 (CYP3A4) y 7q21.1 (MDR1) y son regulados a través del receptor nuclear PXR/RXR para inducir su expresión a nivel transcripcional.

En adición, existe una compensación inversamente proporcional en relación a su concentración intestinal, ya que la P-gp se expresa gradualmente aumentando sus niveles en dirección duodeno-colon (proximal a distal) mientras que la presencia de enzimas CYP3A4 desciende. Por último, en el enterocito intestinal maduro la P-gp se encuentra localizada en la membrana apical y el CYP3A4 localizado justo debajo en el retículo endoplásmico.

Aunque tal interacción aún no se entiende completamente, la evidencia experimental sugiere varios mecanismos:

(1) La glicoproteína P permite aumentar el grado de exposición de un fármaco al metabolismo de CYP3A4 a través de su tránsito repetido entre el lumen del intestino y el compartimento intracelular de los enterocitos (ciclo eflujo-reabsorción). En otras palabras, las moléculas de fármaco que no son sustratos de P-gp y que escapan a la conversión metabólica cruzarán la membrana, ingresarán al enterocito una sola vez y continuarán difundiendo a lo largo del gradiente de concentración en la sangre capilar, mientras que aquellas sometidas a eflujo, serán cicladas continuamente, así; una porción del fármaco expulsado puede ser reabsorbida, o bien; se puede potencialmente prolongar el tiempo de residencia intracelular proporcionando más oportunidades para las enzimas CYP3A4 de realizar de manera más eficiente su conversión metabólica local.

(2) La glicoproteína P mantiene las concentraciones intracelulares de fármaco dentro del intervalo lineal de actividad catalítica para las enzimas CYP3A4, es decir; por debajo de las concentraciones de saturación, de modo que habilita metabolizar fármacos durante un intervalo de dosis mucho más altas.

(3) Los metabolitos generados por CYP3A4 son a menudo mejores sustratos para P-gp que el compuesto original, ya sea para facilitar su eliminación o para impedir una posible inhibición competitiva de la enzima.

(4) Una posibilidad adicional es que CYP3A4 cambia la afinidad del sustrato por otros transportadores intestinales de eflujo, es decir; que los metabolitos obtenidos sean transportados eficientemente por MRP2 (ABCC2) o BCRP (ABCG2), para evitar la interacción competitiva con la P-gp que controla el eflujo del fármaco padre.

En consecuencia, esta relación sinérgica o alianza complementaria P-gp-CYP3A4 integra un metabolismo intestinal altamente eficiente y más extenso al esperado si solo funcionaran de manera independiente. Desde una perspectiva evolutiva, esta redundancia puede servir como una barrera bioquímica concertada en los tejidos en los que se coexpresan

para la que existen múltiples vías de extracción de xenobióticos potencialmente dañinos promoviendo una eliminación tal, que ha demostrado ser un factor determinante en la baja y variable Biodisponibilidad oral de los fármacos que se absorben.⁹⁶

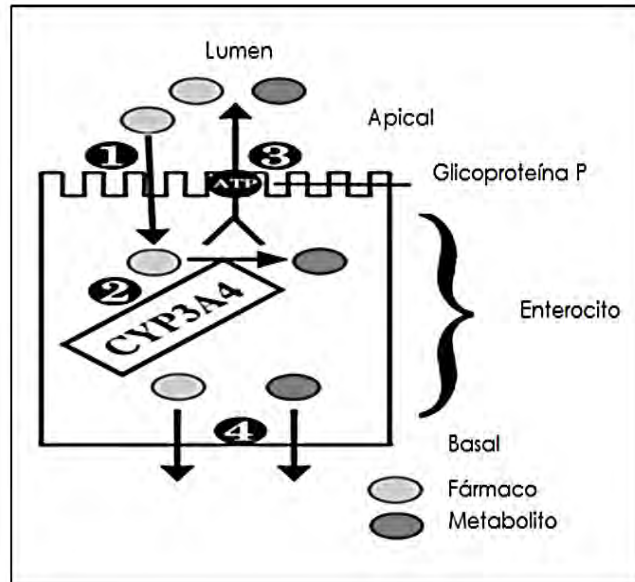


Fig.45. Interacción funcional Pgp-CYP3A4 en los enterocitos. (1) Fármaco en el lumen del intestino; absorción en el enterocito a través de la membrana apical vía difusión pasiva o mediante procesos de difusión facilitada. (2) Metabolismo intestinal vía CYP3A4. (3) Transporte del fármaco padre y/o su metabolito desde el enterocito hacia el lumen vía P-gp. (4) Paso del fármaco y/o metabolito en la circulación sistémica a través de la membrana basal vía difusión pasiva o mediante procesos de difusión facilitada. Los ciclos repetidos de absorción y eflujo luminal aumentan la exposición neta del fármaco para el CYP3A4 antes de la absorción sistémica que resulta en metabolismo intestinal más eficiente. Imagen modificada de: M. F. Fromm. *Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans*. European Journal of Clinical Investigation. 2003, 33 (2), 6–9.

Finalmente, es importante señalar que mientras que la interacción entre la P-gp y el CYP3A4 fue la primera en ser descubierta y ha sido extensamente estudiada, es razonable esperar que este fenómeno también puede ser extrapolado a otras enzimas metabolizadoras (CYP2C9, CYP2C19, CYP2C8, CYP2D6, estereasas, epóxido hidrolasas, UGT1A1, UGT1A7-10, SULT1E1, SULT2A1, SULT1A3, N-acetiltransferasas, Glutathion-S-transferasas con este mismo transportador así como con otros transportadores de eflujo apicales (MRP2 y BCRP) con relevancia farmacológica y clínica.

⁹⁶ Benet Z., Leslie and Cummins L., Carolyn L. *The drug efflux–metabolism alliance: biochemical aspects*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2001, 50 (1) S3–S11.

2.8. Polimorfismo genético.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

El gen MDR1 es altamente polimórfico y exhibe un evidente número de mutaciones en su secuencia referidas a polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism, SNPs*).

La primera evidencia de variabilidad genética se encontró en 1889; investigando las posibles causas de la MDR, dos sustituciones de aminoácidos GLy185Val y Ala893Ser se detectaron a partir de glándulas suprarrenales humanas. En 1998 se detectaron otros dos polimorfismos G2677T en exón 21 y G2995A en el exón 24. El primer escaneo sistemático de todo el gen en el 2000 permitió la identificación y documentación en una población caucásica sana de 15 SNPs y se anticipó en ese momento que más SNPs podían encontrarse en el futuro.⁹⁷

Al menos, un total de 28 SNPs se han identificado en 27 posiciones exónicas e intrónicas así como en los límites exón-intrón del gen MDR1, no obstante; recientemente de acuerdo con la base de datos de SNPs sustentada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), hay un total de 50 SNPs y 3 polimorfismos de inserción/delección en diversas poblaciones.⁹⁸

En conjunto, estos resultados sugieren que los polimorfismos pueden resultar en una importante fuente de variabilidad interindividual e intraindividual en la farmacocinética y potencial de toxicidad de los fármacos que son sustratos de la P-gp al alterar su expresión y afectar función en términos de especificidad de sustrato, o bien; en la actividad misma en diferentes capacidades de transporte.

⁹⁷ S.-F. ZHOU. *Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition*. *Xenobiotica*, 2008, 38(7–8), 802–83.

⁹⁸ Yan-Hong, LI; Yong-Hua, WANG; Yan, LI and Ling, YANG. *MDR1 Gene Polymorphisms and Clinical Relevance*. *Acta Genetica Sinica*. 2006, 33 (2), 93–104.

Dentro de la región codificante, los SNPs resultan en mutaciones sinónimas y no sinónimas. Generalmente, un SNP está relacionado con otro SNP. En el caso del gen MDR1 los 3 SNPs que ocurren frecuentemente y que tienen una fuerte relación creando un haplotipo común son C3435T (I1145I) en el exón 26, C1236T (G412G) en el exón 12 y G2677T (A893S) en el exón 21. La literatura existente sugiere que este haplotipo juega un papel importante en la respuesta a fármacos y en la susceptibilidad a enfermedades.

Dado que la mutación C3435T es silenciosa o no sinónima, la sustitución del nucleótido dentro del gen no resulta en un cambio de aminoácido en la proteína expresada y es poco probable que este SNP interfiera con la función normal para transportar fármacos, si bien; ha demostrado tener consecuencias farmacológicas al causar cambios en la expresión de la proteína.

Concretamente, este polimorfismo origina que se encuentren los genotipos TT, CC y CT, los cuales; se caracterizan por distintos niveles de expresión de la P-gp en el intestino (duodeno). El alelo-T particularmente homocigoto (mutante) se asocia con los niveles de expresión de P-gp intestinal 2 veces más bajos en comparación con el alelo-C homocigoto (tipo salvaje) asociado con un aumento de los niveles y heterocigoto CT (expresión intermedia).⁹⁹

Esta expresión diferencial, es el primer ejemplo que indica que el polimorfismo de la glicoproteína P puede afectar directamente la absorción intestinal y Biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral en los seres humanos como Digoxina, donde los individuos portadores del alelo-T homocigoto muestran un aumento de las concentraciones de fármaco en plasma debido a una mayor absorción.

⁹⁹ Laurretta, M.S.; Chan, Simon Lowes and Barry, H. Hirst. *The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004, 21 (1), 25–51.

Efecto Limitante de la Glicoproteína P como Transportador Intestinal de Eflujo en la Absorción Oral y Biodisponibilidad de Fármacos.

Región	SNP	Cambio en aminoácido	Dominios Vecinos
Exón 1 ^a	C-145G	No codifica	
Exón 1b	T-129C (T-12C)	No codifica	
Intrón 1	Ala/-41G	No codifica	
Exón 2	A43G	Asn 15 Asp	Intracelular, antes de TM1
Exón 2	T49C	Phe 17 Leu	Intracelular, antes de TM1
Exón 2	C-4T	No codifica	
Exón 2	G-1A	No codifica	
Exón 2	A61G	Asn 21 Asp	Intracelular, antes de TM1
Exón 3	A131G	Asn 44 Ser	Intracelular, antes de TM1
Exón 4	C240A	Ala 80 Gly	Extracelular, entre TM1 y TM2
Exón 4	T267C	Met 89 Thr	Extracelular, cerca del sitio de N-glicosilación
Intrón 4	G5/-25T		
Intrón 4	G5/-35C		
Exón 5	T307C	Phe 103 Leu	Extracelular, cerca del sitio de N-glicosilación
Intrón 5	C6/+139T		
Intrón 5	C+145T		
Exón 7	A548G	Asn 183 Ser	Intracelular, cerca de TM3
Exón 8	A729G	Glu 243 Glu	Intracelular, entre TM4 y TM5
Exón 8	G738A	Ala 246 Ala	Intracelular, entre TM4 y TM5
Exón 8	A782G	Ile 261 Val	Intracelular, entre TM4 y TM5
Exón 11	G1199A	Ser 400 Asn	Intracelular, antes del primer A-loop
Exón 12	C1236T	Gly 412 Gly	Intracelular, entre el primer A-loop y el motivo Walker-A
Exón 12	A1308G	Thr 436 Thr	Intracelular, después del primer motivo Walker-A
Intrón 12	C12/+44T		
Exón 13	C1474T	Arg 492 Cys	Intracelular, entre el primer motivo Walker-A y el Motivo Firma
Exón 14	C1617T	Ile 539 Ile	Intracelular, dentro del motivo Firma
Exón 14	G1662C	Leu 554 Leu	Intracelular, dentro del motivo Walker-B
Exón 14	G1696A	Gly 566 Lys	Intracelular, entre el primer D-loop y H-loop
Exón 15	C1777T	Arg 593 Cys	Intracelular, entre el primer H-loop y la región enlazadora
Exón 15	C1794T	Ile 598 Ile	Intracelular, entre el primer H-loop y la región enlazadora
Exón 15	G1795A	Aa 599 Thr	Intracelular, entre el primer H-loop y la región enlazadora
Exón 16	T1985G	Leu 662 Arg	Intracelular, dentro de la región enlazadora, a lado del sitio de fosforilación
Exón 16	C2005T	Arg 669 Cys	Intracelular, dentro de la región enlazadora, entre los dos sitios de fosforilación
Intrón 16	T17/-76A		
Intrón 17	A17/+137G		
Exón 20	G2401A	Val 801 Met	Intracelular, entre TM8 y TM9
Exón 21	A2485G	Ile 829 Val	Intracelular, entre TM8 y TM9
Exón 21	A2505G	Val 835 Val	Dentro de TM9
Exón 21	A2506G	Ile 836 Val	Dentro de TM9
Exón 21	A2587G	Ile 849 Met	Dentro de TM9
Exón 21	C2650T	Leu 884 Leu	Intracelular, entre TM10 y TM11
Exón 21	G2677T/A	Ala 893 Ser (G2677T) Ala 893 Thr (G2677A)	Intracelular, entre TM10 y TM11
Exón 24	A2956G	Met 986 Val	Dentro de TM12
Exón 24	G2995A	Ala 999 Thr	Intracelular, entre TM12 y el segundo motivo Walker-A
Exón 24	G3084A	Pro 1028 Pro	Intracelular, entre TM12 y el segundo motivo Walker-A

Exón 25	C3151G	Pro 1051 Ala	Intracelular, entre TM12 y el segundo motivo Walker-A
Exón 26	A3320C	Gln 1107 Pro	Intracelular, entre el segundo motivo Walker-A y Q-loop
Exón 26	T3322C	Trp 1108 Arg	Intracelular, entre el segundo motivo Walker-A y Q-loop
Exón 26	C3396T	Ala 1132 Ala	Intracelular, entre el segundo Q-loop y el motivo Firma
Exón 26	T3421A	Ser 1141 Thr	Intracelular, entre el segundo Q-loop y el motivo Firma
Exón 26	C3435T	Ile 1145 Ile	Intracelular, entre el segundo Q-loop y el motivo Firma
Exón 28	C3747G	Gly 1249 Gly	Intracelular, después del segundo H-loop
Exón 28	G3751A	Val 1251 Ile	Intracelular, después del segundo H-loop
Exón 28	C3767A	Thr 1256 Lys	Intracelular, después del segundo H-loop
Exón 28	G4030C	No codifica	
Exón 28	A4036G	No codifica	
Exón 28	T4282C	No codifica	
Exón 28	A4350T	No codifica	
Exón 28	G4407A	No codifica	
Exón 28	A4454G	No codifica	
Exón 28	A4513C	No codifica	
Exón 28	G4577A	No codifica	
Exón 28	T4823C	No codifica	

Tabla 2. Polimorfismos del gen MDR1.¹⁰⁰

Otros polimorfismos en el gen MDR1 que están en las posiciones límites exón/intrón sin cambios de aminoácidos son C1236T (exón 12), C2650T (exón 21) y C3396T (en exón 26).

Varios de estos polimorfismos implican regiones intrónicas o no codificantes, por tanto, no afectan a la secuencia de aminoácidos de P-gp. Sin embargo, la mayoría de los SNPS causan mutaciones sinónimas en las regiones de codificación donde la sustitución del nucleótido en el gen da lugar a cambios en un aminoácido de la proteína, y por lo tanto; la posibilidad de afectar potencialmente su expresión y función.

En la región intracelular se encuentran A61G (exón 2), A548G (exón 7), C1474T (exón 13), G2677T/A (exón 21), G2995A (exón 24), A3320C (exón 26) y T3421A (exón 26) entre otros. En la región extracelular hay únicamente 3 SNPs, todos localizados en el primer loop extracelular (C240A (exón 4), T267C (exón 4) y T307C (exón 5)).

¹⁰⁰ Leung Fung, King and Gottesman M., Michael. *A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function*. Biochimica et Biophysica Acta. 2009, 1794, 860–871.

Curiosamente, entre los SNPs que resultan en cambios de aminoácidos solo cuatro codifican a los aminoácidos ubicados en 2 de los 12 dominios transmembranales (A2505G (TM9), A2506G (TM9), A2587G (TM9) y A2956G (TM12) y varios están muy cerca del dominio de unión a ATP (por ejemplo, G1199A en el exón 11).

Además, el SNP en el exón 5 Phe103Leu se encuentra al lado del segundo dominio transmembrana en la parte extracelular muy cerca a los sitios de glicosilación. El cambio de un residuo aromático por un residuo lipofílico podría contribuir a alteraciones estructurales en la proteína a interferir con su ensamblaje en la membrana.

De igual manera, el SNP G1199A en el exón 11 Ser400Asn resulta en un cambio significativo de carga en la proteína dependiente del pH y del punto isoeléctrico del residuo.

Por último, siete mutaciones sinónimas están ubicadas en los intrones: A1a/-41G, G5/-25T, G5/-35C, C6/139C, C12/+44T, T17/-76A, A17/137G.

Estratégicamente no hay SNPs que cambien los sitios de glicosilación ni de fosforilación. Asimismo, ninguno conduce a cambios de aminoácidos en los loops A, D, H y Q de los motivos Walker A, aunque dos polimorfismos sinónimos se encontraron en el primer motivo Firma y otro en el primer motivo Walker B.

Englobando las características de los SNPs de MDR1 como la baja incidencia en los dominios transmembranales, la ausencia en los sitios de glicosilación y fosforilación junto con la secuencia proteica altamente conservada en organismos diferentes; se concibe la idea que todos los dominios y motivos P-gp son críticos para la preservación de la integridad estructural y función del gen a través de la evolución.

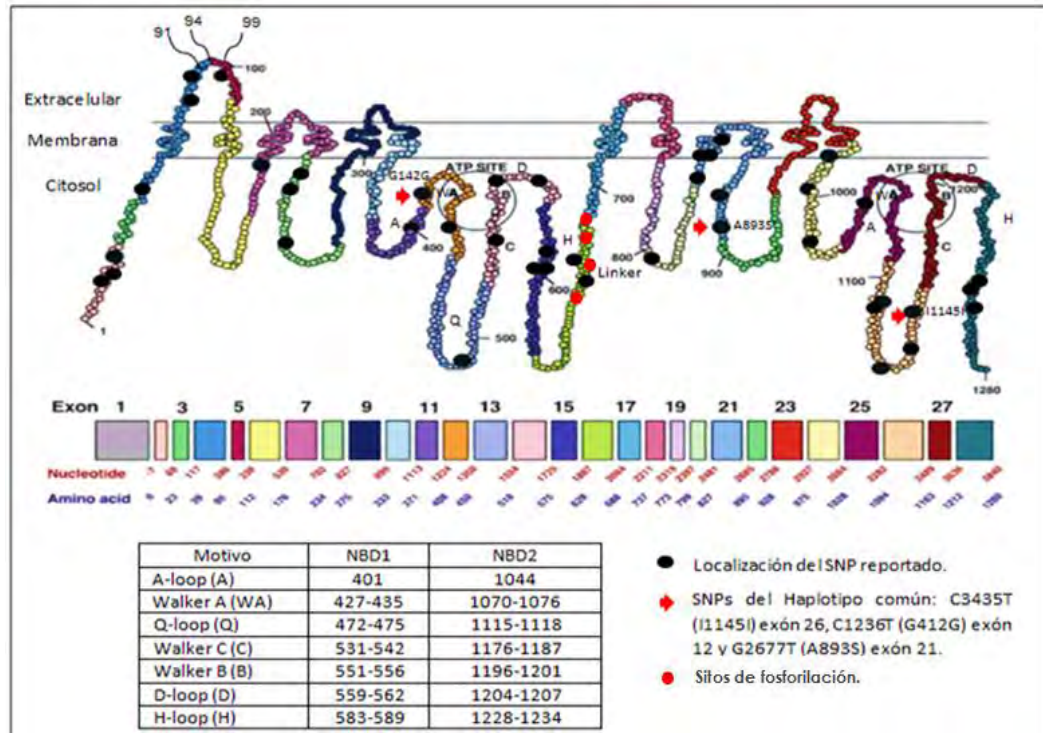


Fig.46. Representación esquemática, distribución de SNPs en el gen MDR1 que afectan la secuencia codificante en el modelo estructural bidimensional (2-D) de la P-gp. 28 exones del gen se muestran y la región de la P-gp codificada por un exón determinado es resaltada en el mismo color que en el modelo. Imagen modificada de: Leung Fung, King and Gottesman M., Michael. *A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function*. Biochimica et Biophysica Acta. 2009, 1794, 860–871.

2.8.1. Susceptibilidad a enfermedades.

Debido a que los cambios en la función y expresión de P-gp incrementan la exposición de diversos tejidos y órganos a los xenobióticos potencialmente tóxicos, es plausible la hipótesis que la expresión genotipo dependiente de esta proteína pueda alterar su papel fisiológico de protección y contribuir a una mayor susceptibilidad en determinadas enfermedades, sugiriendo la posibilidad de diagnóstico basado en la secuenciación génica. Hasta la fecha, varios SNPs en el gen MDR1 se han relacionado con la predisposición al desarrollo de varios tipos de cáncer, enfermedades intestinales inflamatorias que incluye la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, enfermedades hepáticas y renales (cirrosis y síndrome nefrótico), hipercolesterolemia, la enfermedad de Parkinson, Epilepsia y respuesta a la terapia del VIH.¹⁰¹

¹⁰¹ F. Fromm, Martin. *Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers*. Trends in Pharmacological Sciences 2004, 25 (8),

Particularmente, el polimorfismo C3435T que se asocia con una expresión de P-gp intestinal baja es el que más interés ha concentrado ya que está sobrerrepresentado en los pacientes con colitis ulcerosa (UC) y se ha identificado como un factor de riesgo para el desarrollo de dicha enfermedad apoyando la noción de que la expresión de P-gp desempeña un papel importante en la defensa contra bacterias intestinales.¹⁰²

Otros estudios también han encontrado que este SNP ocurre con mayor frecuencia en pacientes con aparición temprana de enfermedad de Parkinson en comparación con los pacientes wild type. La enfermedad y/o inicio más temprano se cree que posiblemente es el resultado, en parte; de la acumulación gradual de toxinas ambientales en el cerebro y es muy probable que el polimorfismo exponga a las neuronas a una mayor concentración de sustratos P-gp potencialmente neurotóxicos debido a la capacidad reducida de eflujo. Además, la mutación podría contribuir al desarrollo de otras enfermedades neurológicas.

En pacientes con carcinoma de células renales, se ha reportado que la frecuencia del alelo-T en la posición 3435 está significativamente aumentada en comparación con los controles sanos. Este hallazgo puede explicarse por el hecho de que SNP está asociado con una expresión más débil del gen MDR1 en los riñones.

Finalmente podría ser de importancia clínica en la respuesta al tratamiento del VIH; pacientes con el genotipo homocigoto 3435TT experimentaron en promedio un aumento significativo en los recuentos de células CD4+ y una marcada mejoría en la infección viral en comparación con el genotipo CT o CC. Aunque no se han realizado otros estudios a largo plazo, esta última evidencia pone de relieve el efecto de este polimorfismo sobre el retraso de la propagación de la enfermedad y mejores resultados para la terapia antirretroviral.

¹⁰² S.-F. ZHOU. *Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition*. *Xenobiotica*. 2008, 38 (7–8) 802–83.

3. GLICOPROTEINA P E IMPORTANCIA CLÍNICA.

3.1. Cáncer

Cualquiera que sea la causa, el cáncer es básicamente una enfermedad de las células donde su crecimiento no está controlado como resultado de un desequilibrio entre la tasa de proliferación celular y la apoptosis (muerte celular programada).

A pesar de una intensa investigación en los últimos tres decenios, la quimioterapia eficaz sigue siendo difícil de alcanzar. Para muchos tipos de cáncer, este tratamiento todavía proporciona una terapia paliativa más que curativa.

Un problema importante y complejo es la resistencia a múltiples fármacos. La capacidad de las células cancerosas para convertirse simultáneamente resistentes a diferentes medicamentos contra el cáncer es, de hecho; la principal razón para la alta tasa de fracaso de la quimioterapia del cáncer.

Se estima que contribuye en más del 90% de las muertes por cáncer por lo que este es un problema importante que requiere ser abordado con la mayor eficacia posible.

La etiología de la MDR puede ser multifactorial y extremadamente versátil, pero la magnitud de resistencia clásica a los fármacos citotóxicos se ha corelacionado con la sobreexpresión de la P-gp al propiciar una ventaja selectiva en la adaptación al medio hostil, fenómeno que obtaculiza la eficacia del tratamiento terapéutico.

Una adecuada valoración clínica en términos de detección sensible y reproducible de la expresión y función son críticos para conducir a protocolos clínicos dirigidos a la modulación de la P-gp.

La coadministración de inhibidores con agentes citotóxicos puede revertir la MDR y mejorar los resultados del tratamiento. Sin embargo, a pesar de la promesa de los resultados *in vitro*, la modulación acertada de MDR a través del bloqueo químico sigue siendo difícil de alcanzar.

Con los años, varias generaciones de moduladores MDR1 han aumentado las esperanzas pero presentan fallos en el transcurso de los ensayos clínicos. Hay probablemente dos razones generales del fracaso de muchos de estos ensayos para demostrar efectos beneficiosos: (1) el uso de moduladores débiles y no específicos (2) múltiples mecanismos redundantes de resistencia celular.

La inespecificidad de los inhibidores conduce a la toxicidad intrínseca en las demás barreras farmacológicas lo que resulta en la alteración del perfil farmacológico de la simultánea quimioterapia administrada.

Por su parte, aunque el eflujo de fármaco mediado por P-gp parece ser el componente principal de la resistencia clínica a la quimioterapia, se ha acumulado evidencia que la MDR suele ser de naturaleza multifactorial debido a la población de células tan heterogénea que se encuentran en el cáncer, así; un tumor sensible puede volverse resistente a un determinado medicamento a través de una o más vías moleculares de resistencia que se producen dentro de la misma célula tumoral asociándose con pobres resultados clínicos en los diferentes tipos de cáncer. Tan solo en transportadores eflujo, existen al menos cuatro tipos que se sabe que contribuyen a la MDR mediante la reducción de las concentraciones de fármacos intracelulares con la consecuencia de que la inhibición de las proteínas de transporte puede, hasta cierto punto; ser insuficiente para revertirlo por completo, no obstante, se ha sugerido que la modulación de P-gp en etapas tempranas del cáncer puede retrasar la aparición de la farmacorresistencia.

3.2. Enfermedades del SNC.

Los mecanismos de resistencia que operan en el cáncer y en las enfermedades infecciosas también pueden plantear problemas significativos en la farmacoterapia para una serie de trastornos neurológicos del SNC. Los transportadores de eflujo que se expresan en la barrera hematoencefálica son un área de investigación que está creciendo en interés e impulso en el campo de la neurofarmacología ya que limitan la capacidad de muchos fármacos para acceder al cerebro desarrollando resistencia al tratamiento farmacológico. En particular; la glicoproteína P, es un elemento fundamental. Su nivel de expresión, multiespecificidad y potencia de transporte la hacen un portero selectivo de la BHE y, por lo tanto; un obstáculo importante para la administración de fármacos en el cerebro específicamente orientada a la eficacia de la terapia prescrita para el tratamiento de muchos trastornos cerebrales, tales como enfermedades neurodegenerativas, cáncer de cerebro, epilepsia, esquizofrenia, depresión y neuro-SIDA (demencia asociada al VIH).¹⁰³

Esta complicación se aprecia mejor en las comparaciones de distribución de fármaco realizadas con ratones *wyld* tipe y *knockout* así como en estudios en los que la función del transportador se suprime mediante inhibidores donde la pérdida total de la proteína resulta en un aumento de 10-50 veces en los niveles cerebrales de una serie de fármacos altamente lipofílicos.

En la mayoría de estos casos, es todavía incierto si la regulación positiva de la P-gp en células diana se debe a la presencia y/o desarrollo de la enfermedad *per se* o si se produce durante la terapia con medicamentos, es decir; si es una sobreexpresión constitutiva o adquirida (inducida) o ambos mecanismos coexisten.

¹⁰³ Lee, Gloria and Bendayan Reina. *Functional expresión and Localization of P-glicoprotein in the Central Nervous System: Relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders*. Pharmaceutical Research. 2004, 21 (8), 1313-1330.

Mientras tanto, la sobreexpresión de la P-gp en los tejidos cerebrales de cáncer, infección por VIH, y la epilepsia parece desempeñar un papel significativo en la acumulación y distribución de agentes farmacológicos. En contraste, en trastornos neurológicos tales como Alzheimer y Parkinson, los niveles de expresión en el cerebro han sido implicados en la etiología, patogénesis y/o la progresión de la enfermedad.

3.2.1. Epilepsia.

La epilepsia define un grupo de trastornos neurológicos crónicos a menudo progresivo caracterizados por la aparición impredecible de convulsiones recurrentes. Es una de las enfermedades más comúnmente diagnosticada que afecta aproximadamente del 1 al 2% de la población mundial, según la Organización Mundial de la Salud.¹⁰⁴

El tratamiento de primera elección en la epilepsia es la administración crónica de fármacos antiepilépticos (AEDs). A pesar de los considerables avances en el tratamiento farmacológico, el 30% de los pacientes epilépticos no responden a los regímenes de tratamiento actuales incrementándose las tasas de morbilidad y mortalidad.¹⁰⁵

Aunque las razones de la epilepsia resistente es probablemente multifactorial y las bases fisiopatológicas y mecanismos exactos todavía no se comprenden totalmente; la evidencia apoya cada vez más que este fenómeno se debe a una disminución de la absorción de fármaco en el cerebro por sobreexpresión de la P-gp en el endotelio capilar de la BHE resultado de las convulsiones como un mecanismo contributivo. Esta hipótesis ha sido reforzada por los resultados de una elevada expresión de transportadores de eflujo en los focos epilépticos.

¹⁰⁴ Lee, Gloria and Bendayan Reina. *Functional expresión and Localization of P-glicoprotein in the Central Nervous System: Relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders*. Pharmaceutical Research. 2004, 21 (8), 1313-1330.

¹⁰⁵ Dallas, Shannon; S. Miller, David and Bendayan, Reina. *Multidrug Resistance-Associated Proteins: Expression and Function in the Central Nervous System*. Pharmacol. Rev. 2006, 58 (2), 140–161.

Además, los pacientes con epilepsia resistente son significativamente más propensos a tener el genotipo homocigoto CC en 3435 que el genotipo TT el cual se asocia con una expresión superior de la proteína proporcionando evidencia de un factor genético asociado con esta enfermedad.

Otra característica importante de la epilepsia farmacorresistente (también llamada epilepsia intratable), es que los pacientes muestran resistencia a varios, sino es que a todos los fármacos antiepilépticos, incluso si estos actúan por diferentes mecanismos. Particularmente, varios estudios en animales proporcionan evidencia que algunos medicamentos antiepilépticos de uso frecuente son sustratos de la P-gp e incluso pueden propiciar su inducción. Los AEDs incluyen fenitoína, carbamazepina, lamotrigina, gabapentina, topiramato, felbamato y fenobarbital.

3.2.2. Depresión.

La depresión es un trastorno del estado de ánimo y se manifiesta a través de síntomas psíquicos o somáticos; es un fenómeno heterogéneo tanto en su manifestación como en su trasfondo bioquímico y genético con múltiples sistemas implicados. Se considera que entre el 29% y el 46% de los pacientes no responden plenamente al tratamiento lo que deriva en mayor número de recaídas y un aumento de las posibilidades de que el trastorno se vuelva crónico con menos perspectivas de recuperación.¹⁰⁶

Los mecanismos subyacentes a la resistencia de fármacos antidepresivos son poco conocidos, sin embargo; debido a que la depresión y otras psicosis son comorbilidades comunes de epilepsia, es factible la noción que puede estar relacionada con la sobreexpresión de los transportadores de eflujo en la BHE. Particularmente, varios antidepresivos como la

¹⁰⁶ Löscher, Wolfgang and Potschka, Heidrun. *Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family*. The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. 2005, 2, 86–98.

amitriptilina, nortriptilina, paroxetina, citalopram, sertralina, trimipramina y venlafaxina son sustratos de la P-gp y en ratones knockout, la penetración de estos fármacos en el cerebro se incrementa.

3.2.3. Neoplasia cerebral.

Las neoplasias cerebrales son conocidas por desarrollar MDR rápidamente dando lugar a serios obstáculos en el tratamiento farmacológico. Desafortunadamente para muchos tipos de cáncer de cerebro, la tasa de éxito clínico de la quimioterapia ha sido muy baja y el pronóstico de la mayoría de estos pacientes sigue siendo pobre.

El papel de la P-gp en la resistencia del tumor cerebral es convincente porque está presente en BHE, astrocitos y microglia para evitar la acumulación de sustancias potencialmente tóxicas en el SNC. En el caso de los tumores cerebrales primarios (astrocitomas y glioblastomas), presentan una BHE intacta con una sobreexpresión de P-gp lo que limita la eficacia del tratamiento antitumoral. En tumores cerebrales metastásicos se produce una neovascularización carente de BHE, por lo que no muestran resistencia a la quimioterapia y tienen mejor pronóstico.

3.2.4. Demencia asociada al VIH/SIDA.

El SNC es conocido por ser un sitio santuario de replicación para el virus del VIH y por lo tanto, es un importante tejido diana para los agentes antirretrovirales. El objetivo principal de la infección en el cerebro es la microglía, las células inmunes residentes, y en menor medida; los astrocitos. Más del 50 % de los pacientes con VIH/SIDA experimenta una debilidad neurológica anormal durante el curso de la enfermedad.¹⁰⁷

HAD también conocida como encefalopatía por VIH, es una de esas anomalías caracterizada por una variedad de trastornos neurológicos incluyendo disfunción cognitiva, conductual y motora.

¹⁰⁷ Dallas, Shannon; S. Miller, David and Bendayan, Reina. *Multidrug Resistance-Associated Proteins: Expression and Function in the Central Nervous System*. Pharmacol. Rev. 2006, 58 (2), 140–161.

Varias clases de medicamentos antirretrovirales están aprobados clínicamente para el tratamiento como los nucleósidos inhibidores de la transcriptasa e inhibidores de la proteasa. Directrices de tratamiento actuales recomiendan el uso de múltiples agentes antirretrovirales de forma simultánea, es decir; la llamada terapia antirretroviral de alta actividad (highly active antiretroviral therapy, HAART). Este tratamiento ha cambiado radicalmente el panorama clínico de la infección, no obstante; prácticamente la totalidad de los medicamentos que se utilizan para combatirla como ritonavir, indinavir, nelfinavir y saquinavir no se absorben eficientemente en el cerebro debido a que poseen una alta afinidad por la glicoproteína P lo que probablemente contribuye a la capacidad del virus para permanecer altamente resistente a los regímenes HAART actuales creando así un santuario potencial para la replicación. Además, la presencia del VIH y/o fármacos antirretrovirales pueden ser un factor en la regulación positiva de la P-gp en células infectadas.

3.2.5. Alzheimer.

La prevalencia de la Enfermedad de Alzheimer (EA) se ha ido incrementado rápidamente. Hay más de 15 millones de casos de EA en el mundo y es la causa más frecuente de demencia relacionada con la edad en personas mayores.¹⁰⁸ Es un trastorno neurológico progresivo que comienza por la pérdida de la memoria, disminución significativa de células neuronales y atrofia cerebral principalmente en el hipocampo y la corteza hasta incluir deterioro cognitivo grave.

Las dos principales características neuropatológicas de la EA son los ovillos neurofibrilares y placas neuríticas. Las placas neuríticas están compuestas principalmente del acúmulo anómalo y excesivo de la proteína beta-amiloide (también llamada A β) que es secretada fuera de

¹⁰⁸ Lee, Gloria and Bendayan, Reina. *Functional Expression and Localization of P-glycoprotein in the Central Nervous System: Relevance to the Pathogenesis and Treatment of Neurological Disorders*. Pharmaceutical Research. 2004, 21 (8), 1313-1330.

las neuronas y parecen contribuir a la forma más común de Alzheimer, con el 99% de los casos.

El mecanismo exacto por el cual la enfermedad tiene lugar sigue siendo desconocido. Sin embargo, la evidencia apunta a que la deposición insoluble de A β inicia una cascada de procesos inflamatorios locales al ser una sustancia extraña que se debe tratar de depurar. Por eso, a cada placa llegan proteínas de fase aguda que incluyen microgliosis y astrocitosis. La activación de la microglia y astrocitos resulta en la secreción y la acumulación de factores neurotóxicos por lo que el resultado final es la disfunción neuronal.

La A β es una proteína de aproximadamente 40 o 42 aminoácidos de longitud y consiste en dos grandes péptidos A β 40 y A β 42; 28 aminoácidos hidrófilos que residen intracelularmente y en el fluido intersticial del cerebro y 12-14 aminoácidos hidrófobos que permanecen asociados con la membrana después de la escisión enzimática. Tanto los péptidos A β hidrófilos e hidrófobos se secretan a partir de células neuronales y no neuronales.

Existen dos vías tentativas para dar lugar a la acumulación de A β en el cerebro: la sobreproducción y la reducción de la eliminación. Sin embargo, sólo el 5% de los casos se debe a la sobreproducción de A β , mientras que la mayoría (95%) son causados probablemente por disfunciones en su degradación y eliminación.

Debido a que la P-gp ha demostrado transportar activamente una amplia gama de moléculas lipófilas y anfipáticas de las células, es asequible que esta proteína sea la responsable del transporte y contribuir en la eliminación de A β de las células cerebrales a través de la barrera hematoencefálica.

El bloqueo farmacológico de la P-glicoproteína en la BHE disminuye rápidamente los niveles extracelulares de secreción de b-amiloide. También, se ha reportado una correlación inversamente proporcional entre la acumulación/deposición de placas b-amiloide y el grado de expresión de P-glicoproteína en la BHE conduciendo a una expectativa razonable de que los altos niveles de la P-gp pueden servir como una medida de protección mediante la eliminación de los niveles excesivos de péptidos A β del cerebro. Investigaciones adicionales han demostrado una disminución progresiva en el nivel de P-gp en la BHE durante el envejecimiento normal, relacionándose positivamente con la acumulación de A β .

Al parecer, estos resultados y observaciones sugieren que la glicoproteína P es necesaria para el transporte de beta-amiloide a través de la BHE y que la inhibición de ese transportador aumenta su formación y agregación, lo que conduce a un mayor riesgo para el desarrollo de la EA. En consecuencia, este transportador así como sus homólogos pueden contener parte de la clave para la comprensión de la patogénesis de esta enfermedad; bajo este contexto, su regulación positiva en la BHE representaría un nuevo enfoque alternativo de la terapia directa en la eliminación o por lo menos en el control de la acumulación tóxica de péptidos A β en el cerebro.

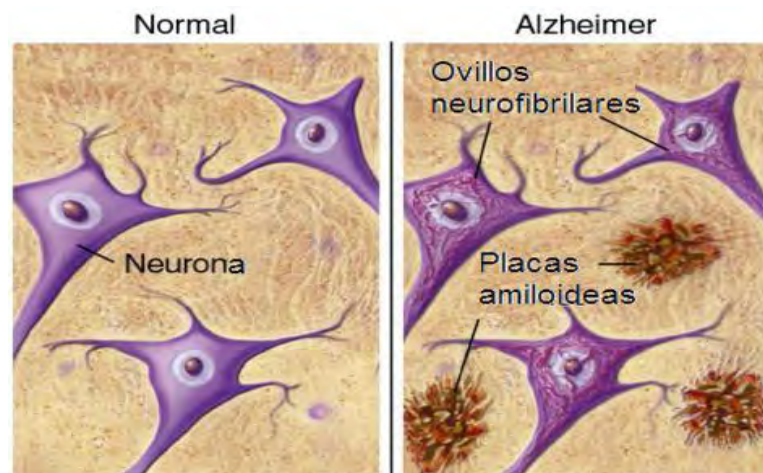


Fig.47. Placas de beta-amiloide y ovillos neurofibrilares. Imagen obtenida de: www.triplenlace.com

3.2.6. Parkinson.

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico que conduce con el tiempo a una incapacidad. En México, más de 500 mil personas padecen esta enfermedad que cada vez va más en aumento. Se estima en el año 2040 se duplicarán los casos en la población mundial.

Existen dos formas de EP: las formas familiares que se heredan como rasgos dominantes o recesivos autosómicos (factores genéticos) y la forma esporádica, en la que los factores ambientales juegan un papel importante. Al respecto, una gran cantidad de factores de riesgo ambientales se ha investigado y datos recabados sugieren que la exposición a los pesticidas y a otros contaminantes ambientales tales como 1-metil-4-fenilpiridinio está asociada con esta enfermedad.

Debido a este acentuado vínculo, el interés se ha desarrollado en el campo de los polimorfismos genéticos entre los factores potenciales del huésped como los transportadores y enzimas encargados en la absorción, metabolismo y distribución de estas toxinas y a su vez, ser candidatos plausibles como genes de riesgo EP. Estudios epidemiológicos sugieren que los polimorfismos del gen MDR1 podrían ser indicadores potenciales al influir en la aparición individual de la enfermedad en sujetos expuestos a pesticidas sustrato para la P-gp de diferentes clases incluyendo organoclorados, organofosforados, piretroides y halofenoles que son capaces de inducir estrés oxidativo.¹⁰⁹

Puntualmente, se ha investigado una asociación significativa entre los pacientes con Parkinson expuestos a pesticidas y el polimorfismo C3435T del gen. Los pacientes con al menos un alelo 3435T (es decir homocigotos y heterocigotos) tienen un riesgo significativo 5 veces mayor

¹⁰⁹ Leslie, Elaine M. and Deeley, Roger G. Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004, 204, 216-237.

a padecer la enfermedad. Esta observación sugiere que la baja expresión de P-gp en la BHE, así como en otros compartimentos del cerebro puede disminuir el mecanismo de protección de sustancias potencialmente tóxicas fuera del cerebro.

Tomados en conjunto, parece que la mutación del gen MDR1 predispone a los efectos perjudiciales de los pesticidas y posiblemente otros compuestos tóxicos que caracteriza MDR1, además; se están tomando en cuenta otros transportadores como genes candidato para la enfermedad de Parkinson.

3.3. VIH/SIDA

La P-glicoproteína juega también un importante papel para el tratamiento de VIH en varias maneras. En primer lugar, puede haber un vínculo entre su expresión y la infectividad del VIH. En segundo lugar, los inhibidores de la proteasa del VIH son sustratos de P-glicoproteína y es muy probable que contribuya (además de la CYP3A4) a una baja y variable Biodisponibilidad de estos compuestos en los sitios barrera (por ejemplo, cerebro, testículos) lo que posiblemente contribuye a la persistencia del virus en estos sitios. Por último, la P-glicoproteína se expresa en las subpoblaciones de linfocitos incluyendo células CD4+, el principal objetivo del VIH.

4. PERSPECTIVAS

4.1. Estrategias para la inhibición de la Glicoproteína P.

En vista de la importancia de P-gp tanto en la absorción de fármacos como en el tratamiento de diversas enfermedades, y debido a que la mayoría de los agentes sometidos a eflujo son actualmente insustituibles en los regímenes terapéuticos, se han realizado varios esfuerzos para identificar inhibidores químicos viables que interfieran con las actividades de expulsión de este transportador.

Específicamente, la glicoproteína P puede ser inhibida o saturada de manera temporal por diversos recursos, incluyendo una serie de agentes, los cuales; bloquean su función incrementando la exposición sistémica de algunos fármacos que se absorben de manera insuficiente. La proyección inicial sobre la aplicación clínica de los inhibidores P-gp, se ha centrado primordialmente en encontrar métodos de intervención alternativos como la coadministración de quimiosensibilizadores adyuvantes para obstaculizar de forma aditiva y sinérgica la función aberrante de la bomba y revertir el fenotipo MDR. Más tarde, estas ideas indicaron que la aplicación de tales inhibidores podría potencialmente extrapolarse para modular el perfil farmacocinético y mejorar la Biodisponibilidad oral de los diferentes fármacos sustrato terapéuticamente vitales.

Hasta la fecha, basándose en especificidad, afinidad y toxicidad; los inhibidores han pasado por tres generaciones de desarrollo clasificándose en inhibidores competitivos y no competitivos de acuerdo con su correspondiente mecanismo de inhibición. Muchos de estos agentes son capaces de restaurar la citotoxicidad de los fármacos quimioterapéuticos en las células MDR in vitro y en tumores experimentales resistentes a los fármacos in vivo. Lamentablemente, sólo unos cuantos han llegado a la fase de estudios clínicos y ninguno ha sido aprobado para su uso terapéutico.¹¹⁰

¹¹⁰ Yang, Kanghui; Wu, Jifeng and Li, Xung. *Recent advances in research on P-glycoprotein inhibitors*. Bio. Science Trends. 2008; 2(4), 137-146.

4.1.1. Inhibidores de primera generación.

Los inhibidores de primera generación son sustratos farmacológicos activos de P-gp; esto quiere decir que inicialmente ya estaban en uso clínico para otras indicaciones pero que demostraron eficazmente su potencial de inhibición de manera competitiva. Ejemplos típicos son los bloqueadores de canales de calcio como verapamilo, agentes inmunosupresores como ciclosporina A, los antihipertensivos reserpina, quinidina, nifedipina, nifedipino y yohimbina; antiestrógenos como el tamoxifeno y toremifena y el antineoplásico vincristina.¹¹¹

Desafortunadamente, estos fármacos a menudo producen resultados desalentadores in vivo. Su aplicación clínica está limitada por la toxicidad y/o efectos secundarios (por ejemplo la cardiotoxicidad relacionada con el uso de verapamilo, la nefrotoxicidad el uso de la ciclosporina A y mielosupresión).

Debido a que ninguno es muy potente y específico, se requieren dosis altas para inhibir a la P-gp más allá de los niveles de dosis tolerables requeridos para su actividad terapéutica dando como resultado toxicidades inaceptables, situación que pone severas restricciones sobre las concentraciones plasmáticas que se pueden alcanzar con seguridad en el paciente.

Además, su actividad reducida se puede explicar en base a que estrictamente no son inhibidores reales siendo considerados “pseudosustratos” al actuar directamente como inhibidores competitivos mediados sólo a través de sitios de unión. Otra desventaja surge a partir de los efectos secundarios como la disminución en la eliminación del fármaco debido a la interferencia en la actividad de otros transportadores ABC con funciones fisiológicas en tejidos normales.

¹¹¹ Manthena V.S. Varma, Yasvanth Ashokraj, Chinmoy S. Dey, Ramesh Panchagnula. *P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement*. Pharmacological Research. 2003, 48, 347–359.

4.1.2. Inhibidores de segunda generación.

Para superar las limitaciones de los inhibidores de primera generación, se desarrollaron nuevos moduladores con una mayor potencia, afinidad y menos efectos tóxicos. Los quimiosensibilizadores originales fueron modificados estructuralmente; su quiralidad se alteró para lograr un mejor o un nulo perfil farmacológico a fin de reducir en gran medida la toxicidad y efectos secundarios inherentes de los compuestos predecesores.

Este esfuerzo en aras de disminuir la toxicidad y aumentar la especificidad, resultó en el diseño de los inhibidores de segunda generación, los cuales; son no competitivos, carecen de actividad farmacológica y al ser altamente afines, no son transportados por la proteína, o bien; son lentamente transportados lo que extiende su capacidad inhibidora.

Los inhibidores representativos de segunda generación se pueden dividir en dos categorías. La primera que representa a la mayoría, se limita a los derivados o análogos de los fármacos de primera generación como el SDZ PSC 833 (valsopodar), dexverapamilo el isómero R del verapamilo sin actividad cardíaca, emopamil, galopamil dexniguldipino, transflupentixol, la quidina analógica dofequidar MS-209, entre otros. La segunda categoría está compuesta principalmente por los agentes de investigación con estructuras químicas novedosas tales como S-9788, elacridar (GF120918) y biricodar (VX-710).

El mejor caracterizado y más estudiado de estos agentes es el valsopodar SDZ PSC 833 (PSC 833) un análogo de la ciclosporina A sintetizado en 1991 que no presenta actividad inmunosupresora o induce nefrotoxicidad; es un inhibidor no competitivo al no ser transportado por la P-gp y se puede administrar en dosis bastante altas en pacientes (su potencia inhibidora es 5-20 veces superior que la de la ciclosporina A). El descubrimiento de esta molécula marcó el inicio de la segunda

generación.¹¹² De igual manera, el GF120918 (también llamado GG918) y el VX-710 son inhibidores altamente eficaces desarrollados específicamente para este propósito. Su beneficio clínico es similar ya que se pueden administrar también a muy altas dosis orales sin efectos tóxicos evidentes.

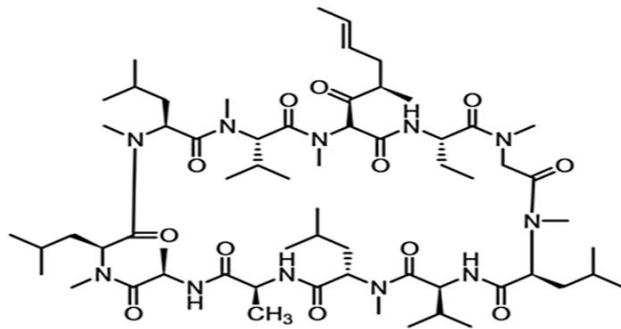
No obstante, a pesar del despliegue de sus capacidades se han sometido a numerosos ensayos clínicos en combinación con agentes citotóxicos pero los resultados han sido insatisfactorios pues aún conservan algunos rasgos moleculares que limitan su utilidad. La característica más renuente se centra en que estos moduladores inhiben de manera colateral el metabolismo y la excreción de los fármacos co-administrados. Debido a que fueron diseñados mediante la optimización quiral, terminaron siendo inevitablemente sustratos del CYP3A4 lo que les hace competir con los fármacos concomitantes afectando su metabolismo y provocando interacciones farmacocinéticas impredecibles.

A título de ejemplo, Valspodar, Elacridar y Biricodar son sustratos del citocromo CYP3A4 e inhiben el metabolismo del paclitaxel y la vinblastina, situación que conduce a un aumento de las concentraciones de estos fármacos citotóxicos y a un mayor riesgo de toxicidad en los pacientes. Asimismo, muchos fármacos citotóxicos que son sustratos de P-gp, tales como etopósido y doxorubicina; son también ampliamente degradados por la enzima CYP3A4. Por lo tanto, la administración conjunta con los inhibidores de segunda generación, puede intensificar los efectos secundarios tóxicos de estos medicamentos.

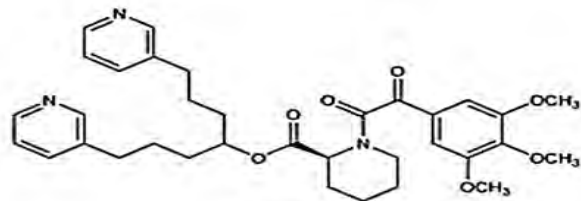
La respuesta de los investigadores ante esta interacción fue la reducción sustancial de la dosis del agente citotóxico para el tratamiento seguro del paciente.

¹¹² Thomas, Hilary and Coley, Helen M. *Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein*. Cancer Control. 2003, 10 (2), 159-165.

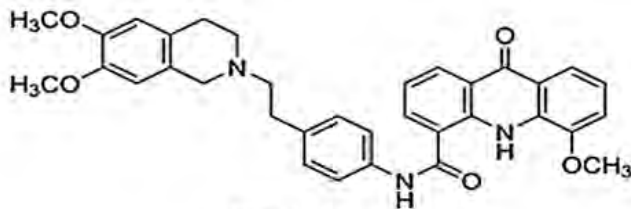
Otra limitante importante que persistió tiene lugar en relación a que algunos de estos moduladores no sólo inhiben a la P-gp sino también funcionan como sustratos para otros transportadores, en particular; para los de la familia de transportadores ABC al tener rasgos en común. Debido a que estos transportadores tienen funciones fisiológicas a menudo vinculadas con la eliminación del xenobióticos (en el caso del hígado, los riñones y el tracto gastrointestinal); así como en la regulación de la permeabilidad del sistema nervioso central, los testículos y placenta; la inhibición de la P-gp disminuye la capacidad de las células y tejidos normales para protegerse del tratamiento citotóxico originando mayores efectos adversos ligados a la nueva redistribución del fármaco.



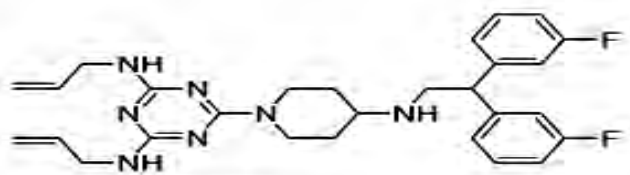
PSC833 (Valsopodar)



Biricodar



Elacridar



S9788

4.1.3. Inhibidores de tercera generación.

El avance de la química computacional, la farmacología molecular, las tecnologías de la química combinatoria y el uso y elucidación proporcionada por relaciones cuantitativas estructura-actividad, permitieron el diseño racional de moduladores P-gp de tercera generación con estructuras químicas nuevas altamente potentes y selectivas a tal grado de poseer una potencia nanomolar alrededor 10 veces mayor que los inhibidores de la primera y segunda generación.¹¹³ Además, tienen menor toxicidad inherente al reducir drásticamente la interacción con CYP3A4 y efecto mínimo sobre otros transportadores ABC (aunque no han sido probados con todos los transportadores ABC).

Más importante aún, la mayoría de los agentes a prueba han causado un mínimo de alteraciones clínicamente relevantes en la farmacocinética de los fármacos citotóxicos coadministrados. En consecuencia, las ventajas que plantean estos inhibidores los convierten en agentes potenciales para el tratamiento futuro de reversión MDR y ofrecen mejoras significativas en la quimioterapia sin necesidad de reducir la dosis.

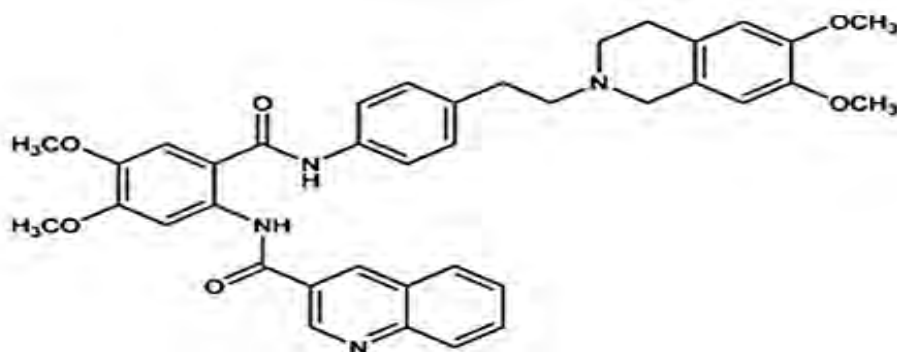
Uno de los inhibidores más prometedores es el tariquidar (XR9576), un inhibidor no competitivo derivado de la antranilamida que se une con alta afinidad al transportador P-gp en un rango nanomolar inhibiendo su actividad de ATPasa ya que actúa a nivel de los dominios de unión a nucleótido, por ende; su acción es mucho más potente y duradera que la de otros moduladores.¹¹⁴ En pacientes con tumores sólidos no altera la farmacocinética del paclitaxel, la vinorelbina y la doxorubicina. Se cree que es el más competente, pero aún suspendido debido a informes de toxicidad desfavorables en los ensayos de fase III en los casos de carcinoma de pulmón.

¹¹³ Raghava Srivalli, Kale Mohana and P. K., Lakshmi. *Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012, 48, (3), 1-16.

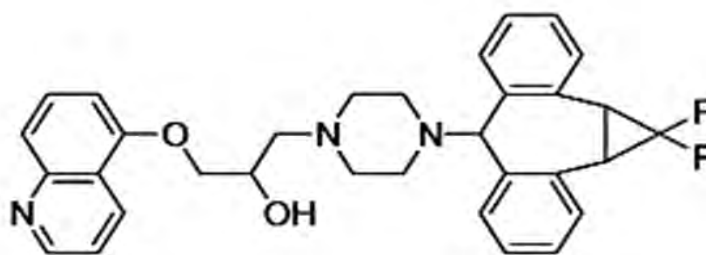
¹¹⁴ Thomas, Hilary and M. Coley, Helen. *Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein*. Cancer Control. 2003,10 (2), 159- 165.

Otros inhibidores de tercera generación que actualmente se encuentran en etapa clínica son el LY335979 (zosuquidar, un derivado de la quinolona), R101933 (laniquidar), FG020326 y ONT-093 (OC144-093).¹¹⁵

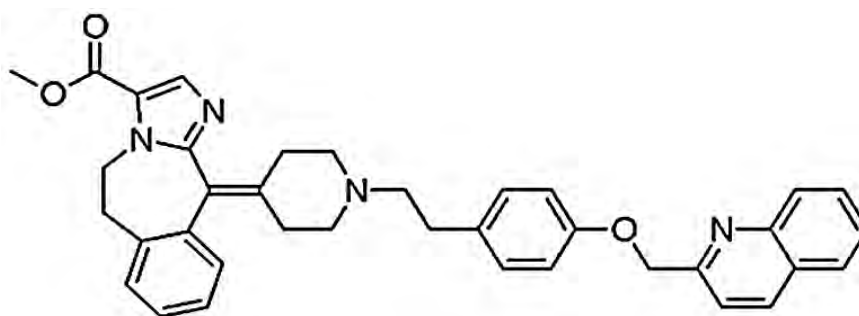
A pesar de la fuerte potencia in vitro, no hay ningún fármaco comercial para uso en terapia MDR. La eficacia y seguridad de estos moduladores se encuentra todavía bajo evaluación en los ensayos clínicos en curso.



Tariquidar



Zosuquidar



Laniquidar

¹¹⁵ Paredes, Alfredo, Blanco, José L. y Echenique-Elizondo, Miguel. *Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos*. Cir Esp. 2006, 79(4), 202-214.

-Otros inhibidores.

Para eludir la acción de la P-gp, recientemente se están adoptando otras estrategias de inhibición. El uso de excipientes, formulaciones farmacéuticas, profármacos y una serie de inhibidores naturales y sintéticos ha ampliado la investigación.

4.1.4. Excipientes.

Inhibidores poliméricos y surfactantes.

Debido a que la P-gp reside en la bicapa lipídica, se han identificado varios aditivos farmacéuticos y excipientes usados comúnmente en formulación que demuestran una influencia indirecta e inespecífica en la proteína al controlar el estado físico de la membrana alterando la integridad de los lípidos en la bicapa y promoviendo cambios en la fluidez.

Además, pueden actuar como desnaturalizantes; el cambio en la estructura secundaria y terciaria se ha encontrado que es la razón de la pérdida de la función de P-gp debido a las perturbaciones en el ambiente hidrofóbico.

Estos excipientes corresponden a varias categorías como cosolventes, tensoactivos, gomas aniónicas, tiómeros, polímeros y excipientes lipídicos. Estos inhibidores parecen ser la mejor opción, puesto que ya fueron aprobados y validados en el proceso de fabricación para su uso rutinario en las formulaciones farmacéuticas, y exhiben menos efectos secundarios sistémicos al no ser absorbidos *per se* en el TGI.

4.1.5. Formulaciones farmacéuticas.

En el escenario actual, hay un creciente desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos como microesferas, nanopartículas y liposomas que tienen actividad inherente para inhibir a la P-gp. Los liposomas son conocidos por saturarla, revirtiendo el eflujo. Las nanopartículas, conjugados poliméricos y sistemas micelares pueden pasar desapercibidos ante el efecto de la P-gp ya que se transportan en las

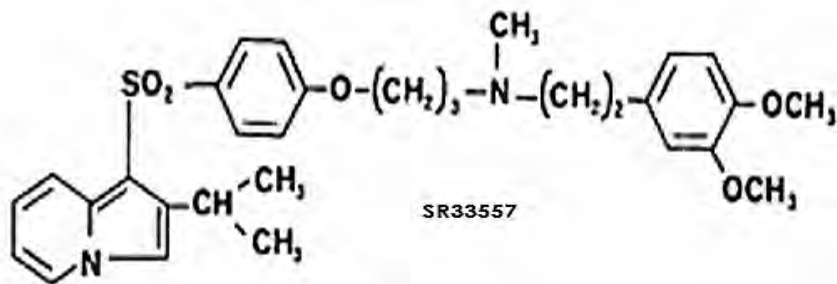
células a través de endocitosis en contraste con la difusión simple típica de los fármacos.

Además, sistemas en los que los agentes terapéuticos y sensibilizadores pueden ser incorporados para la entrega simultánea en las células se están explorando para mejorar aún más la eficacia de la quimioterapia. Esta estrategia de formulación puede ser mediante la encapsulación ya sea del quimiosensibilizador o del fármaco mientras que el otro es entregado libremente, o bien; la co-encapsulación de ambos.

4.1.6. Inhibidores irreversibles.

Existe un interés en el desarrollo de novedosos inhibidores no competitivos donde el inhibidor se une alostéricamente al transportador generalmente de manera irreversible independientemente de cualquier sustrato o de la concentración del mismo.

El SR33557 es un nuevo inhibidor desarrollado para revertir la MDR; enlaces covalentes se forman entre el inhibidor y el transportador modificando su estructura a tal grado que es incapaz de unirse ya sea el sustrato o sufren el cambio conformacional necesario para impedir el paso a través de la membrana. A medida que el transportador está desactivado de forma permanente, se elimina de la membrana por endocitosis y es degradado por la lisozima. Para que la función del transportador se reanude, uno nuevo necesita ser sintetizado o ensamblado en la membrana.



4.1.7. Profármacos.

Uno de los intentos racionales de éxito en el desarrollo de inhibidores sería reducir la afinidad del sustrato por la proteína impartiendo cambios en la estructura química del fármaco siempre que sea aplicable.

Val-quinidina, un profármaco obtenido mediante derivatización de la quinidina se reportó con éxito para eludir el transporte de P-gp así como la derivatización del inhibidor de la proteasa del VIH saquinavir.¹¹⁶

Esta medida parece ser una estrategia viable y muy interesante porque la modificación de profármacos evitaría la necesidad de inhibidores administrados de forma adicional. La limitación con este enfoque podría ser la pérdida de la acción farmacológica.

4.1.8. Saturación

Hay muchas razones que pueden explicar por qué el papel de la P-gp en la absorción de algunos fármacos no es cuantitativamente tan importante como algunos investigadores sugieren; muchos fármacos son buenos sustratos y sin embargo presentan una Biodisponibilidad oral razonable. La posible respuesta radica en que la difusión simple de muchos de sus sustratos y la velocidad de disolución es significativamente mayor que el transporte de eflujo y el metabolismo intestinal. En otras palabras, cuando el influjo pasivo del fármaco excede el rango de extrusión de la glicoproteína P supone un menor impacto en la absorción del fármaco y por lo tanto no es importante en términos de Biodisponibilidad o propiedades farmacocinéticas.

Es concebible también que debido a que el número de glicoproteínas es limitado, el ciclo de transporte es de capacidad restrictiva o saturable, situación que interfiere con la continuidad del proceso en los sitios de unión a sustrato favoreciendo la absorción del fármaco. Esto es

¹¹⁶ Kale Mohana, Raghava Srivalli, P. K. Lakshmi. *Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational Outlook*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012, 48 (3), 353-367.

particularmente cierto para los medicamentos que se administran a dosis orales altas para su acción farmacológica (>50 mg) produciendo elevadas concentraciones de fármaco en la luz intestinal que exceden los valores de las constantes de Michaelis-Menten (K_m) para la mayoría de los sustratos de P-gp, reduciendo el proceso de eflujo.¹¹⁷

La cinética de eflujo se describe mediante la siguiente ecuación como cinética de orden mixto, cinética de Michaelis Menten, saturación, o bien; cinética no lineal dependiente de la dosis.

$$J_{pgp} = V_{max} C / K_m + C$$

J_{pgp} = Eflujo P-gp

V_{max} = Velocidad máxima de eflujo por unidad de superficie

C = Concentración de sustrato

K_m = constante de afinidad o constante de Michaelis Menten.

Asumiendo bajas concentraciones de fármaco, donde $K_m \gg C$, el eflujo sigue una cinética de primer orden. La velocidad de eflujo es proporcional a la concentración del fármaco y aumenta linealmente con la concentración de fármaco.

A concentraciones altas de fármaco, donde $K_m \ll C$, la proteína se satura y el eflujo ocurre a una velocidad constante. En otras palabras, la velocidad del proceso de eflujo se aproxima a una asíntota y se vuelve independiente de la concentración del fármaco. En este caso, el eflujo sigue cinética de orden cero.

En los casos en donde $K_m = C$, la velocidad de eflujo es la mitad de su velocidad máxima y asume la cinética de orden mixto (exhibiendo cinética de orden cero y primer orden).

¹¹⁷ H. Lin, Jiunn and Masayo Yamazaki. *Clinical Relevance of P-Glycoprotein in Drug Therapy*. Drug Metabolism Reviews. 2003, 35 (4), 417–454.

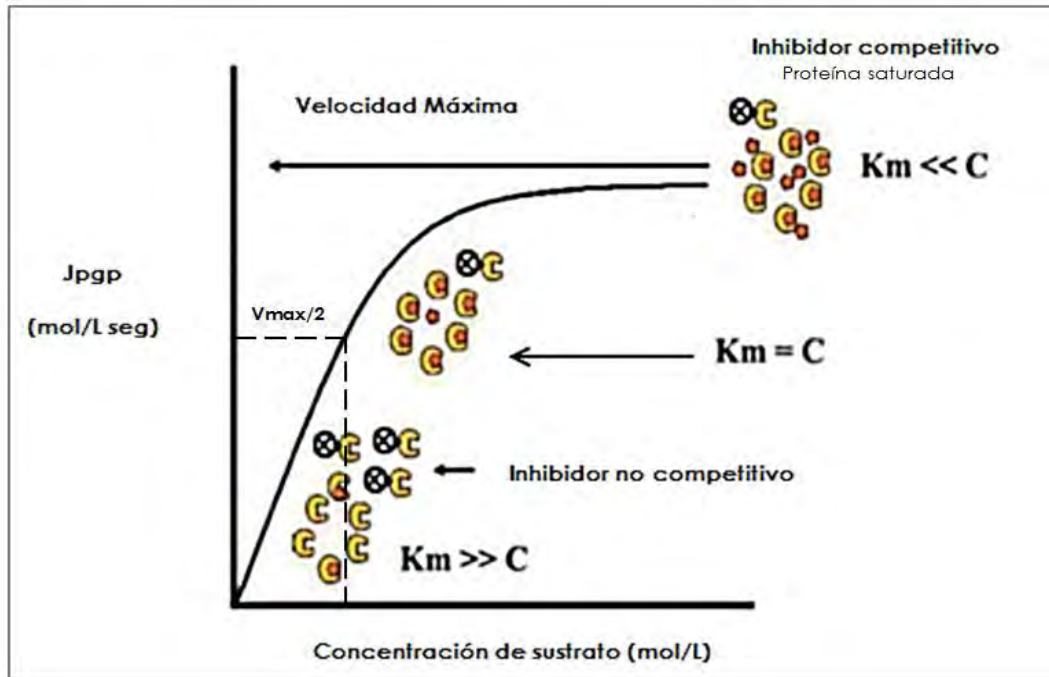


Fig.48. Gráfica de la cinética de eflujo de P-gp. Concentración de sustrato en el eje X y la velocidad de eflujo en el eje Y. El mecanismo de acción de los inhibidores competitivos y no competitivos también está representado. Imagen modificada de: Raghava Srivalli, Kale Mohana and P. K., Lakshmi. *Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012, 48, (3), 1-16.

Adicionalmente a estas alternativas, los compuestos que inhiben la hidrólisis de ATP podrían servir como mejores moduladores, ya que es poco probable que sean transportados por la P-gp y se requieren en dosis bajas, lo que es ideal para utilizar clínicamente.

Curiosamente, los flavonoides son compuestos naturales presentes en las plantas que se sabe que exhiben efectos antiproliferativos contra las células cancerosas y también se unen con alta afinidad a los NBDs de la P-gp. Estos hallazgos sugieren que los sitios de ATP también sirven como sitios de unión para los flavonoides.

La Quercitina, un flavonoide natural; se ha propuesto para bloquear la función de P-gp. En general, al ser análogo molecular del ATP interfiere con su actividad catiónica de ATPasa.¹¹⁸

¹¹⁸ Manthana V.S. Varma, Yasvanth Ashokraj, Chinmoy S. Dey, Ramesh Panchagnula. *P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement*. Pharmacological Research. 2003, 48, 347-359.

Dado que ninguno de los sustratos hasta ahora ha sido identificados para interactuar con los sitios de unión de nucleótidos e intervenir con el ciclo catalítico, explorar el mecanismo detallado de inhibición de la hidrólisis de ATP se mantiene como un área potencial para futuras investigaciones lo que proporcionaría nuevas y mejores clases de inhibidores bifuncionales con actividad potente y específica.

Finalmente, algunas aplicaciones biotecnológicas se están investigando para fines de inhibición. Los anticuerpos monoclonales (MRK16 y MRK17) pueden ser ampliamente utilizados ya que se unen específicamente a regiones pequeñas de la P-gp y bloquean los movimientos necesarios para el transporte de fármaco. Además, el silenciamiento del gen mediante el uso de oligonucleótidos antisentido y RNAs de interferencia, los cuales permiten la regulación selectiva de su expresión al igual que la de los factores transcripcionales, son también enfoques prometedores.

5. CONCLUSIONES.

La Glicoproteína P es una proteína transportadora de eflujo que funciona simultáneamente como un mecanismo biológico de protección ante toxicidades potenciales de los xenobióticos. Se caracteriza por una amplia especificidad de sustrato y una extensa expresión en diversos órganos, tejidos barrera y tipos celulares críticos para subvenir a las necesidades vitales del organismo, incluyendo aquellos órganos que intervienen en la absorción del fármaco (intestino), distribución al sitio de acción (sistema nervioso central, testículos, leucocitos) y eliminación (hígado y riñón) así como otras interfaces biológicas de importancia farmacológica convirtiéndose en un factor importante en la modulación de los procesos farmacocinéticos.

Sus implicaciones clínicas tienen mayor impacto en limitar la absorción intestinal del fármaco por vía oral y su Biodisponibilidad mediante la disminución de las concentraciones plasmáticas terapéuticas e impedir la penetración del fármaco en el cerebro a través de la BHE. Además, no sólo causa la resistencia a múltiples fármacos en cáncer, también se ha encontrado que es responsable de la MDR en muchas otras enfermedades relevantes lo que puede conducir a un tratamiento ineficaz en el uso crónico.

La modificación de su función mediante la inhibición o inducción por diversos factores y fármacos son mecanismos subyacentes que pueden dar lugar a ciertas interacciones fármaco-fármaco cambiando drásticamente la exposición sistémica del tejido al tratamiento. Estas interacciones farmacológicas se han documentado cada vez con mayor frecuencia y por ende, pueden justificar su evaluación y seguimiento sobre todo cuando el índice terapéutico para el sustrato de P-gp es estrecho.

Adicionalmente, la relación sinérgica P-gp-CYP3A4 debido a una gran coincidencia en especificidad de sustrato y distribución intestinal, mejora el efecto metabólico de esta enzima y limita aún más la cantidad de fármaco intacto que accede a la circulación sistémica.

Se han identificado recientemente más de 50 SNPs en el gen MDR1 que pueden afectar su expresión y función en términos de reconocimiento de sustrato. Debido a que la funcionalidad de la P-gp está definida por su secuencia de aminoácidos, dependiendo del tipo específico de mutación; el efecto puede explicar importantes fuentes de variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos y también puede ayudar a entender, evitar o tratar ciertas enfermedades ya que un aumento en la exposición a xenobióticos impacta seriamente los procesos fisiológicos. Tal es el caso del polimorfismo C3435T, el cual; se han identificado como un factor de riesgo para una mayor susceptibilidad en el desarrollo de ciertas enfermedades tales como Parkinson, enfermedades intestinales inflamatorias y epilepsia.

La inhibición local, selectiva y tejido/específica representa una estrategia importante para evitar o al menos superar su efecto de restricción sin consecuencias significantes en los parámetros farmacocinéticos de los fármacos coadministrados, especialmente en aquellos con estrechas ventanas terapéuticas o que su eficacia condiciona la calidad y esperanza de vida de un ser humano sobre todo con alta urgencia en círculos oncológicos.

Sin embargo, aunque los resultados de los estudios clínicos con inhibidores han sido desalentadores e impide actualmente su utilidad terapéutica, las fallas han abierto oportunidades alternativas para el descubrimiento, desarrollo y aplicación de nuevas moléculas.

Es de destacar que también estos inhibidores pueden ser agentes valiosos al proporcionar una base científica y opciones terapéuticas para modular los problemas relacionados con la farmacoterapia del SNC, particularmente en la resistencia a fármacos de neoplasias cerebrales, epilepsia, y demencia asociada al VIH. En el caso de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, parece ser que los niveles de expresión de P-gp pueden estar implicados en la etiología de estas condiciones por lo que el bloqueo permitirá aclarar su fisiopatología relacionada con su ausencia misma.

En consecuencia, el descubrimiento de la Glicoproteína P ha revolucionado el alcance de las disciplinas potenciales en las que interviene. Debido a su comportamiento multifuncional e importancia farmacológica representa un ejemplo ilustrativo del impacto y alcance de las proteínas de transporte en la medicina convirtiéndose en un objetivo que se debe de explotar en el desarrollo farmacéutico y en la investigación clínica.

La expresión intestinal de la Glicoproteína P es solo un factor que contribuye a la Biodisponibilidad de fármaco en la administración oral. El reconocimiento de su estado e importancia así como la identificación y caracterización de otros transportadores de eflujo pueden guiar el desarrollo y diseño racional de fármacos orales, compensar las diferencias de absorción y comprender la variabilidad interindividual en la respuesta terapéutica, incluso; el uso concomitante con inhibidores se podría esperar que llegara en un futuro a ser un recurso para la administración oral segura y efectiva al menos igual de efectiva que la terapia intravenosa.

Finalmente, esta aproximación farmacocinética necesita obligatoriamente de una explicación genética, por tanto; se requiere del trabajo multidisciplinario de ambas ciencias. La utilización de parámetros genéticos podría ser el punto de partida para proporcionar una ventaja en la obtención de máximos beneficios para los pacientes y una valiosa herramienta a los profesionales de la salud orientada al establecimiento de farmacoterapias individualizadas en términos de ajuste de dosis basada en el genotipo a fin de minimizar toxicidades y efectos secundarios, diseño de nuevos protocolos para abordar el tratamiento de la enfermedad y como marcador para hacer intervenciones tempranas y adecuadas a fin de reducir la probabilidad de enfermedades particulares.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. A. Sheps, Jonathan and Ling, Victor. *Preface: the concept and consequences of multidrug resistance*. Pflugers Arch - Eur J Physiol. 2007, 453, 545–553.
2. Acuff, V. Robert. *Vitamin E: Bioavailability and Function of Natural and Synthetic Forms*. The Journal of Food Technology. 1999, 4 (3), 74-76.
3. Aiache, J. M.; Devissaguet, J. P. y Guyton-Hermann, A.M. *Biofarmacia*. Ed. El Manual Moderno. México, 1983.
4. Aleu Vilalta, Jordi. Tesis: *Estudio funcional de la Glicoproteína P (transportador de múltiples fármacos) transplantada a ovocitos de Xenopus laevis*. Universidad de Alicante. Instituto de Neurociencias. 1996.
5. Alvarado Ávila Ana Karen. Tesis: *Participación de las bombas de expulsión en la resistencia de las bacterias a los antibióticos*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, 2012.
6. Ambudkar V., Suresh; Chava, Kimchi-Sarfaty; Zuben, E Sauna and Michael, M. Gottesman. *P-glycoprotein: from genomics to mechanism*. Oncogene. 2003, 22, 7468–7485.
7. Ambudkar V., Suresh; In-Wha, Kim and Sauna E., Zuben. *The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1)*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006, 27, 392–400.
8. Ambudkar V., Suresh; Kimchi-Sarfaty, Chava; Sauna E., Zuben and Gottesman M., Michael. *P-glycoprotein: from genomics to mechanism*. Oncogene, 2003, 22, 7468–7485.
9. Ascencio Peralta, Claudia. *Fisiología de la nutrición*. McGraw-Hill. México. 2012.
10. Astudillo De la Vega, Horacio; Ruiz García, Erika; Martínez Cedillo, Jorge y Ochoa Carrillo, Francisco Javier. *The roll of chemoresistance in solid tumors*. GAMO. 2010, 9 (3), 117-126.
11. B. Kim, Richard. *Transporters and drug therapy*. Clin, Pharma and Therap. 2005, 78 (3), 260-277.
12. Balázs, Sarkadi; László, Homolya; Gergely, Szakács and András, Váradi. *Human multidrug resistance abcb and abcg transporters: participation in a chemoimmunity defense system*. Physiol Rev. 2006, 86 (4) 1179–1236.
13. Becker W. M. and Hardin J. *El mundo de la célula*. Ed. Pearson-Addison Westey. 6ª edición, 2007.
14. Bellamy, William T. *P-glycoproteins and multidrug resistance*. Amu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1996, 36, 161-183.
15. Benet Z., Leslie and Cummins L., Carolyn. *The drug efflux–metabolism alliance: biochemical aspects*. Advanced Drug Delivery Review. 2001, 50 (1), S3–S11.
16. Benet Z., Leslie; Izumi, Takashi; Zhang, Yuanchao; A. Silverman, Jeffrey and J. Wachter, Vincent. *Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery*. Journal of Controlled Release. 1999, 62, 25–31.
17. Benet Z., Leslie; Wu, Chi-Yuan; Hebert, Mary F.; Wachter J., Vincent. *Intestinal drug metabolism and antitransport processes: A potential paradigm shift in oral drug delivery*. Journal of Controlled Release. 1996, 39, 139 – 143.
18. Biedler, J.L. and Riehm, H. *Cellular Resistance to Actinomycin D in Chinese Hamster Cells in Vitro: Cross-Resistance, Radioautographic, and Cytogenetic Studies*. Cancer Res. 1970, 30 (4), 1174–1184.
19. Bodor, Miklos; Edward J., Kelly and J. Ho, Rodney. *Characterization of the Human MDR1 Gene*. The AAPS Journal. 2005, 7 (1), E1-E5.
20. Boumendjel, Ahcencé; Boutonnat, Jean and Jacques, Robert. *ABC Transporters and Multidrug Resistance*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2009.

21. Brinkmann, Ulrich; Roots, Ivar and Eichelbaum, Michel. *Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy*. DDT. 2001, 6 (16), 835-839.
22. Bucher, Karsten. Thesis: *P-glycoprotein reconstitution into liposomes to study the influence of the lipid bilayer composition on its function*. Pharmacist (Apotheker), Universität Freiburg. 2006.
23. C. Sankatsing, Sanjay U; H. Beijnen, Jos; H. Schinkel, Alfred; and M. Prins, Jan. *P Glycoprotein in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Therapy*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004, 48 (4), 1073-1081.
24. Calatayud Arroyo, Marta. Tesis doctoral: *Estudio in vitro de mecanismos de transporte t toxicidad de especies arsenicales a nivel intestinal*. Universidad de Valencia, 2012.
25. Callaghan, Richard; C. Ford, Robert and D. Kerr, Ian. *The traslocation mechanism of P-glycoprotein*. FEBS Letters. 2006, 580, 1056–1063.
26. Callao Molina Virginia. Tesis Resistencia a múltiples fármacos. *Estudio in vitro del efecto modulador de PSC 833 y Tamoxifen en un modelo experimental*. Universidad de Lleida. Departamento de Medicina, 1997.
27. Cascorbi, Ingolf. *P-glycoprotein: Tissue Distribution, Substrates, and Functional Consequences of Genetic Variations*. Drug Transporters. Handbook of Experimental Pharmacology. 2011, vol 201, 261-283.
28. Chan, M.S. Lauletta; Lowes, Simon and Hirst, H. Barry. *The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004, 21(1), 25-51.
29. Chen, C. J.; Chin, J. E.; Ueda, K.; Clark, D. P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Roninson, I. B. *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells*. Cell 1986, 47 (3), 381–389.
30. Choudhuri, Supratim and Curtis D., Klaassen. *Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphisms of Human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) Efflux Transporters*. International Journal of Toxicology. 2006, 25,231–259.
31. Christians, Uwe. *Transport Proteins and Intestinal Metabolism P-Glycoprotein and Cytochrome P4503A*. Ther. Drug Monit. 2004, 26, 104–106.
32. Chung-Pu, Wu; Chia-Hung, Hsieh and Yu-Shan, Wu. *The Emergence of Drug Transporter-Mediated Multidrug Resistance to Cancer Chemotherapy*. Mol. Pharmaceutics. 2011, 8, 1996–2011.
33. Cox G., Arthur. Chapter 5 *Pharmacogenomics and Drug Transport/Efflux*. Concepts in Pharmacogenomics.2010.
34. Dallas, Shannon; S. Miller, David and Bendayan, Reina. *Multidrug Resistance-Associated Proteins: Expression and Function in the Central Nervous System*. Pharmacol. Rev. 2006, 58 (2), 140–161.
35. Dano, Keld. *Active outward transport of Daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells*. Biochim. Biophys. Acta 1973, 323(3), 466–483.
36. Debenham, P. G.; Kartner, N.; Siminovitch, L.; Riordan, J. R.; Ling, V. *DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression*. Mol. Cell. Biol. 1982, 2 (8), 881–889.
37. Del Amo, M. Eva; Heikkinen, T. Aki and Mönkkönen Jukka. *In vitro-in vivo correlation in P-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009, 36 (2-3), 200-221.
38. Doménech Berrozpe, José. et. al. *Biofarmacia y Farmacocinética Vol.II*. Editorial Síntesis. 2008.

39. E. Rosenbaum, Sara. *Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: An Integrated Textbook and Computer Simulations*. John Wiley & Sons. 2011.
40. Ecker, Gerhard and Chiba, Peter. Transporters as Drug Carriers: Structure, Function, Substrates. Part One. *The ABC transporters: Structural Insights into drug transport*. WILEY-VCH. 2009.
41. Elefterios, Eugenia y Venizelos, Bezirtzoglou. *Intestinal cytochromes P450 regulating the intestinal microbiota and its probiotic profile*. Microb. Ecol. in Health & Disease. 2012, 23, 1-10.
42. El-Kattan, Ayman and Varma, Manthena. Capítulo 1. *Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability*. Topics on Drug Metabolism. 2012, 1-21.
43. Engman, Helena. *Intestinal barriers to oral drug absorption: Cytochrome P4503A and ABC-Transport Proteins*. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy. UPSALA. 2003.
44. Estudante, Margarida; Morais, G. José; Soveral, Graca and Benet, Z. Leslie. *Intestinal drug transporters: An overview*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2012, 65 (10), 1340-1356.
45. Fardel, Olivier; Lecreur, Valérie and Guillouzo, André. *The P-Glycoprotein Multidrug Transporter*. Gen. Pharmac. 1996, 27 (8), 1283-1291.
46. Ferreirós Gago, María Laura. Tesis: *Modulación de la actividad de la glicoproteína P por los cannabinoides*. Universidad de Buenos Aires. Carrera de Especialista en Toxicología. 2010.
47. Föger, Florian. *Chapter 7 Strategies to Overcome Efflux Pumps*. Oral Delivery of Macromolecular Drugs. Springer. 2009.
48. Fojo, A.T.; Ueda, K.; Slamon, D.J.; Poplack, D.G.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. *Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987, 84 (1), 265–269.
49. Frances J. Sharom. *Multidrug Resistance Protein (P-Glycoprotein; MDR1)*. University of Guelph. Department of Molecular and Cellular Biology. 2010.
50. Frans G., M. Russel. *Chapter 2 Transporters: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal*. American Association of Pharmaceutical Scientists. 2010.
51. F. Fromm, Martin. *Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers*. Trends in Pharmacological Sciences. 2004, 25 (8), 423-429.
52. F. Fromm, Martin. *Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans*. European Journal of Clinical Investigation. 2003, 33 (2), 6-9.
53. G. J., Ebrahim. *Bacterial resistance to antimicrobials*. Journal of Trop. Pediatrics. 2010, 56 (3), 141- 143.
54. Gallego Fernández, Antonio; De Sande García, María Asunción; Marín Fernández, Ana María; Blanco Ramos, Sonia y González Galán, María José. *Aspectos fundamentales del Citocromo P450*. Serie Ciencias Biomédicas. ADEMÁS Comunicación Gráfica, 2010.
55. Germann, Ursula A. and Chambers, Timothy C. *Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein*. Cytotechnology. 1998, 27, 31–60.
56. Glaeser, Hartmut. *Importance of P-glycoprotein for Drug–Drug Interactions*. Drug Transporters. Handbook of Experimental Pharmacology. 2011, vol 201, 285-297.
57. Goole, Jonathan; J. Lindley, David; Roth, Wyatt; M. Carl, Stephen; Amighi, Karim; Kauffmann, Jean-Michael and T. Knipp, Gregory. *The effects of excipients on transporter mediated absorption*. International Journal of Pharmaceutics. 2010, 393, 17-31.
58. Gottesman, Michael M. and Ling, Victor. *The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research*. Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters. 2006, 580, 998–1009.

59. Gottesman, Michael M.; Pastant, Ira and Ambudkar V., Suresh. *P-glycoprotein and multidrug resistance*. Current Opinion in Genetics & Development. 1996, 6, 610-617.
60. Gros P., Croop J.; Roninson, I.; Varshavsky, A. and Housman, D.E. *Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1986, 83 (2), 337-341.
61. Gros P., Croop J. and Housman, D. *Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins*. Cell 1986, 47 (3), 371-380.
62. Guofeng, You and Morris, Marilyn E. *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*. John Wiley & Sons, Inc., Publications. 2007.
63. H. Abuznait, Alaa and Kaddoum, Amal. *Role of ABC Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease*. ACS Chem. Neurosci. 2012, 3, 820-831.
64. H. Lin, Jiunn and Yamazaki, Masayo. *Clinical Relevance of P-Glycoprotein in Drug Therapy*. Drug Metabolism Reviews. 2003, 35 (4), 417-454.
65. H. Lin, Jiunn and Yamazaki, Masayo. *Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics: Clinical Implications*. Clinical Pharmacokinetics. 2003, 42 (1), 59-98.
66. H. Lin, Jiunn *Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2003, 55, 53-81.
67. Herrera Ruiz, Dea; et.al. *Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos*. Rev. Mex. Cienc. Farm. 2012, 43 (1), 18-32.
68. Hetal, Thakkar; Bindesh, Patel and Sneha, Thakkar. *A Review on Techniques for Oral Bioavailability Enhancement of Drugs*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2010, 4 (3), 303-323.
69. Higgins, F. Christopher; Callaghan Richard; Linton, J. Kenneth; Rosenberg, F. Mark and Ford, C. Robert. *Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein*. 1997, 8 (3), 135-142.
70. Hunter J, Hirst. *Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption*. Adv. Drug Deliv. Rev. 1997; 25 (2-3), 129-157.
71. Ieiri, Ichiro. *Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2)*. Drug Metab. Pharmacokinet. 2012, 27 (1), 85-105.
72. Ilza K. Pajeva, Christoph Globisch and Michael Wiese. *Structure-Function Relationships of Multidrug Resistance P-Glycoprotein*. J. Med. Chem. 2004, 47, 2523-2533.
73. J. Matheny, Christopher, et. al. *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Implications of P-glycoprotein Modulation*. Pharmacotherapy 2001, 21(7), 778-796.
74. Juliano, R. L. and Ling, V. *A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants*. Biochimica et Biophysica Acta. 1976, 455 (1), 152-162.
75. Karp, Gerald. *Biología Celular y Molecular*. McGraw Hill Interamericana, 4ª Edición. México, 2007.
76. Kartner, Norbert and Ling, Victor. *Multidrug Resistance in Cancer. An ancient pump protein that flushes toxins out of cells may be to blame when cancer chemotherapy fails. It's identification offers hope that multidrug-resistant cancers might be made vulnerable again*. Scientific American. 1989, 260 (3), 44-51.
77. Kessel, D.; Botterill, V.; Wodinsky, I. *Uptake and retention of Daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response*. Cancer Res. 1968, 28 (5), 938-41.
78. Kimura, Yasuhisa; Matsuo, Michinori; Takahashi, Kei; Saeki, Tohru; Noriyuki, Kioka; Amachi, Teruo and Ueda, Kazumitsu. *ATP Hydrolysis-Dependent Multidrug Efflux Transporter: MDR1/P-glycoprotein*. Current Drug Metab. 2004, 5 (1), 1-10.

79. Krishna, Rajesh and D. Mayer, Lawrence. *Multidrug resistance (MDR) in cancer Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2000, 11, 265–283.
80. L. Hayton, William. *Rate-Limiting Barriers to Intestinal Drug Absorption: A Review*. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 1980, 8 (4), 321-334.
81. Lee D., Brian. Thesis: *Development and characterization of P-glycoprotein specific multidrug resistance modulators*. The Pennsylvania State University. Department of Pharmacology. 2003.
82. Lee, Gloria and Bendayan, Reina. *Functional Expression and Localization of P-glycoprotein in the Central Nervous System: Relevance to the Pathogenesis and Treatment of Neurological Disorders*. *Pharmaceutical Research*. 2004, 21 (8), 1313-1330.
83. Lehn Linardi, Renata y Corrêa Natalini, Cláudio. *Multidrug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs*. *Ciência Rural*. 2006, 36 (1), 336-341.
84. Leung Fung, King and Gottesman M., Michael. *A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, 1794, 860–871.
85. Ling, Victor. *Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1997, 40 (1), S3-S8.
86. Löscher, Wolfgang and Potschka, Heidrun. *Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family*. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2005, 2, 86–98.
87. M. Doherty, Margaret and N. Charman, William. *The Mucosa of the Small Intestine How Clinically Relevant as an Organ of Drug Metabolism?* *Clin Pharmacokinet*. 2002, 41 (4), 235-253.
88. M. Leslie, Elaine; Deeley G., Roger and Cole P.C., Susan. *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005, 204 (3), 216-237.
89. M. Stepién Karolina; Tomaszewski, Micha; Tomaszewska, Joanna and J. Czuczwar, Stanislaw. *The multidrug transporter P-glycoprotein in pharmacoresistance to antiepileptic drugs*. *Pharmacological Reports*. 2012, 64, 1011-1019.
90. M^a Villar Del Fresno, Ángel; Bermejo Bescós, Paloma y Martín-Aragón Álvarez, Sagrario. *Aspectos farmacológicos del citocromo P-450*. 2003, 361-365.
91. Martinez, Marilyn N. and Amidon, Gordon L. *A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals*. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2002, 42, 620-643.
92. Mechetner, Eugene. *Detection of the MDR1 P-Glycoprotein Expression and Function*. *Methods in Molecular Biology*. 2007, 378, 175-193.
93. Meletiadis, Joseph; Chanock, Stephen and Walsh J., Thomas. *Human Pharmacogenomic Variations and Their Implications for Antifungal Efficacy*. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19 (4), 763–787.
94. Misaka, Shingen; Müller, Fabian and F. Fromm, Martin. *Clinical relevance of drug efflux pumps in the gut*. *Current Opinion in Pharmacology*. 2013, 13, 847–852.
95. Nai-Ning, Song; Shao-Yu, Zhang and Chang-Xiao Liu. *Overview of factors affecting oral drug absorption*. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2004, 4(3), 167-176.
96. Nanasaheb Gavhane, Yogeshkumar and Vyankatrao Yadav, Adhikrao. *Loss of orally administered drugs in GI tract*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012, 20, 331-344.

97. Oostendorp, L. Roos; Beijnen, H. Jos and Schellens, H.M. Jan. *The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier*. Cancer Treatment Review. 2009, 35 (2), 137-147.
98. Oser L., Bernard; Melnick, Daniel and Hochberg, Melvin. *Physiological availability of vitamins. Study of methods for determining availability of vitamins in pharmaceutical products*. Ind Eng Chem. Anal. Ed., 1945, 17 (7), 405-411.
99. P. Wagh, Milind and Patel S., Jatin. *Biopharmaceutical Classification System: Scientific Basis Biowaiver Extensions*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2010, 2 (1), 12-19.
100. Paredes, Alfredo; Blanco, José Luis y Echenique-Elizondo, Miguel. *Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos*. Cir Esp. 2006, 79(4), 202-214.
101. Pedersen, K. E.; Christiansen, B. D.; N. A. Klitgaard, and F. Nielsen-Kudsk. *Effect of Quinidine on Digoxin Bioavailability*. Eur J Clin Pharmacol. 1983, 24, 41-47.
102. Ponce de León Suárez, Valeria. Tesis: *Resistencia celular asociada con Glicoproteína-P en una línea celular de cáncer de pulmón*. Instituto de Investigaciones Biomédicas. 2009.
103. Pranay, Wal; Kumar, Verma; Yadav Sanjay, Atul and Ankita, Wal. *Role of P-Glycoprotein*. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2013, 4 (3), 709-715.
104. R. Kunta, Jeevan and J. Sinko, Patrick. *Intestinal Drug Transporters: In Vivo Function and Clinical Importance*. Current Drug Metabolism. 2004, 5 (1), 109-124.
105. R. Tandon, Vishal; B., Kapoor; G., Bano; S. Gupta; Z., Gilani and D., Kour. *P-glycoprotein: Pharmacological relevance*. Indian J. Pharmacol. 2006, 38 (1), 13-24.
106. Raghava Srivalli, Kale Mohana and P. K., Lakshmi. *Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012, 48, (3), 1-16.
107. Riordan, J. R.; Ling, V. J. *Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability*. J. Biol. Chem. 1979, 254 (24), 12701-12705.
108. Robertson, S.M., Ling, V. and Stanners, C.P. *Co-amplification of double minute chromosomes, multiple drug resistance, and cell surface P-glycoprotein in DNA-mediated transformants of mouse cells*. Mol. Cell. Biol. 1984, 4 (3), 500-506.
109. Roninson, I. B.; Abelson, H. T.; Housman, D. E.; Howell, N.; Varshavsky, A. *Amplification of specific DNA sequences correlates with multidrug resistance in Chinese hamster cells*. Nature 1984, 309 (5969), 626-628.
110. Ruiz Gómez, M. J.; Souviron Rodríguez, M. and Martínez Morillo M. *La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer*. An. Med. Interna (Madrid). 2002, 19 (9), 477-485.
111. S. Miller, David; Bauer, Björn and S. Hartz Anika M. *Modulation of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: Opportunities to Improve Central Nervous System Pharmacotherapy*. Pharmacol. Rev. 2008, 60 (2), 196-209.
112. Sakaeda, Toshiyuki; Nakamura, Tsutomu and Katsuhiko, Okumura. *MDR1 Genotype-Related Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Biol. Pharm. Bull. 2002, 25 (11), 1391-1400.
113. Sakaeda, Toshiyuki; Nakamura, Tsutomu and Okumura, Katsuhiko. *MDR1 Genotype-Related Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Biol. Pharm. Bull. 2002, 25 (11), 1391-1400.

114. Sakaeda, Toshiyuki; Nakamura, Tsutomu and Okumura, Katsuhiko. *Pharmacogenetics of Drug Transporters and Its Impact on the Pharmacotherapy*. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2004, 4, 1383-1396.
115. Sánchez-Suárez, Patricia y Benítez-Bribiesca, Luis. *Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas*. Cancerología 1. 2006, 187-199.
116. Schinkel H., Alfred. *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins*. Seminars in Cancer Biology. 1997, 8 (3), 161-170.
117. Schinkel, H., Alfred et al. *Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs*. Cell 1994, 77 (4), 491–502.
118. Schinkel, H. Alfred and Jonker, W. Johan. *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2003, 55, 3-29.
119. Schinkel, H. Alfred. *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins*. Seminars in Cancer Biology. 1997, 8 (3), 161-170.
120. Schinkel, H., Alfred; et. Al. *Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997, 94 (8), 4028–4033.
121. Schwab, Matthias; Eichelbaum, Michel and F. Fromm, Martin. *Genetic polymorphisms of the human mdr1 drug transporter*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2003, 43, 285–307.
122. See, Y. P.; Carlsen, S. A.; Till, J. E.; Ling, V. *Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide*. Biochem. Biophys. Acta 1974, 373 (2), 242–52
123. Sharom, F.J. *The P-glycoprotein efflux pump: How does it transport drugs?*. The Journal of Membrane Biology. 1997, 160 (3), 161-175.
124. Shen, D. W.; Fojo, A.; Chin, J. E.; Roninson, I. B.; Richert, N.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. *Human multidrug-resistant cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification*. Science (New York, N.Y.) 1986, 232 (4750), 643–645.
125. Shoemaker, Robert H. *Genetic and Epigenetic Factors in Anticancer Drug Resistance*. Journal of the National Cancer Institute. 2000, 92 (1), 1-2.
126. Shugarts, Sarah and Benet, Z. Leslie. *The role of Transporters in the Pharmacokinetics of Orally Administered Drugs*. Pharmaceutical Research. 2009, 26 (9), 2039-2054.
127. Sikic, Branimir I.; A. Fisher, George; L. Lum, Bert; Halsey, Joanne; Beketic-Oreskovic, Lidija and Gang, Chen. *Modulation and Prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein*. Cancer Chemother. Pharmacol. 1997, 40, S13–S19.
128. Sparreboom, A.; Van Asperen, J.; Mayer, U.; Schinkel, A. H.; Smit, J. W.; Meijer, D. K.; Borst, P.; Nooijen, W. J.; Beijnen, J. H.; van Tellingen, O. *Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997, 94 (5), 2031–2035.
129. Staud, Frantisek; Ceckova, Martina; Micuda, Stanislav and Pavek, Peter. Chapter 10. *Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics*. MultiDrug Resistance in Cancer. Methods in Molecular Biology. 2012, 596, 199-222.
130. Sushant S., Dhavale; A. V., Bhosle; S. R., Hardikar and Tushar R., Kotkar. *Significance of P-Glycoproteins as a Transporter System*. Research J. Pharm. and Tech. 2008, 1(4), 298-309.

131. Suzuki, Hiroshi and Sugiyama, Yuichi. *Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2000, 12, 3–12.
132. Szakács, Gergely, et. al. *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)*. Drug Discovery Today. 2008, 13 (9-10), 379-393.
133. Takano, Mikisha; Yumoto, Ryoko and Murakami Teruo. *Expression and function of efflux drug transporters in the intestine*. Pharmacology & Therapeutics. 2006, 109 (1-2), 137-161.
134. The International Transporter Consortium. *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov. 2010, 9(3), 215–236.
135. Thiebaut F., Tsuruo et. al. *Cellular localization of the multidrug- resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987, 84 (21), 7735–7738.
136. Thomas, Hilary and Coley, Helen M. *Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein*. Cancer Control. 2003, 10 (2), 159-165.
137. Thuerauf, Norbert and Fromm, Martin. *The role of the transporter P-glycoprotein for disposition and effects of centrally acting drugs and for the pathogenesis of CNS diseases*. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 2006, 256, 281–286.
138. Ueda, K.; Cornwell, M. M.; Gottesman, M. M.; Pastan, I.; Roninson, I. B.; Ling, V.; Riordan, J. R. *The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986, 141 (3), 956–962.
139. Ueda, Kazumitsu; Taguchi, Yoshitomo and Morishima, Masaki. *How does P-glycoprotein recognize its substrates?*. 1997, 8 (3), 151-159.
140. Vaalburg, W.; Hendrikse, et. al. *P-glycoprotein activity and biological response*. Toxicology and Applied Pharmacology. 2005, 207, S257-S260.
141. Van Asperen, Judith; Van Tellingen Olaf and Beijen, H. Jos. *The Pharmacological Role of P-Glycoprotein in the Intestinal Epithelium*. Pharmacological Research. 1998, 37 (6), 429-435.
142. Varma, V.S. Manthena; Ashokraj, Yasvanth; Dey, S. Chinmoy and Pachagnula Ramesh. *P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement*. Pharmacological Research. 2003, 48 (4), 347-359.
143. Wacher, Vincent J.; Salphati, Laurent and Benet Z., Leslie. *Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2001, 46, 89–102.
144. Wagner, G. John. *History of Pharmacokinetics*. J. Pharma. Ther. 1981, 12, 537-562.
145. Yang, Kanghui; Wu, Jifeng and Li, Xung. *Recent advances in research on P-glycoprotein inhibitors*. Bio Science Trends. 2008; 2(4), 137-146.
146. Yang, Zhen. *The Roles of Membrane Transporters on the Oral Drug Absorption*. J. Mol. Pharm. Org. Process Res. 2013, 1 (1), 1-4.
147. Yan-Hong, LI et. al. *MDR1 Gene Polymorphisms and Clinical Relevance*. Acta Genetica Sinica. 2006, 33 (2), 93–104.
148. Zhang, Lei et. al. *Scientific Perspectives on Drug Transporters and Their Role in Drug Interactions*. Mol. Pharm. 2006, 3 (1), 62-69.
149. Zhang, Yuanchao and Benet Z., Leslie. *The Gut as a Barrier to Drug Absorption Combined Role of Cytochrome P4503A and P-Glycoprotein*. Clin Pharmacokinet. 2001, 40 (3), 159-168.
150. Zhou, S.-F. *Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition*. Xenobiotica. 2008, 38 (7-8), 802-832.

7. ANEXOS.

Sustratos			
<p>Agentes Anticancerígenos</p> <p>Actinomicina D Bisantreno Daunorubicina Doxorubicina Epirubicina Cochicina Etopósido Imatinib Irinotecan Mitomicina C Mitoxantrona Tenipósido Tamoxifeno Toremifeno Metotrexato Topotecan Paclitaxel Docetaxel Vincristina Vinblastina Vinorelbina Vindesina</p> <p>Agentes Antihipertensivos</p> <p>Celiprolol Diltiazem Losartán Atorvastatina Talinolol Atenolol Acebutolol Metoprolol Nadolol Prazosina Timolol</p> <p>Antiarrítmicos</p> <p>Digoxina Digitoxina Quinidina Verapamilo</p>	<p>Antidepresivos</p> <p>Amitriptilina Imipramina Debrisoquina</p> <p>Antibióticos</p> <p>Doxiciclina Eritromicina Itraconazol Ketoconazol Levofloxacina Rifampicina Tetraciclina Valinomicina Gramicidina D Azitromicina Grepafloxacino Puromicina Trimetoprima</p> <p>Agentes inmunosupresores del VIH</p> <p>Amprenavir Indinavir Nelfinavir Ritonavir Saquinavir Lopinavir</p> <p>Antiepilépticos</p> <p>Fenobarbital Fenitoína Carbamazepina Lamotrigina Felbamato Gabapentina Topiramato</p> <p>Fármacos Psicotrópicos</p> <p>Clorpromazina Clozapina Desipramina Fenotiazina Flupentixol Nortriptilina Doxepina Venlafaxina</p>	<p>Paroxetina Olanzapina Quetiapina Risperidona</p> <p>Antieméticos</p> <p>Domperidona Ondansetron</p> <p>Antagonistas de los receptores H2</p> <p>Cimetidina Ranitidina</p> <p>Antagonistas de los receptores H1</p> <p>Cetirizina Fexofenadina Terfenadina</p> <p>Inmunosupresores</p> <p>Ciclosporina A Sirolimus Tacrolimus</p> <p>Corticoides</p> <p>Dexametasona Hidrocortisona Corticosterona Triamcinolona Betametasona</p> <p>Hormonas Esteroideas</p> <p>Aldosterona Cortisol Metilprednisolona Progesterona</p> <p>Antihelmínticos</p> <p>Ivermectina Abamectina Emetina</p>	<p>Opioides</p> <p>Loperamida Morfina Pentazocina Metadona Fentanilo</p> <p>Agentes diagnóstico</p> <p>Rodamina 123 Hoechst 33342</p> <p>Otros</p> <p>Vecuronio Acetaminofén Omeprazol Sumatriptán Lovastatina</p>

Inhibidores		Inductores
Amiodarona	Propafenona	Amiodarona
Amitriptilina	Quercetina	Amprenavir
Amlodipino	Quinidina	Bromocriptina
Astemizol	Quinacrina	Clorambucilo
Atorvastatina	Ranitidina	Cisplatino
Barnidipino	Reserpina	Clotrimazol
Bepidil	Ritonavir	Colchicina
Bromocriptina	Sertralina	Ciclosporina
Cafeína	Tacrolimus	Daunonrubicina
Celiprolol	Tamoxifeno	Dexametasona
Carvedilo	Terfenadina	Diltiazem
Cimetidina	Tetrabenazina	Eritromicina
Clofazimina	Valinomicina	Etopósido
Clomipramina	Valspodar	Fluorouracilo
Clorpromazina	Verapamilo	Indinavir
Claritromicina	Vinblastina	Metotrexato
Clotrimazol	Jugo de Toronja (Bergamotina)	Midazolam
Cortisol	Segunda generación	Morfina
Ciclosporina A	Dexverapamilo	Nelfinavir
Daunorubicina	Dexniguldipino	Nicardipino
Desipramina	PSC833 (Valspodar)	Nifedipino
Desloratadina	VX-710 (Briricodar)	Fenobarbital
Diltiazem	GF120918 (Elacridar)	Fenotiazina
Dipiridamol	Tercera generación	Fenitoína
Disulfiram	XR9576 (Tariquidar)	Probenecid
Eritromicina	R101933 (Laniquidar)	Ácido retinoico
Felodipino	OC144-093 (ONT093)	Ritonavir
Fluconazol	LY335979 (Zosuquidar)	Rapamicina
Fluoxetina		Reserpina
Haloperidol		Rifampicina
Itraconazol		Hierba de San Juan
Indinavir		Tacrolimus
Ivermectin		Tamoxifeno
Ketoconazol		Verapamilo
Loperamida		Vinblastina
Loratadina		Vincristina
Lovastatina		Yohimbina
Metadona		
Metoprolol		
Miconazol		
Midazolam		
Morfina		
Nelfinavir		
Nicardipino		
Nifedipino		
Omeprazol		
Pantoprazol		
Paroxetina		
Progesterona		