

IMPLICANCIAS FISIO-FARMACOLÓGICAS DE LA GLICOPROTEÍNA- P EN ANIMALES DOMÉSTICOS

M Ballent, A Lifschitz, G Virkel, C Lanusse

Laboratorio de Farmacología, Departamento de Fisiopatología
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Resumen: La glicoproteína-P (*gp-P*) es una proteína transportadora de membrana asociada al fenómeno de resistencia a múltiples drogas (MDR). Inicialmente descrita por su sobreexpresión en líneas celulares tumorales resistentes a fármacos antineoplásicos, la *gp-P* también se localiza en tejidos normales como hígado, intestino, barrera hematoencefálica, riñones, entre otros, en los que actúa secretando una gran variedad de sustancias endógenas y xenobióticos desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular a través de un mecanismo dependiente de ATP. La localización específica en estos tejidos sugiere que la *gp-P* cumple un importante rol en la regulación del transporte de fármacos a través de las membranas celulares. De esta manera, *gp-P* participa en los procesos de absorción, distribución y excreción de diferentes xenobióticos. Teniendo en cuenta que las co-administraciones de fármacos son frecuentes en medicina veterinaria, implicancias farmacocinéticas y toxicológicas pueden ocurrir cuando dos sustratos de la *gp-P* son usados en la terapéutica de animales domésticos. La presente revisión describe la actividad fisiológica de la *gp-P* y examina las consecuencias farmacológicas obtenidas tras la co-administración de sustratos de la *gp-P* en medicina veterinaria. Los datos reportados en el presente trabajo marcan la necesidad de estudiar diferencias en la función de la *gp-P* entre las diferentes especies y razas de animales domésticos.

Palabras clave: glicoproteína-P, secreción intestinal, farmacocinética

PHYSIO-PHARMACOLOGICAL IMPLICATIONS OF P-GLYCOPROTEIN IN DOMESTIC ANIMALS

Abstract: P-glycoprotein (*P-gp*) is a transporter protein associated with multidrug resistance to certain anticancer drugs (MDR). Initially *P-gp* was identified by its overexpression in multidrug resistant tumor cells. *P-gp* is also expressed in a wide range of normal tissues including liver, intestines, blood-brain barrier and kidneys. *P-gp* secretes a large number of endogenous and xenobiotic compounds from the intracellular to the extracellular domain by an ATP-dependent process. The specific distribution of this protein suggests that *P-gp* plays an important role in the regulation of drugs transport across membrane cells. Therefore *P-gp* participates in the process of absorption, distribution and excretion of different xenobiotics. As the co-administration of drugs is a common procedure in the veterinary medicine, pharmacokinetic and toxicologic implications may occur when two *P-gp* substrates are used in the therapeutic of domestic animals. The current review describes the physiological activity of *P-gp* and examine the pharmacological consequences obtained after the co-administration of *P-gp* substrates used in veterinary medicine. The data presented in the current work highlight the need to study differences in the function of the *P-gp* between species and breeds of domestic animals.

Key Word: P-glycoprotein; intestinal secretion, pharmacokinetic

Fecha de recepción: 25/04/05

Fecha de aprobación: 22/09/05

Dirección para correspondencia: Mariana Ballent, Laboratorio de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (7000) Tandil ARGENTINA. **E-mail:** mballent@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El efecto farmacológico obtenido tras la administración de una droga depende de la interacción de ésta con su receptor (fase farmacodinámica). Para obtener un efecto farmacológico óptimo son necesarias concentraciones efectivas del fármaco en el sitio de acción (biofase) durante un cierto periodo (1). De esta manera, los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (fase farmacocinética) influyen directamente en las concentraciones de droga que alcanzan el sitio de acción y, por lo tanto, en su efecto farmacológico. Mientras que los procesos de absorción y distribución determinan el pasaje del fármaco desde su sitio de administración hacia la circulación sistémica y su llegada a la biofase, los procesos de biotransformación (metabolismo) y excreción determinan la finalización de la acción del fármaco en el organismo (2).

En los últimos años, se ha estudiado la participación de diferentes transportadores celulares de membrana en los procesos de distribución tisular y excreción de compuestos farmacológicamente activos y/o sus metabolitos (3). De todos los transportadores celulares identificados, la glicoproteína-P (gp-P) ha sido la más estudiada. Si bien la gp-P fue inicialmente descrita por su sobreexpresión en células tumorales resistentes a múltiples drogas anticancerígenas, también se localiza en células normales de tejidos involucrados en los procesos de absorción, distribución, y excreción de fármacos (4). La localización específica en estos tejidos sugiere que la gp-P cumpliría un importante rol en la regulación del transporte de fármacos, modificando de este modo el comportamiento cinético y la biodisponibilidad de los mismos (5). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la gp-P funciona como una bomba de eflujo que secreta en forma activa una gran cantidad de compuestos no relacionados, desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. A nivel intestinal, la gp-P limita la absorción y difusión transepitelial provocando modificaciones en la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral (6). Debido a que la gp-P presenta una amplia especificidad de sustratos, es posible que ocurran interacciones entre fármacos reconocidos como sustratos (inhibidores o inductores) de la misma cuando éstos son co-administrados (7). La comprensión de este tipo de interacciones podría convertirse en una herramienta farmacológica útil para incrementar la disponibilidad sistémica de diversos fármacos, contribuyendo a mejorar su actividad farmacológica.

El objetivo de este trabajo fue recopilar y discutir la información disponible sobre el rol de la gp-P y su influencia en el comportamiento farmacocinético de fármacos de uso en terapéutica veterinaria.

CARACTERIZACIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA-P

Estructura y función de la glicoproteína-P

La gp-P fue inicialmente descrita por su sobreexpresión en células tumorales resistentes a múltiples drogas y posteriormente caracterizada como una proteína de membrana encargada de secretar drogas y diversos compuestos fuera de la célula a través de un mecanismo ATP-dependiente (8). La gp-P pertenece a la superfamilia de las «ATP-binding cassette» (ABC), y es codificada por una subfamilia de genes de los que se reconocen tres isoformas: MDR I, II y III. Mientras que en humanos sólo se expresan las clases I y III (MDR1 y MDR3, respectivamente), en roedores han sido identificadas las tres clases (*mdr1a*, *mdr1b* y *mdr2*, respectivamente) (9). Las clases I y II codifican a proteínas transportadoras y confieren resistencia a múltiples drogas; sin embargo, la clase III (*mdr2* de roedores y MDR3 de humanos) no está asociada al transporte de drogas sino que codifica a una traslocasa de la fosfatidilcolina localizada en la membrana de los canaliculos biliares (10).

La gp-P es un complejo glicoproteico de membrana de 1280 aminoácidos con un peso molecular de 170 kDa. Está compuesta por dos mitades simétricas y homólogas que actúan en forma coordinada como una unidad. Cada mitad consta de seis dominios transmembrana y de un dominio de unión al ATP localizado en la superficie citosólica (11). Si bien se ha determinado que ambos sitios de unión al ATP son necesarios para que la actividad de la gp-P se produzca eficientemente, la interacción entre los sitios de unión al ATP y los dominios de unión a drogas son esenciales para que se produzca la hidrólisis del ATP estimulada por el sustrato y el transporte del mismo (Fig. 1). Mediante este mecanismo de transporte activo, los sustratos son secretados sin modificar fuera de la célula contra un gradiente de concentración, lo que provoca una disminución de su concentración intracelular (12).

Varios modelos han sido propuestos para explicar el mecanismo de excreción de fármacos mediado por gp-P. El modelo del poro, el modelo de flipasa y el modelo de aspirador de moléculas hidrofóbicas han sido los principa-

les modelos descriptos. Este último ha sido el más aceptado y se caracteriza por el reconocimiento de sustratos localizados en la superficie interna y externa de la membrana plasmática y su transporte a través de canales proteicos (13).

Los sustratos de la gp-P compartirían ciertas propiedades físico-químicas incluyendo el coeficiente de partición octanol/agua y el tamaño molecular. Diversos estudios sobre las relaciones estructurales entre sustratos y su grado de afinidad por la gp-P han demostrado que el principal determinante de la efectividad como moduladores reside en su relativa hidrofobicidad, con coeficientes de partición (octanol/agua) de aproximadamente +1 ó mayor (14). La cantidad de compuestos que tienen la capacidad de interactuar con la gp-P, ya sea como sustratos inhibidores o inductores es muy amplia e incluye antiarrítmicos (lidocaína), antibióticos (eritromicina), antifúngicos (itraconazole), bloqueantes de los canales de calcio (verapamilo), antineoplásicos (vinblastina) y hormonas (progesterona) (15). Los mecanismos de interacción entre la gp-P y sus sustratos se muestran en la Figura 1.

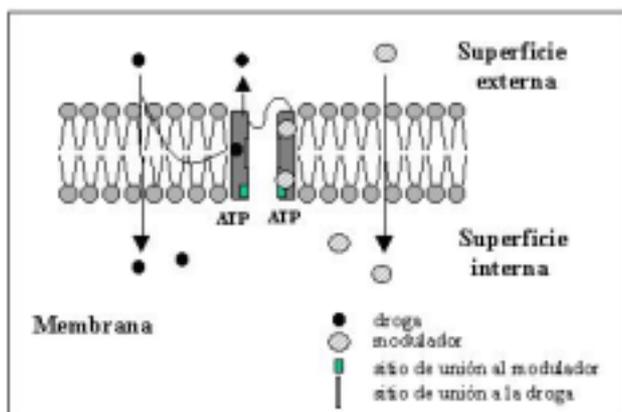


Figura I. Función de la gp-P. El modelo ilustra la actividad de la gp-P, la que utiliza ATP para el transporte de sustratos a través de la membrana celular. Los moduladores pueden actuar como un inhibidor competitivo, ocupando los sitios de unión a drogas ó como un inhibidor no competitivo, ocupando los sitios de unión al modulador. Adaptado de Ford, (16)

Figure I. Function of the P-gp. The model illustrates P-gp activity, which uses ATP to transport substrates across the plasma membrane. Modulators may act as a competitive inhibitors binding to the sites of substrate or as a non-competitive inhibitor binding to the specific modulator sites. Adapted from Ford, (16).

LOCALIZACIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA-P EN TEJIDOS NORMALES

Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y moléculas específicas para gp-P en roedores y humanos se demostró que la gp-P también se expresa en tejidos normales. La gp-P se localiza en tejidos involucrados en los procesos de absorción (ej. células epiteliales de intestino), distribución (ej. barrera hematoencefálica) y eliminación de fármacos (ej. superficie canalicular de los hepatocitos, superficie apical de las células epiteliales del túbulo renal y superficie apical de los enterocitos). También se encuentra en la superficie luminal de las células endoteliales del cerebro, células del sistema hematopoyético y corteza y médula adrenal (6). La localización en glándulas secretoras de esteroides sugiere que la gp-P podría estar relacionada con la secreción o con la protección de la membrana plasmática de las células que los secretan frente a los efectos tóxicos producidos por altas concentraciones de esteroides. Una observación consistente con esta hipótesis es que la progesterona es un sustrato/inhibidor de la gp-P (16) y que otros esteroides, específicamente corticosterona, son transportados por células epiteliales que expresan gp-P (17). Por otra parte, a través del uso de anticuerpos monoclonales anti-gp-P se ha determinado la expresión del gen *mdr1a* en útero grávido y placenta (18). La inducción de altos niveles de expresión se produciría en un momento específico de la gestación, sugiriendo que dicha expresión podría estar asociada a la actividad fisiológica en la interfase materno-fetal (19). La distribución anatómica de los transportadores tipo ABC sugiere que éstos podrían llevar a cabo diversas funciones; entre ellas, limitar la absorción intestinal de fármacos, excretar diversos compuestos hacia el exterior celular, regulando los niveles celulares y tisulares de los mismos, e impidiendo su ingreso al sistema nervioso central. De esta manera, es posible que los transportadores celulares actúen modificando el comportamiento cinético y la biodisponibilidad de diversos fármacos.

Rol de la glicoproteína-p en la disposición de fármacos

Aunque muchos son los mecanismos encargados de facilitar el movimiento de solutos a través del intestino, este tejido constituye una compleja y selectiva barrera de la que forman parte tanto enzimas metabólicas (ej. citocromo P450) como proteínas transportadoras (ej. gp-P entre otras). La capacidad de la gp-P para interactuar con un amplio rango de

compuestos, tanto naturales como sintéticos, sugiere que la habilidad para limitar la absorción oral de fármacos es parte de su rol como regulador de la permeabilidad intestinal (20). Para establecer la función fisiológica y farmacológica de esta proteína, especialmente en aquellos aspectos directamente relacionados al transporte de fármacos, se requiere una mayor comprensión de la forma en la cual estos compuestos interactúan con la gp-P, como así también de la localización de la gp-P a lo largo del tracto gastrointestinal; esto dependerá de cómo varíe la actividad de la gp-P a lo largo del intestino y si otros transportadores contribuyen con los procesos de excreción intestinal (20).

La forma en la que la actividad de la gp-P y otros transportadores celulares varía a lo largo del intestino ha sido escasamente definida. La distribución de la gp-P en el tracto gastrointestinal se incrementaría desde el duodeno hacia el colon, con picos de expresión en íleon y colon distal (21). Estos resultados concuerdan con estudios *in vitro* realizados en intestino de rata donde la mayor actividad de gp-P se observó en íleon, con menores niveles de actividad en el resto de los segmentos intestinales (15). Estudios más recientes (22), en los que se utilizó intestino de ratones knockout para el gen *mdr1a* (-/-), han demostrado variaciones región-dependiente en la actividad de los transportadores celulares tanto en intestino delgado como grueso, con picos de actividad en intestino delgado distal y colon distal.

Se han descrito una gran cantidad de métodos *in vitro* que permiten caracterizar la actividad de la gp-P en el transporte intestinal de fármacos. La línea celular Caco-2, derivada de adenocarcinoma de colon humano, ha sido ampliamente utilizada para caracterizar el modelo de barrera epitelial en la absorción intestinal de fármacos. El impacto de la gp-P sobre la absorción de fármacos en monocultivos de Caco-2 ha sido demostrado mediante la determinación de la tasa de permeabilidad de un sustrato mediada por la gp-P, donde la tasa de pasaje es mayor en dirección basolateral-apical (correspondientes a la superficie serosa y lumen intestinal, respectivamente). En presencia de inhibidores, esta tasa de pasaje unidireccional tiende a igualarse (23).

El uso de la técnica de saco intestinal evertido de rata ha sido reportado como un buen modelo predictivo de la biodisponibilidad de drogas anticancerígenas administradas por vía oral y que son sustratos de la gp-P

(24). La actividad de los transportadores celulares en el proceso de absorción de fármacos influye sobre la biodisponibilidad sistémica de los mismos y, por lo tanto, es determinante en la resultante eficacia clínica tras la administración oral de drogas.

La actividad de gp-P en la distribución de diferentes compuestos juega un rol importante en el comportamiento farmacológico/toxicológico de los mismos. La presencia de gp-P en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica limita la entrada al sistema nervioso central de numerosos fármacos como ivermectina, loperamida, dexametasona, digoxina, entre otros (3). La presencia de gp-P en placenta constituye una importante barrera para el acceso de xenobióticos al feto (6). Cuando ratas preñadas deficientes en gp-P fueron tratadas con el antiparasitario ivermectina, graves efectos teratogénicos fueron observados debido a la exposición fetal al antiparasitario (25).

Si bien la gp-P no parece tener actividad metabólica intrínseca, el reconocimiento de interacciones entre la isoenzima citocromo P450 3A (CYP3A) y la gp-P ha desarrollado un nuevo concepto en el mecanismo de secreción/eliminación de fármacos. La CYP3A es una enzima de fase I que participa en el metabolismo de numerosos fármacos. La CYP3A se distribuye en hígado e intestino delgado, donde representa el 30 y 70% del total de la actividad metabólica mediada por P450, respectivamente. Debido a que muchos sustratos de la CYP3A han sido reconocidos como sustratos o moduladores de la gp-P, se ha propuesto que dichas proteínas actúan sinérgicamente limitando la biodisponibilidad oral de fármacos (6). Cuando una droga se encuentra en el tracto gastrointestinal y es absorbida por difusión pasiva en el enterocito puede ser metabolizada por la CYP3A, pasar a circulación sistémica o ser expulsada por la gp-P nuevamente a la luz intestinal donde podrá ingresar a otro enterocito teniendo nuevamente contacto con la CYP3A. Así las drogas sustratos de gp-P tendrán repetidos accesos a la CYP3A aumentando la posibilidad de ser metabolizadas (4). La expresión de gp-P en las células del túbulo contorneado proximal en riñón así como en las células de los canalículos biliares en hígado sugiere una activa participación de este transportador en los procesos de excreción de diferentes compuestos (6). De esta manera el clearance renal o biliar de drogas sustratos de gp-P puede ser disminuido sustancialmente cuando son co-administrados con compuestos moduladores de gp-P. Las con-

secuencias de estas interacciones pueden ser beneficiosas desde el punto de vista terapéutico pero también pueden involuntariamente producirse cuadros de toxicidad según sea el margen de seguridad de los fármacos interviniendo. La participación de la gp-P en los diferentes procesos farmacocinéticos y la influencia que tiene sobre los mismos la utilización de fármacos moduladores de gp-P se resumen en el Esquema I.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y/O ACTIVIDAD DE LA GLICOPROTEÍNA-P

Debido a que la gp-P presenta una amplia especificidad de sustratos, es posible que ocurran interacciones entre drogas reconocidas como sustratos (inhibidores o inductores) cuando éstas son co-administradas (6). En este contexto, la reducción de la biodisponibilidad

de un fármaco administrado por vía oral podría ocurrir como consecuencia de la inducción de la actividad de las proteínas transportadoras a nivel intestinal, mientras que un incremento de la biodisponibilidad se debería principalmente a la co-administración de un fármaco inhibidor con un sustrato de la gp-P. La inhibición del transporte de fármacos a través del uso de un modulador puede ser el resultado de la inhibición del reconocimiento específico de un sustrato (26), de la inhibición de la unión al ATP, de la inhibición de la hidrólisis del ATP (27) o la asociación de la hidrólisis de ATP a la traslocación de un sustrato. Muchos moduladores inhiben el transporte a través de mecanismos de inhibición competitiva y no competitiva (28). Ejemplos de esto son el verapamilo, que se une a los sitios de unión de la gp-P inhibiendo el transporte de otros sustratos en forma competitiva, y la ciclosporina A, que interfiere tanto en el reconocimiento de sustratos como en la actividad cíclica (hidrólisis de ATP) de la gp-P. Mediante el proceso de quimiomodulación, el cual involucra la co-administración de un inhibidor (modulador) con un fármaco sustrato de la gp-P, es posible observar alteraciones de la actividad de la gp-P producidas por uno de los componentes de la asociación. Numerosos compuestos han demostrado ser inhibidores de la actividad de la gp-P y, en consecuencia, de revertir el fenómeno de resistencia a múltiples drogas (MDR). Los moduladores directos de la gp-P pertenecen a una amplia variedad de clases químicas, incluyendo bloqueantes de los canales de calcio, digitálicos, quinolonas, ciclosporinas, surfactantes, hormonas y anticuerpos. De acuerdo a su potencia y grado de citotoxicidad, los moduladores se clasifican en moduladores de primera, segunda y tercera generación. Los moduladores de primera generación son fármacos que se utilizan normalmente en terapéutica y que han demostrado tener un efecto inhibitorio sobre la actividad de gp-P. Entre ellos, el verapamilo fue el primer fármaco descrito con capacidad para revertir el fenómeno de MDR (29). Más tarde, otros estudios revelaron que esta propiedad es compartida por otros bloqueantes de los canales de calcio como diltiazem y nifedipina (30). La principal desventaja de estos moduladores es que su efecto inhibitorio sobre la actividad de gp-P se produce a concentraciones superiores a las terapéuticas, en un rango de 5 a 50 mM, provocando un incremento de la citotoxicidad en tejidos normales (31). Ciclosporina A, un agente con actividad inmunosupresora, es uno de los moduladores anti-MDR de primera generación más efectivo (32). La búsqueda de una segunda generación de mo-



Esquema I. Participación de la glicoproteína-P (gp-P) en los diferentes procesos farmacocinéticos. Las modificaciones obtenidas en cada uno de estos procesos por la acción de un compuesto modulador de este transportador, están resumidas en los óvalos negros.

BHE: barrera hematoencefálica; MD: compuesto modulador; SNC: sistema nervioso central. Scheme I. Influence of p-glycoprotein on different pharmacokinetic processes. The pharmacokinetic changes obtained after the co-administration of a gp-P substrate with a modulator compound are summarised in the black ovals. BHE: blood-brain barrier; MD: modulator compound; SNC: central nervous system

duladores no tóxicos, resultó en nuevos compuestos, análogos de los moduladores de primera generación, que demostraron ser más potentes y considerablemente menos tóxicos. Análogos estructurales del verapamilo como el dexverapamilo, emopamilo, han demostrado, *in vitro*, actividad anti-MDR en un grado equivalente al verapamilo, pero con escasos efectos de toxicidad (33). Por otra parte, el PSC 833, un análogo sintético de la ciclosporina A, que no posee actividad inmunosupresora, demostró una eficacia superior a la ciclosporina A en numerosos estudios (34). Más recientemente, nuevos moduladores han sido desarrollados tomando como modelo las características estructurales y funcionales de otros moduladores, y combinaciones químicas que les confieren la capacidad de actuar contra mecanismos específicos del MDR. Dichos agentes, que aún no están disponibles comercialmente, son efectivos en el rango de concentración entre 20-100 nM, requiriéndose bajas dosis para alcanzar concentraciones efectivas *in vivo*. También se ha descrito que la expresión o la actividad de la gp-P podría ser modulada en condiciones patológicas (procesos inflamatorios o infecciosos, etc). Fernandez, *et al.* (35) demostró que diversas citoquinas pro-inflamatorias (TNF α ; IL-1b; IL-6; IL-2; IFN γ) ejercerían un efecto inhibitorio sobre la expresión y/o funcionalidad de la gp-P en hígado, intestino y barrera hematoencefálica.

La regulación de la expresión de los transportadores celulares por fármacos inductores ha sido extensamente estudiada. Existen, a su vez, numerosos factores ambientales que pueden afectar la expresión de la gp-P. *In vitro*, se ha demostrado que la gp-P puede ser inducida por una variedad de drogas y hormonas (36). Sin embargo, el mecanismo molecular de la inducción no ha sido completamente establecido. Recientemente se ha descrito que la rifampicina induce la expresión de gp-P en el intestino humano (36). En este estudio también se ha determinado que la inducción podría estar restringida a algunos tipos celulares; sin embargo, existe muy poca información acerca de los mecanismos de inducción de la gp-P en otros tejidos. El pretratamiento con dexametasona en ratas resultó en un incremento 2 a 3 veces superior de los niveles hepáticos e intestinales de gp-P (37). Estos resultados coinciden con otro estudio sobre inducción por medio de la dexametasona en ratas, donde luego de la administración intraperitoneal de este glucocorticoide se incrementó el nivel hepático de la gp-P (38). Estos resultados sugieren que la inducción de la

expresión de la gp-P es un proceso dosis-dependiente y, que a su vez, la respuesta a la inducción por fármacos inductores es tejido-dependiente, ya que se han observado diferentes niveles de expresión en diversos tejidos en respuesta a la administración de ciclosporina A en ratas (39). Para determinar si existe una expresión diferencial de gp-P entre especies de interés veterinario, Laffont *et al.* (40), utilizó extendidos de linfocitos de sangre periférica en los cuales, mediante la determinación de la tasa de pasaje de rodanima-123 y la inhibición de su transporte por medio del uso de fármacos inhibidores (verapamilo y ciclosporina A), se observaron diferencias inter e intraespecies, identificándose tres grupos con alto (cabra), intermedio (bovino, ovino, cerdo) y bajo (rata y equino) nivel de actividad de la gp-P. Sin embargo, es necesario determinar si la actividad de la gp-P en linfocitos de sangre periférica refleja la función de este transportador en otros tejidos y si estos resultados se correlacionan con los procesos farmacocinéticos de absorción y eliminación de drogas reconocidas como sustratos de la gp-P. El efecto inductor sobre gp-P que produce la administración prolongada de ciertos fármacos, así como también componentes presentes en la dieta de las diferentes especies de animales potenciarían la aparición de interacciones farmacocinéticas afectando las concentraciones terapéuticas obtenidas tras el tratamiento con drogas sustratos de la gp-P.

INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS ENTRE GLICOPROTEÍNA-P Y FÁRMACOS UTILIZADOS EN MEDICINA VETERINARIA

Existen numerosos fármacos de uso en medicina veterinaria que son sustratos y/o inhibidores de diferentes transportadores celulares. En este contexto las modificaciones en la farmacocinética de estos sustratos de gp-P que han sido documentadas en los animales *mdr* (-/-) (knockout) pueden ser reproducidas cuando un efectivo inhibidor de gp-P es co-administrado con un sustrato de dicho transportador. Dentro de las drogas antiparasitarias, que son ampliamente utilizadas en la terapéutica veterinaria, se presentan ejemplos muy interesantes de interacción farmacológica con transportadores celulares. La interacción entre drogas pertenecientes al grupo de las lactonas macrocíclicas (ivermectina, moxidectin) y la gp-P ha sido documentada. Estudios *in vivo* utilizando ratones knockout para el gen *mdr1* revelaron una sensibilidad aumentada a ivermectina que se manifestó con signos de neurotoxicidad y

muerte (5). A su vez, la ivermectina ha sido descrita como un potente inhibidor de la gp-P *in vitro* (41). Teniendo en cuenta estos antecedentes, y con los recientes avances de la biología molecular, pudo demostrarse la causa de la intolerancia de los perros de raza collie a este tipo de fármacos. Existen subpoblaciones de collies que desarrollan una sensibilidad a ivermectina comparable a la que se produce en ratones knockout para el gen *mdr1*. (42). La causa de esta sensibilidad se relaciona con una mutación (delección) del gen MDR1, que da como resultado una proteína no funcional (43, 44). Los perros homocigotas para la delección (mutación/mutación) experimentan efectos neurológicos adversos luego de una dosis única de ivermectina (100 µg/Kg). A su vez, se ha demostrado que collies sensibles pueden tener incrementada su susceptibilidad a otros fármacos endectocidas como milbemicina y moxidectin (45). La aparición de otras razas o especies susceptibles a la acción de diferentes drogas, en donde estén implicados transportadores de tipo celular como gp-P, abre un campo futuro de investigación en medicina veterinaria.

Además de las implicancias toxicológicas, importantes modificaciones farmacocinéticas fueron descritas para las lactonas macrocíclicas tras su co-administración con compuestos moduladores de gp-P. Alvinieri *et al.* (46) demostró el efecto de la actividad de gp-P sobre la farmacocinética de una formulación pour-on de ivermectina (IVM) en ratas, utilizando verapamilo (VRP) como agente modulador. La concentración plasmática máxima (C_{max}) y el tiempo requerido para alcanzar la C_{max} (T_{max}) en los grupos tratados con IVM fue menor a la obtenida en los grupos tratados con IVM-VRP. Por otra parte, Lifschitz *et al.* (47) evaluó en bovinos la influencia de loperamida (LPM) sobre el patrón de excreción fecal y disposición plasmática de moxidectin (MXD) administrado por vía intravenosa y subcutánea. Concentraciones significativamente mayores de MXD fueron obtenidas luego de la administración de MXD-LPM, comparado con MXD solo, para ambas vías de administración, obteniéndose una reducción del clearance corporal de MXD tras la co-administración con el antidiarreico. La coadministración de VRP con IVM administrada por vía oral en ovinos, incrementó significativamente la absorción del antiparasitario (48). En corderos la coadministración de quercetina, un derivado flavonoide presente en vegetales, junto con MXD produjo un incremento en las concentraciones plasmáticas del antiparasitario (49). Si bien se ha descrito que los fármacos

endectocidas son excretados en una alta proporción como droga activa a través del tracto biliar/fecal (50, 51), el rol de los transportadores celulares en el proceso de eliminación de estos fármacos ha sido escasamente definido. Laffont *et al.* (52) estudió la secreción intestinal de IVM utilizando un modelo de perfusión intestinal (loop cerrado) *in situ* en ratas, obteniendo el mayor porcentaje de IVM secretada en el yeyuno. Una mayor disponibilidad de IVM fue obtenida en el plasma, el hígado y la pared del intestino delgado tras su co-administración con LPM en ratas (53), lo que refleja la importancia de estos transportadores en la secreción biliar e intestinal de los endectocidas. La influencia de la co-administración de fármacos endectocidas con moduladores de la gp-P sobre la farmacocinética de estas importantes drogas dentro de la terapéutica antiparasitaria en medicina veterinaria se muestra en la Figura II.

Recientemente ha despertado gran interés el estudio de los posibles mecanismos mediados por transportadores celulares relacionados al fenómeno de resistencia antihelmíntica. La primera gp-P de helmintos fue descrita a partir del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (54), del que se han identificado al menos 14 gp-P homólogas, y posteriormente en otros como *Onchocerca valvulus* (55) y *Haemonchus contortus* (56). Smith y Prichard (56) demostraron la asociación entre gp-P de *H. contortus* y la resistencia a ivermectina y moxidectin. La transcripción del gen que codifica a la gp-P estaría alterada en nematodos resistentes a fármacos endectocidas. Por otra parte, Xu, *et al.* (57) demostró que el ARNm de la gp-P está presente en mayores cantidades en *H. contortus* resistentes a IVM comparado con los susceptibles, lo que estaría indicando una sobreexpresión de gp-P en nematodos resistentes. La co-administración de drogas endectocidas como IVM y MXD junto con verapamilo incrementó el porcentaje de eficacia contra *Haemonchus contortus* resistente a estas drogas en animales de laboratorio (58). Si bien la interacción de los antihelmínticos benzimidazoles con estos transportadores celulares proteicos no está del todo aclarada (59, 60), la posible participación de la gp-P en los mecanismos de resistencia a estos fármacos ha sido sugerida (61).

Numerosos estudios presentan interacciones entre fármacos utilizados en la terapéutica veterinaria y la gp-P. En el caso del glicósido cardíaco digoxina, su interacción con moduladores de la gp-P genera cambios en su

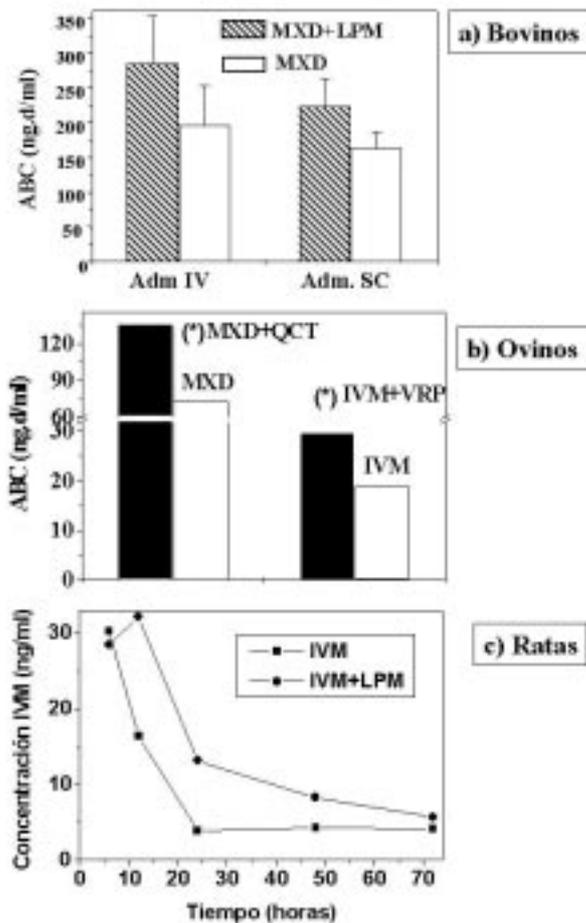


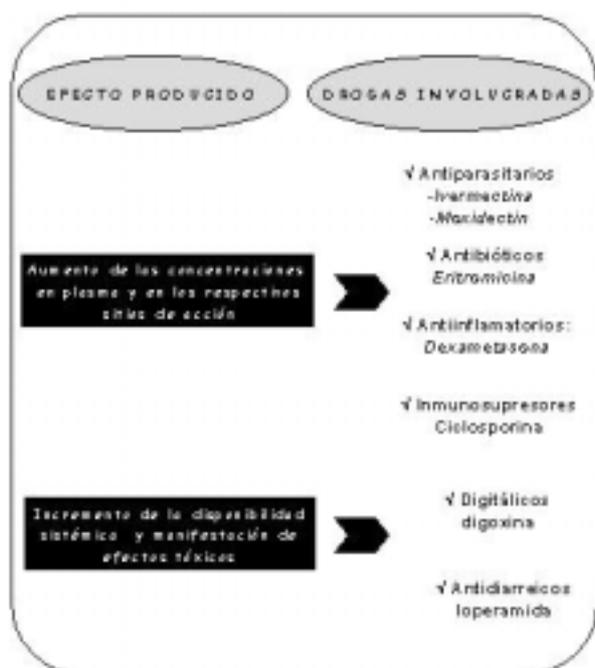
Figura II. Influencia de la glicoproteína-P (gp-P) en el comportamiento farmacocinético de las drogas antiparasitarias endectocidas en diferentes especies. a) Comparación de la disponibilidad sistémica (plasma) expresada como área bajo la curva concentración vs tiempo (ABC) de moxidectin (MXD) tras su administración por vía endovenosa (IV) o subcutánea (SC) sola o co-administrada con loperamida (LPM) en bovinos (adaptado de Lifschitz et al. (47); b) Comparación de la disponibilidad de MXD e ivermectina (IVM) administradas solas o junto a quercentina (QCT) (adaptado de Dupuy et al. (49)) y verapamilo (adaptado de Molento et al. (48)), respectivamente en ovinos y c) concentraciones plasmáticas de ivermectina (IVM) tras su administración SC sola o junto a LPM en ratas (adaptado de Lifschitz et al. (53)). (*) Valores estadísticamente diferentes a los obtenidos tras la administración del fármaco endectocida solo $P < (0.05)$.

Figure II. Influence of P-glycoprotein (P-gp) on the pharmacokinetic behaviour of endectocides drugs in different species. a) Comparison of the systemic availability expressed as area under the curve vs. time (AUC) of moxidectin (MXD) after its intravenous (IV) or subcutaneous (SC) administration alone or co-administered with loperamide (LPM) in cattle (adapted from Lifschitz et al. (47)); b) AUC comparison of the MXD and ivermectin (IVM) administered alone or with quercetin (QCT) (adapted from Dupuy et al. (49)) and verapamil (adapted from Molento et al. (48)), respectively c) IVM plasma concentration after subcutaneous administration alone or co-administered with LPM in rats (adapted from Lifschitz et al. (53)). (*) Values are statistically different from those obtained after endectocide drug treatment alone $P < (0.05)$.

comportamiento farmacocinético. Estos cambios han sido descriptos con la interacción digoxina-claritromicina (62), digoxina-verapamilo (63) y digoxina-itraconazole (64). En todos los casos, el principal efecto sobre la biodisponibilidad de digoxina, como consecuencia del uso de moduladores fue la disminución del clearance renal, con incrementos del nivel plasmático y de la vida media del digitálico. La co-administración de digoxina junto a quercetina en cerdos resultó en un cuadro de toxicidad con mortandad debido al notorio aumento de las concentraciones plasmáticas de digoxina (65).

Dentro de los fármacos antimicrobianos, las tetraciclinas, los macrólidos y las quinolonas han mostrado diferentes tipos de interacciones con los transportadores celulares proteicos. La presencia de inhibidores de la gp-P incrementó la permeabilidad de algunas fluorquinolonas en células Caco-2 (66). La rifampicina es un potente inductor de gp-P (36) lo que puede determinar substanciales modificaciones en el comportamiento farmacocinético de otros sustratos que sean administrados tras el uso prolongado del compuesto inductor. Las drogas antifúngicas ketoconazole e itraconazole se comportan como sustratos/inhibidores tanto de la gp-P como también de la citocromo P450. Estas drogas pueden alterar la farmacocinética de otros compuestos sustratos de la gp-P como digoxina (38) o que su propio comportamiento farmacológico se vea modificado cuando son co-administrados con drogas inductoras de la gp-P como la rifampicina (67). Los cuadros de toxicidad producidos por el antidiarreico loperamida en perros Collies (68) demuestran el rol de la gp-P como regulador del ingreso de este compuesto en concentraciones elevadas al SNC. La co-administración de esta droga junto al inhibidor de gp-P quinidina produjo un aumento de los efectos colaterales de loperamida (69). Derivados esteroides (dexametasona, progesterona) y drogas inmunosupresoras como la ciclosporina pueden producir complejas interacciones farmacológicas mediadas por gp-P cuando son administradas con otros sustratos de este transportador proteico (70, 71, 72). El Esquema II resume los efectos producidos tras la co-administración de drogas de uso veterinario con fármacos moduladores de gp-P.

Diversos estudios han demostrado la participación de gp-P en los procesos de absorción y excreción de fármacos. El avance en el estudio del rol de este transportador ha permitido individualizar el origen de la toxicidad de ciertas drogas en algunas especies, así como



Esquema II: Resumen de los principales efectos producidos tras la co-administración de drogas de uso veterinario junto a moduladores de la glicoproteína-P.

Scheme II: Summary of most important effects obtained after the co-administration of different drugs used in veterinary medicine and P-glycoprotein modulators.

también las causas del fracaso terapéutico tras la administración de drogas por vía oral. La co-administración de drogas es una práctica frecuente en medicina veterinaria y dadas las amplias y complejas interacciones que se producen entre fármacos sustratos de la gp-P, se deben evaluar cuidadosamente las consecuencias fármaco/toxicológicas de las mismas. A nivel intestinal, una inhibición de la secreción mediada por gp-P podría conducir a importantes incrementos en la biodisponibilidad, principalmente de aquellos fármacos administrados por vía oral. Esto puede convertirse en una herramienta farmacológica de utilidad para mejorar la disponibilidad sistémica y la eficacia clínica de ciertos compuestos. Por otra parte, es importante tener en cuenta el peligro de toxicidad que puede ocurrir tras este tipo de interacciones cuando se ven aumentadas las concentraciones de drogas de bajo índice terapéutico. La participación de los transportadores celulares proteicos en diferentes especies de animales domésticos y su rol fisiofarmacológico necesita ser abordado. La valoración de los procesos que regulan la disposición de fármacos en las diferentes especies, así como las consecuencias potenciales de las interacciones farmacológicas produci-

das entre fármacos sustratos de estos transportadores, podría generar alternativas terapéuticas para el control de enfermedades, mejorando la eficacia clínica de los tratamientos farmacológicos y retardar, en el caso de los fármacos antihelmínticos, el desarrollo de resistencia. La información contenida y discutida en este trabajo deja en evidencia la necesidad de investigar sobre el comportamiento fisiofarmacológico de la gp-P en las diferentes especies y razas de animales domésticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Lanusse CE, Prichard R. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet Parasitol* 1993; 49: 123-158.
- Riviere J. Comparative pharmacokinetics: principles techniques and applications. Iowa State University Press, 2121 South State Avenue, Ames, Iowa, (USA), 1999. Alvinerie M, Dupuy J, Eeckhoutte C, Sutra JF. Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co-administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil. *Parasitology Res* 1999; 85:920-922.
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol C, Borst P. Absence of the mdr-1aP-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin and cyclosporin A. *J Clin Invest* 1995; 96: 1698-1705.
- Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Therap* 2004; 27:257-264.
- Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997; 8: 161-170.
- Lin JH. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 53-81.
- Levêque D, Jehl F. P-glycoprotein and pharmacokinetics. *Anticancer Res* 1995; 15: 331-336.
- Ling V, Thompson LH. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell Physiol* 1974; 83: 103-116.
- Lee CH, Bradley G, Zhang J-T, Ling V. Differential expression of P-glycoprotein genes in primary rat hepatocyte culture. *J Cell Physiol* 1993; 157: 392-402.
- Smith JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar L, van Deemter L, Mol CAAM, Ottendorf R, van der Lugt NMT, van Roon MA, van der Walk MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and the liver disease. *Cell* 1993; 75: 451-462.
- Fardel O, Lecureur V, Guillouzo A. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol*

- 1996; 27: 1283-1291.
12. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramanchandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 361-398.
13. Higgings CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 18-21.
14. Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 1990; 42: 155-199.
15. 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: 129-157.
16. Ford JM. Modulators of multidrug resistance. Preclinical studies. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995; 9: 337-361.
17. Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T. Human P-glycoprotein transports cotisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 1992; 267: 24248-52.
18. Yang C-PH, DePinho SG, Greenberger LM, Arceci RJ, Horwitz SB. Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *J Biol Chem* 1989; 264: 782-788.
19. Arceci RJ, Croop JM, Horwitz SVB, Housman D. The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 4350-4354.
20. Dantzig AH, Alwis DP, Burgess M. Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 133-150.
21. Stephens RH, Tanianis-Hughes N, Higgs NB, Humphrey M, Warhust G. Region-dependent modulation of intestinal permeability by drug efflux transporters: in vitro studies in *mdr1a*(-/-) mouse intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303:1095-1101.
22. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of the multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 265-269.
23. Fricker G, Drewe J, Huwyler J, Gutmann H, Beglinger C. Relevance of P-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. *Brit J Pharmacol* 1996;118: 1841-1847.
24. Carreño-Gómez B, Duncan R. Everted rat intestinal sacs: a new model for the quantification of glycoprotein mediated-efflux of anticancer agents. *Anticancer Res* 2000; 20: 3157-3162.
25. Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. Placenta P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reproduc Toxicol* 12, 1998; 457-463.
26. Tamai I, Safa, AR. Azidopine noncompetitively interacts with vinblastine and cyclosporin A binding to P-glycoprotein in multidrug resistance cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 16796-800.
27. Ramanchandra M, Ambudkar SV, Chen D, Hrycina CA, Dey S. Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry* 1998; 37: 5010-19.
28. Garrigos M, Mir LM, Orłowski S. Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase- further experimental evidence for a multisite model. *Eur J Biochem* 1997; 244: 664-673.
29. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981; 41: 1967-1972.
30. Molden E, Christensen H, Sund RB. Extensive metabolism of diltiazem and P-glycoprotein-mediated efflux of desacetyl-diltiazem (M1) by rat jejunum in vitro. *Drug Metab Dispos* 2000; 2: 107-9.
31. Lampidis TJ, Kolonias D, Tapiero H, Savaraj N, Cahn J. In vitro cardiac potencies of multidrug resistance modulators. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1990; 31: 373.
32. Kukl JS, Sikic BI, Blume KG, Chao NJ. Use of etoposide in combination with cyclosporine for purging multidrug resistant leukemic cells from bone marrow in a mouse model. *Exp Hematol* 1992; 20: 1048-1054.
33. Pirker R, Keilhauer G, Rascharck M, Lechner C, Ludwing H. Reversal of multidrug resistance in human KB cell lines by structural analogs of verapamil. *In J Cancer* 1990; 45: 916-919.
34. Song S, Suzuki H, Kawai R, Sugiyama Y. Effect of PSC 833, a P-glycoprotein modulator, on the disposition of vincristine and digoxin in rats. *Am Soc Pharmacol Exp Therap* 1999; 27: 689-694.
35. Fernandez C, Buyse M, German- Fattal M, Gimenez F. Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *J Pharm Pharm Sci* 2004; 3: 359-371.
36. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, VonRichter O, Zundler I, Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 1999; 104: 147-153.
37. Lin JH, Chiba M, Chen I.-W, Nishime JA, de Luna M, Yamazaki M, Lin Y. Effect of dexamethasone on the intestinal first-pass metabolism of indinavir in rats: evidence of cytochrome P-450 and P-glycoprotein induction. *Drug Metabol Dispos* 1999; 27: 1187-1193.
38. Salphati L, Benet LZ. Modulation of P-glycoprotein expression by cytochrome P-450 3A inducers in male and female rat livers. *Biochem. Pharmacol* 1998; 55: 387-395.
39. Jette L, Beaulieu E, Leclere J-M, Beliveau R. Cyclosporin A treatment induces overexpression of

- P-glycoprotein in the kidney and other tissues. *Am J Physiol* 1996; 270: F756-F765.
40. Laffont, C, De Vrieze G, Maas R, Bousquet-Melou A, Fink-Gremmels J. *Comparativa evaluation of P-glycoprotein activity in horses, pigs, cattle, sheep, goats, and rats using a lymphocyte-based ex vivo model. J Vet Pharmacol Therap* 2003; 26: 82-307.
41. Didier AD, Loor F. The abamectin derivate ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* 1996; 7: 745-751.
42. Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS, Di Pietro JA. Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res* 1987; 48: 684-685.
43. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 727-733.
44. Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T. *MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. Eur J Pharmacol* 2003; 2-3: 85-91.
45. Tranquilli WJ, Paul AJ, Todd KS. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *Am J vet Res* 1991; 52: 1170-1172.
46. Alvinerie M, Dupuy J, Eeckhoutte C, Sutra JF. Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co-administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil. *Parasitology Res* 1999; 85:920-922.
47. Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, Lanusse C. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *J vet Pharmacol Therap* 2002; 25: 111-120.
48. Molento MB, Lifschitz A, Sallovitz J, Lanusse C, Prichard R. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitol Res* 2004; 2:121-7.
49. Dupuy J, Larrieu G, Sutra JF, Lespine A, Alvinerie M Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Vet Parasitol* 2003; 4:337-47.
50. Chiu S, Green M, Baylis F, Eline D, Rosegay A, Meriwether H, Jacob T. Absorption, tissue distribution and excretion of tritium-labelled ivermectin in cattle, sheep, and rat. *J. Agric. Food Chem* 1990; 38: 2072-2078.
51. Lifschitz, A, Virkel G, Sallovitz J, Sutra JF, Galtier P, Alvinerie M, Lanusse C. Comparativa distribution of ivermectin and doramectin to tissues of parasitic location in cattle. *Vet parasitol* 2000; 87:327-338.
52. Laffont CM, Toutain P, Alvinerie M, Bousquet-Mélou A. Intestinal secretion is a mayor route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 626-630.
53. Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, Lanusse C. Loperamide modifies the tissue disposition kinetics of ivermectin in rats. *J Pharm Pharm* 2004; 56:61-67.
54. Broeks A, Janssen H, Calafat J, Plasterk RHA. A P-glycoprotein protects *Caenorabditis elegans* against toxins. *EMBO J* 1995; 14: 1858-1866.
55. Kwa MSG, Okoli MN, Schulz-Key H, Okongkwo PO, Ross MH. Use of P-glycoprotein gene probes to investigate antihelmintic resistance in *Haemonchus contortus* and comparison with *Onchocerca volvulus*. *Int J Parasitol* 1998; 28: 1235-1240.
56. Smith JM, Prichard RK. Localization of P-glycoprotein mRNA in the tissues of *Haemonchus contortus* adult worms and its relative abundance in drug-selected and susceptible strains. *J Parasitol* 2001; 83 (3): 612-620.
57. Xu M, Molento M, Blackhall W, Ribeiro P, Beech R, Prichard RK. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 91: 327-335.
58. Molento MB, Prichard RK. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitol Res* 1999; 85: 1007-1011.
59. Merino G, Alvarez AI, Prieto JG, Kim RB. The antihelmintic agent albendazole does not interact with P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 365-369.
60. Merino G, Molina AJ, Garcia JL, Pulido MM, Prieto JG, Alvarez AI. Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. *Int J Pharm* 2003; 16; 263:123-32.
61. Beugnet F, Gauthey M, Kerboeuf D. Partial in vitro reversal of benzimidazole resistance by the free-living stages of *Haemonchus contortus* with verapamil. *Vet Res* 1997; 141: 575-576.
62. Wakasugi H, Yano I, Ito T, Hashida T, Futami T, Nohara R, Sasayama S, Inui K. Effect of clarithromycin on renal excretion of digoxin: interaction with P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 1:123-8.
63. Pedersen KE, Thyssen P, Kiltgaard NA, Christiansen BD, Nielsen-Kudsk F. Influence of verapamil on the inotropism and pharmacokinetics of digoxin. *Eur J Pharmacol* 1983; 25: 199-206.
64. Woodland C, Ito S, Koren G. A model for the prediction of digoxin-drug interactions at the renal tubular cell level. *Ther Drug Monit* 1998; 2:134-8.
65. Wang YH, Chao PD, Hsiu SL, Wen KC, Hou YC. Lethal quercetin-digoxin interaction in pigs. *Life Sci* 2004; 10:1191-7.
66. Rodríguez-Ibáñez M, Nalda-Molina R, Mantalar-Montero M, Bermejo MV, Merino V, Garrigues TM. Transintestinal secretion og ciprofloxacin, grepafloxacin and sparfloxacin: in vitro and in situ inhibition studies. *Eur J Pharm Bioph* 2003; 55: 241-246.
67. Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Pharmacokinetic interactions with

rifampicin : clinical relevance. Clin Pharmacokinet 2003; 9:819-50.

68. Hugnet C, Cadore JL, Buronfosse F, Pineau X, Mathet T, Berny PJ. Loperamide poisoning in the dog. Vet Hum Toxicol 1996; 1:31-3.

69. Sadeque AJ, Wandel C, He H, Shah S, Wood AJ. Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. Clin Pharmacol Ther 2000; 3:231-7.

70. Nakayama A, Saitoh H, Oda M, Takada M, Aungst BJ. Region-dependent disappearance of vinblastine in rat small intestine and characterization of its P-glycoprotein-mediated efflux system. Eur J Pharm Sci 2000; 11: 317-324.

71. Varis T, Kivisto KT, Backman JT, Neuvonen PJ. The cytochrome P450 3A4 inhibitor itraconazole markedly increases the plasma concentrations of dexamethasone and enhances its adrenal-suppressant effect. Clin Pharmacol Ther 2000; 5:487-94.

72. Dahlinger J, Gregory C, Bea J. Effect of ketoconazole on cyclosporine dose in healthy dogs. Vet Surg 1998; 1:64-8.