

UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Ciencias Biomédicas

DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS Y POLIMÓRFICAS EN LA ACTIVIDAD Y MODULACIÓN A TRAVÉS DE INHIBIDORES DEL TRANSPORTADOR ABCG2/BCRP

"INTERSPECIFIC AND POLYMORPHIC DIFFERENCES IN THE ACTIVITY AND MODULATION MEDIATED BY INHIBITORS OF THE ABCG2/BCRP TRANSPORTER"

Lucía González Lobato

León, 2012

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado gracias a la concesión de una **Beca del Programa de Formación del Profesorado Universitario** (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (2008-2012). Dentro del desarrollo de dicha beca, se realizaron dos estancias breves en centros de investigación internacionales. La primera se desarrolló en el laboratorio del Dr. Suresh V. Ambudkar (Laboratory of Cell Biology, CCR, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, EEUU). La segunda se realizó en el laboratorio del Dr. Pierre Falson (Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), Lyon, Francia). Para el desarrollo de algunas partes del presente trabajo, también se ha contado con financiación de diversas entidades:

-MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN.

*Proyectos de Investigación Fundamental del Plan Nacional. Título del proyecto: "Caracterización funcional del transportador de membrana ABCG2/BCRP en rumiantes: análisis de sus polimorfismos y relación entre sus variantes genotípicas y aparición de residuos de fármacos en leche". REF. AGL2009-11730. Duración: 2010-2012. Investigadora Principal: Dra. Gracia Merino Peláez

-JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN.

*Proyectos de Grupos de Investigación de Excelencia de Castilla y León. Título del proyecto: Transportador ABCG2/BCRP en glándula mamaria: Interacciones farmacológicas y modulación de la excreción de fármacos hacia la leche. REF. GR132. Duración: 2008-2010. Investigador Principal: Dr. Julio G. Prieto Fernández

Parte de la presente memoria ha sido objeto de las siguientes:

Publicaciones

- Lucía González-Lobato, Rebeca Real, Julio G. Prieto, Ana I. Álvarez, Gracia Merino. "*Differential inhibition of murine Bcrp1/Abcg2 and human BCRP/ABCG2 by the mycotoxin fumitremorgin C*" Eur J Pharmacol 644(1-3):41-8. 2010.

- Rebeca Real, Lucía González-Lobato, Marta F. Baro, Sergio Valbuena, Álvaro de la Fuente, Julio G. Prieto, Ana I. Álvarez, Margarita Marqués, Gracia Merino. "Analysis of the effect of the bovine adenosine triphosphate-binding cassette transporter G2 single nucleotide polymorphism Y581S on transcellular transport of veterinary drugs using new cell culture models" J An Sci 89(12):4325-38. 2011.

Comunicaciones

- Lucía González-Lobato, Rebeca Real, Estefanía Egido, Borja Barrera, Julio G. Prieto, Ana I. Álvarez, Gracia Merino. "In vitro interaction of four fluoroquinolones (Marbofloxacin, Difloxacin, Sarafloxacin and Orbifloxacin) with the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ ABCG2)" 6th International Research Conference, Biomedicals Transporters. Thun, Suiza 2009.

- Lucía González-Lobato, Rebeca Real, Gracia Mendoza, Julio G. Prieto, Ana I. Álvarez, Gracia Merino. "Differential inhibition of murine Bcrp1 and human BCRP by the mycotoxin fumitremorgin C: accumulation assays and cytotoxicity studies" 3rd FEBS Special Meeting "ATP- Binding Cassette (ABC) proteins: From genetic disease to multidrug resistance. Innsbruck, Austria 2010.

- Lucía González-Lobato, Estefania Egido, Borja Barrera, Julio G. Prieto, Ana I. Álvarez, Gracia Merino. "Species difference in the inhibitory effect of Fumitremorgin C on the Abcg2/Bcrp - mediated *vectorial drug transport*" 3rd FEBS Special Meeting "ATP- Binding Cassette (ABC) proteins: From genetic disease to multidrug resistance. Innsbruck, Austria 2010.

- Lucía González-Lobato, Rebeca Real, Julio G. Prieto, Ana I. Álvarez, Gracia Merino. "*Differential inhibition of murine Bcrp1/Abcg2 and human BCRP/ABCG2 by the mycotoxin fumitremorgin C*" 7th Annual North American ABC Genetic Workshop. Frederick, EEUU 2010.

AGRADECIMIENTOS

En las próximas páginas se encuentra recogido el trabajo realizado durante varios años pudiendo parecer, a simple vista, un conjunto de experimentos y resultados obtenidos en un laboratorio. Sin embargo, me gustaría destacar a todas las personas que han intervenido en el día a día, ya sea logística o personalmente, durante el desarrollo de esta Tesis y sin las cuales no habría sido posible.

Posiblemente, con el paso de los años, muchos de los conocimientos adquiridos durante esta etapa investigadora queden en el olvido, lo que permanecerá imborrable serán todas las experiencias personales que han enriquecido este período de mi vida.

Aún recuerdo aquel día a principios de septiembre cuando me dejé caer por el departamento para *investigar* la posibilidad de realizar una Tesis Doctoral. Mis primeros y sinceros agradecimientos son para Julio que, desde ese primer día logró motivarme para que comenzase esta aventura científica. También quiero agradecer la importante labor de mis directoras de Tesis, Ana y Gracia, así como la ayuda de Margot. Y que mejor forma de comenzar a cacharrear en el laboratorio que bajo las indicaciones de Gracia Mendo y, a continuación, de Rebe, reciente mamá por aquel entonces. Y todo ello aderezado por las bromas de Miriam. Muchas gracias también a Estefanía, Virginia y al dúo Zipi y Zape (Borja y Andoni) por todos los momentos que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio. Tampoco me olvido de los más jóvenes, Indira, Tamara, Sergio y Diego.

Quiero agradecer a Zapico su esfuerzo continuo por alegrar a uno desde primeras horas de la mañana y, cómo no, por su excelente y siempre original organización de eventos de convivencia. Gracias también a Ludy, a Héctor y a todos los miembros del área de Fisiología.

Una parte importante en mi formación han sido mis dos estancias realizadas durante el desarrollo de la Tesis. En primer lugar, con el grupo del Dr. Ambudkar en Bethesda (EEUU) aprendí nuevas formas de trabajar en el laboratorio y un poco de cultura americana. Recientemente, durante mi segunda estancia con el grupo del Dr. Pierre Falson en Lyon (Francia), amplié mi formación científica e hice buenos amigos. Desde un primer momento me sentí como en casa ¡muchas gracias a todos! y en especial a Lorena, Charlotte y Sandrine.

También me gustaría agradecer el apoyo incondicional de mis amigos y familia, siempre ahí para dar consejos y ánimo. Sobre todo a Jose por su cariño y comprensión, especialmente durante la estancias en el extranjero, y por aguantar mis divagaciones científicas. ¡Gracias por hacerme feliz!

Por último, gracias a todos aquellos que haya olvidado mencionar y formen parte de este trabajo.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

A Jose A M^aJesús y Sofi

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. TRANSPORTADORES ABC	7
2.1.1. PRINCIPALES MIEMBROS DE LA FAMILIA	9
2.2. BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN (BCRP/ABCG2)	13
2.2.1. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA Y CONFIGURACIÓN FUNCIONAL	14
2.2.2. DISTRIBUCIÓN TISULAR Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA	16
2.2.3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE SUSTRATOS E INHIBIDORES DE ABCG2	25
2.2.4. POLIMORFISMOS DE ABCG2	26
2.2.5. ABCG2: DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS	31
2.3. METODOLOGÍA <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO DE TRANSPORTADORES ABC	37
2.4. FUMITREMORGINA C: INHIBIDOR ESPECÍFICO DE ABCG2	41
2.5. FLAVONOIDES: EQUOL	42
2.6. FLUOROQUINOLONAS: DIFLOXACINA, DANOFLOXACINA, MARBOFLOXACINA, ORBIFLOXACINA Y SARAFLOXACINA	45
2.6.1. UTILIZACIÓN CLÍNICA	47
2.6.2. INTERACCIÓN CON TRANSPORTADORES ABC	49
2.7. LACTONAS MACROCÍCLICAS: IVERMECTINA Y DORAMECTINA	51
2.7.1. UTILIZACIÓN CLÍNICA	52
2.7.2. INTERACCIÓN CON TRANSPORTADORES ABC	53

2.8. ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS: TILMICOSIN	55
2.8.1. UTILIZACIÓN CLÍNICA	55
2.8.2. INTERACCIÓN CON TRANSPORTADORES ABC	56
2.9. SULFONAMIDAS: SULFAMETOXAZOL	57
2.9.1. UTILIZACIÓN CLÍNICA	58
2.9.2. INTERACCIÓN CON TRANSPORTADORES ABC	59
3. OBJETIVOS	61
4. MATERIAL Y MÉTODOS	65
4.1. COMPUESTOS ENSAYADOS	67
4.2. LÍNEAS CELULARES	67
4.2.1. CÉLULAS MDCKII	67
4.2.2. CÉLULAS MEF3.8	68
4.2.3. CÉLULAS HEK293	68
4.2.4. CÉLULAS SBBF1	69
4.3. VECTORES DE EXPRESIÓN	69
4.4. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DEL TRANSPORTE BIDIRECCIONAL DE FÁRMACOS	71
4.5. ENSAYOS DE ACUMULACIÓN DE FÁRMACOS	74
4.6. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	76
4.7. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	77
4.7.1. INSTRUMENTACIÓN	77
4.7.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	78
4.7.3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS	79
4.8. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA CLONACIÓN DE DNA	80

4.8.1. AISLAMIENTO DE RNA A PARTIR DE TEJIDO	80
4.8.2. AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DEL cDNA DE ABCG2 OVINA	81
4.8.3. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA	82
4.8.4. CLONACIÓN DE DNA	82
4.8.4.1. Clonación de productos de PCR	82
4.8.4.2. Transformación de bacterias competentes con DNA recombinante	83
4.8.4.3. Análisis de transformantes	83
A. Aislamiento de plásmidos transformantes de Escherichia coli	83
B. Análisis de restricción del DNA plasmídico	85
4.8.4.4. Creación de extremos romos	85
4.8.4.5. Desfosforilación de extremos 5'	86
4.8.4.6. Ligación de fragmentos de DNA	86
4.9. TRANSFECCIÓN	87
4.9.1. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE FIBROBLASTOS FETALE OVINOS (SBFF1)	ES 87
4.9.2. GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES	88
4.9.2.1. Subclones MDCKII y MEF3.8	88
4.9.2.2. Subclones HEK293	91
4.10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN	92
4.10.1. INMUNOCITOQUÍMICA	92
4.10.2. WESTERN-BLOT	93

	4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	94
5.	RESULTADOS	95
	5.1. ESTUDIO FUNCIONAL COMPARATIVO IN VITRO	
	DE Abcg2 MURINA Y ABCG2 HUMANA	97
	5.1.1. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE FLUOROQUINOLONAS	97
	5.2.1. ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON FUMITREMORGINA C	105
	5.1.2.1. Ensayos de acumulación de mitoxantrona y chlorina e6	105
	5.1.2.2. Ensayos de citotoxicidad con mitoxantrona y topotecan	
	y potencia inhibitoria de FTC	108
	5.1.2.3. Ensayos de inhibición del transporte de nitrofurantoína	
	y mitoxantrona	111
	5.2. ESTUDIO FUNCIONAL COMPARATIVO IN VITRO DE ABCG2	
	BOVINA (CON SUS DOS VARIANTES S581, Y581) Y ABCG2 OVINA	115
	5.2.1. CLONACIÓN DE ABCG2 OVINA	115
	5.2.2. EXPRESIÓN TRANSITORIA DE ABCG2 OVINA Y AMBAS	
	VARIANTES DE LA BOVINA EN FIBROBLASTOS FETALES	
	OVINOS (SBFF1)	119
	5.2.3. EXPRESIÓN ESTABLE DE ABCG2 OVINA Y ABCG2 BOVINA	
	(Y581, S581) EN CÉLULAS MEF3.8	121
	5.2.3.1. Establecimiento de las líneas celulares	122
	A. Análisis y selección inicial	122
	B. Caracterización de los clones seleccionados	130
	5.2.3.2. Estudios de inhibición con doramectina, ivermectina y equol	137
	5.2.4. EXPRESIÓN ESTABLE DE ABCG2 BOVINA (Y581, S581)	
	Y ABCG2 OVINA EN CÉLULAS HEK293	142

5.2.4.1. Establecimiento de las líneas celulares	142
A. Análisis y selección inicial	142
B. Caracterización de los clones seleccionados	150
5.2.4.2. Estudios de inhibición con sulfametoxazol y tilmicosin	155
5.2.4.3. Estudios de citotoxicidad con mitoxantrona, ivermectina, sulfametoxazol y tilmicosin	156
5.2.5. EXPRESIÓN ESTABLE DE ABCG2 OVINA CÉLULAS MDCKII	158
5.2.5.1. Establecimiento de la línea celular	158
A. Análisis y selección inicial	158
B. Caracterización de los clones seleccionados	161
5.2.5.2. Diferencias entre ambas variantes de la ABCG2 bovina y ABCG2 ovina en el transporte de compuestos	164
6. DISCUSIÓN	
6.1. ESTUDIO FUNCIONAL COMPARATIVO <i>IN VITRO</i> DE Abcg2 MURINA Y ABCG2 HUMANA	179
6.2. CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE ABCG2 BOVINA (S581, Y581)	
Y ABCG2 OVINA	184
6.2.1. MODELOS CELULARES	184
6.2.2. TRANSPORTE DE FLUOROQUINOLONAS	187
6.2.3. TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA	188
6.2.4. INHIBICIÓN DE ABCG2 EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR BOVINO Y OVINO	189
7. CONCLUSIONES	195
8. SUMMARY	199
8.1. INTRODUCTION	201

8.1.1. ABC TRANSPORTERS	201
8.1.2. BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN (BCRP/ABCG2)	203
8.1.3. IN VITRO ASSAYS TO STUDY ABC TRANSPORTERS	207
8.1.4. FUMITREMORGIN C: ABCG2 SPECIFIC INHIBITOR	209
8.1.5. FLAVONOIDS: EQUOL	210
8.1.6. FLUOROQUINOLONES: DIFLOXACIN, MARBOFLOXACIN,	
ORBIFLOXACIN, SARAFLOXACIN AND DANOFLOXACIN	210
8.1.7. MACROCICLIC LACTONES: IVERMECTIN AND DORAMECTIN	211
8.1.8. MACROLIDE ANTIBIOTICS: TILMICOSIN	212
8.1.9. SULFONAMIDES: SULPHAMETOXAZOLE	213
8.2. OBJECTIVES	214
8.3. MATERIAL AND METHODS	215
8.3.1. CELL LINES	215
8.3.1. PLASMID CONSTRUCTIONS	216
8.3.2. TRANSCELLULAR TRANSPORT ASSAYS	216
8.3.3. ACCUMULATION ASSAYS	217
8.3.4. CYTOTOXICITY ASSAYS	218
8.3.5. HPLC ANALYSIS	219
8.3.6. DNA CLONING TECHNIQUES	220
8.3.7. IMMUNOLOCALIZATION	221
8.3.8. IMMUNOBLOT ANALYSIS	221
8.3.9. STATISTICAL ANALYSIS	222
8.4. RESULTS AND DISCUSSION	222

8.4.1. FUNCTIONAL IN VITRO STUDY COMPARING MURINE Abcg2	
AND HUMAN ABCG2	222
8.4.1.1. Transcellular transport of fluoroquinolones	222
8.4.1.2. Inhibition studies with fumitremorgin C	224
8.4.2. FUNCTIONAL IN VITRO STUDY COMPARING BOVINE ABCG2	
(S581, Y581) AND OVINE ABCG2	226
8.4.2.1. Ovine ABCG2 cloning	227
8.4.2.2. Transient expression of ovine and both variants of bovine	
ABCG2 in SBFF1 cells	227
8.4.2.3. MEF3.8 cell model stably expressing ovine and both variants of	
bovine ABCG2	228
8.4.2.4. HEK293 cell model stably expressing ovine and both variants of	
bovine ABCG2	230
8.4.2.5. MDCKII cell model stably expressing ovine ABCG2	231
8.5. CONCLUSIONS	235
8.6. REFERENCES (See Chapter 9)	235
9. BIBLIOGRAFÍA	237
10. PUBLICACIONES	269

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los transportadores ABC. a) Representación esquemática de un transportador ABC b) Estructura de un <i>full-transportar</i> y	1
de un <i>half-transporter</i> de la familia ABC	8
Figura 2. Estructura general de la familia de transportadores ABC	
A. P-gp y ABCG2 y B. MRP1-9	10
Figura 3. Estructura del gen ABCG2 humano y su proteína	14
Figura 4. Conformación de ABCG2 en la membrana plasmática	15
Figura 5. Órganos en los que se localiza el transportador ABCG2	17
Figura 6. Representación esquemática de la localización de los transportadores ABC en el testículo, el túbulo seminífero y los capilares sanguíneos testiculares	s 20
Figura 7. Representación esquemática de los transportadores que se expresan er la placenta humana A. Microestructura de la barrera placentaria. B. Principales transportadores y su localización.	1 s 22
Figura 8. Inmunolocalización del transportador ABCG2 en muestras de glándula mamaria de ratón	1 23
Figura 9. Representación esquemática del transportador ABCG2 humano y localización de varios de sus polimorfismos no sinónimos descritos	/ 28
Figura 10. Secuencia parcial de aminoácidos del transportador ABCG2 er diferentes especies y comparativa del residuo situado en posición 581	1 30
Figura 11. Análisis evolutivo de ABCG2	32
Figura 12. Distribución tisular de Abcg2 murina en machos y hembras	33
Figura 13. Distribución tisular de ABCG2 de rata en machos y hembras	34
Figura 14. Estructura química de la fumitremorgina C	41
Figura 15. Estructura química del equol	43
Figura 16 . Estructuras de la difloxacina (A), marbofloxacina (B), orbifloxacina (C), sarafloxacina (D) y danofloxacina (E)	a 46
Figura 17. Estructura química de las lactonas macrocíclicas ivermectina (A) y doramectina (B)	/ 51

Figura 18. Estructura química del antibiótico macrólido tilmicosin	55
Figura 19. Estructura química de la sulfonamida sulfametoxazol	57
Figura 20. Mapa del vector pCR®2.1-TOPO® utilizado en la clonación del ger de ABCG2 bovina	ı 70
Figura 21. Mapa de los vectores pEF1α-IRES-GFP (izquierda) y pLZRS-IRES GFP (derecha) utilizados en la transfección transitoria y estable respectivamente	- 71
Figura 22. A Estructura del pocillo con los dos compartimentos B Foto de un inserto <i>Transwell</i> empleado para los estudios de transporte con células epiteliales	ı 72
Figura 23. Esquema de los estudios de transporte utilizando nitrofurantoína como modelo de sustrato de ABCG2 en líneas celulares MDCKII y MDCKII- Abcg2 er ausencia o no del inhibidor específico de ABCG2 Ko143 a la concentración de 1 μ M) 1 [73
Figura 24. Esquema de los estudios de acumulación de fármacos para la identificación de sustratos e inhibidores de ABCG2	ı 75
Figura 25. Representación esquemática del proceso de transducción de las células MDCKII y MEF3.8	; 90
Figura 26. Transporte transepitelial de marbofloxacina (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 y MDCKII-ABCG2 en ausencia y er presencia de Ko143 (1 μ M)	s 1 99
Figura 27. Transporte transepitelial de difloxacina (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 y MDCKII-ABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M)	[; 100
Figura 28. Transporte transepitelial de orbifloxacina (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 y MDCKII-ABCG2 en ausencia y er presencia de Ko143 (1 μ M)	s 1 101
Figura 29. Transporte transepitelial de sarafloxacina (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 y MDCKII-ABCG2 en ausencia y er presencia de Ko143 (1 μ M)	s 1 102
Figura 30. Acumulación de mitoxantrona 10μ M (MXR) y clorina e6 50μ M (Ce6) en células MDCKII (A-C) y MEF3.8 (B-D) parentales y transducidas con Abcg2 murina y ABCG2 humana en presencia o ausencia de fumitremorgina C 10μ M (FTC)) 2 [106

Figura 31. Potencia inhibitoria de la fumitremorgina C sobre el efecto mediado por el transportador en la acumulación de mitoxantrona 10μM (MXR) y clorina e6 50μM (Ce6) en células MDCKII (A-C) y MEF3.8 (B-D) transducidas con Abcg2 murina y ABCG2 humana

Figura 32. Efecto de la mitoxantrona (MXR) (A-B) o topotecan (TPT) (C-D) sobre la viabilidad de células MDCKII (A-C) y MEF3.8 (B-D), ambas transducidas de forma estable con Abcg2 murina y ABCG2 humana 109

Figura 33. Efecto de la fumitremorgina C sobre la viabilidad de MDCKII (A-C) y MEF3.8 (B-D), ambas transducidas de forma estable con Abcg2 murina y ABCG2 humana empleando una concentración de mitoxantrona (MXR) (A-B) o topotecan (TPT) (C-D) diez veces inferior a su IC₅₀ 110

Figura 34. Transporte transepitelial de nitrofurantoína (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 y MDCKII-ABCG2 en ausencia y en presencia de fumitremorgina C (1 y 5 μ M) 112

Figura 35. Transporte transepitelial de mitoxantrona (20 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 y MDCKII-ABCG2 en ausencia y en presencia de fumitremorgina C (1 μ M) 113

Figura 36. A Análisis de la integridad del RNA de la muestra extraída de hígado ovino. **B** Amplificación la secuencia de interés (ABCG2) por PCR 116

Figura 37. Estrategia de clonación del cDNA de ABCG2 ovina en pEF1α-IRES-GFP 117

Figura 38. Estrategia de clonación del cDNA de la ABCG2 ovina en pLZRS-IRES-GFP 118

Figura 39. Análisis de la funcionalidad del transportador ABCG2 ovino transfectado de forma transitoria en células SBFF1. A Representación dot-plot de la fluorescencia para GFP (FL1). **B** Histogramas que representan la acumulación de mitoxantrona (10 μ M) en células transfectadas con el vector vacío y con ABCG2 ovina en ausencia o presencia de Ko143 (1 μ M) 120

Figura 40. Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) en fibroblastos fetales ovinos (SBFF1) a las 24 horas de la transfección transitoria 121

Figura 41. Transducción de células MEF3.8 con los plásmidos que expresan oABCG2, bABCG2-Y581, bABCG2-S581 y Vector vacío. A Fotografías con microscopía de contraste de fases. **B** Fotografías con microscopía de fluorescencia 123

Figura 42. Análisis de los clones MEF3.8 transducidos con el vector vacío.
A Acumulación de mitoxantrona tras incubar a las células durante 1 hora con el fármaco. B Expresión de GFP 124
Figura 43. Funcionalidad de la variante bABCG2–S581 en los clones MEF3.8. A

Acumulacióndemitoxantronatrasincubaralascélulasdurante 1 hora con el fármaco.B Expresión de GFP126

Figura 44. Funcionalidad de la variante bABCG2–Y581 en los clones MEF3.8. AAcumulación de mitoxantrona tras incubar a las célulasdurante 1 hora con el fármaco. B Expresión de GFP127

Figura 45. Funcionalidad de la variante oABCG2 en los clones MEF3.8.AAcumulación de mitoxantrona tras incubar a las células durante1 hora con el fármaco. B Expresión de GFP128

Figura 46. Clasificación de los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2–S581en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona129

Figura 47. Clasificación de los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2–Y581en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona129

Figura 48. Clasificación de los clones MEF3.8 transducidos con oABCG2 en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona 130

Figura 49. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones MEF3.8 de la variante bABCG2 S581. **A** Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 8 semanas de la transducción. **B** Expresión de GFP a las 0 y 8 semanas de la transducción 132

Figura 50. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones MEF3.8 de la variante bABCG2 Y581. **A** Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 8 semanas de la transducción. **B** Expresión de GFP a las 0 y 8 semanas de la transducción 133

Figura 51. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones MEF3.8 de la variante oABCG2. **A** Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 8 semanas de la transducción. **B** Expresión de GFP a las 0 y 8 semanas de la transducción 134

Figura 52. Estabilidad de la expresión de clones MEF3.8 candidatos para bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 mediante análisis por western-blot 135

Figura 53.Inmunolocalización del transportador ABCG2 bovino y ovinoen los clones MEF3.8136

Figura 54. Efecto de la lactona macrocíclica doramectina (DORA) en la acumulación de mitoxantrona (10 μ M) en células MEF3.8 (parental) y los clones transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2 139

Figura 55. Potencia inhibitoria de la lactona macrocíclica doramectina (DORA) en los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2 139

Figura 56. Efecto de la lactona macrocíclica ivermectina (IVER) en la acumulación de mitoxantrona (10 μ M) en células MEF3.8 (parental) y los clones transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2 140

Figura 57. Potencia inhibitoria de la lactona macrocíclica ivermectina (IVER) en los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2 140

Figura 58. Efecto del isoflavonoide equol (EQL) en la acumulación de mitoxantrona (10 μ M) en células MEF3.8 (parental) y los clones transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2 141

Figura 59. Potencia inhibitoria del isoflavonoide equol (EQL) en los clonesMEF3.8 transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2141

Figura 60. Análisis del vector vacío en los clones HEK293. A Acumulación demitoxantrona tras incubar a las células durante 1 hora con el fármaco.B Expresión de GFP145

Figura 61. Funcionalidad de la variante bABCG2 – S581 en los clones HEK293.
A Acumulación de mitoxantrona tras incubar a las células durante 1 hora con el fármaco. B Expresión de GFP

Figura 62. Funcionalidad de la variante bABCG2 – Y581 en los clones HEK293. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar a las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP 147

Figura 63. Funcionalidad de la variante oABCG2 en los clones HEK293. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar a las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP 148

Figura 64. Clasificación de los clones HEK 293 transducidos con bABCG2-S581,en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona148

Figura 65. Clasificación de los clones HEK 293 transducidos conbABCG2-Y581, en función de la expresión de GFP y de la acumulación demitoxantrona149

Figura 66. Clasificación de los clones HEK 293 transducidos con oABCG2, en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona 149

Figura 67. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expressión de GFP de los clones HEK293 que expresan bABCG2-S581. A Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 6 semanas de la transducción. **B** Expressión de GFP a las 0 y 6 semanas de la transducción en células HEK293 151

Figura 68. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expressión de GFP de los clones HEK293 que expresan bABCG2-Y581. A Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 6 semanas de la transducción. **B** Expressión de GFP a las 0 y 6 semanas de la transducción en células HEK293 152

Figura 69. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expressión de GFP de los clones HEK293 que expresan oABCG2. **A** Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 6 semanas de la transducción. **B** Expressión de GFP a las 0 y 6 semanas de la transducción en células HEK293 153

Figura 70. Estabilidad de la expresión de clones de células HEK293candidatospara bABCG2- S581, bABCG2- Y581 y oABCG2 mediante análisispor western-blot154

Figura 71. Efecto del antibiótico sulfametoxazol (SMX) en la acumulación de mitoxantrona (5 μM) en células HEK293 transducidas con vector vacío (V), con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2 155

Figura 72. Efecto del antibiótico tilmicosin (TMS) en la acumulación de mitoxantrona (5 μM) en células HEK293 transducidas con vector vacío (V), con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2 156

Figura 73. Ensayo de citotoxicidad empleando mitoxantrona (A), ivermectina (B), sulfametoxazol (C) y tilmicosin (D) en células HEK293 transducidas con vector vacío, con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2 157
Figura 74. Funcionalidad de oABCG2 en los clones MDCKII. **A** Acumulación de mitoxantrona tras incubar a las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP 160

Figura 75. Clasificación de los clones MDCKII transducidos con oABCG2 en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona.

Figura 76. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones MDCKII de la variante ovina. **A** Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 8 semanas de la transducción. **B** Expresión de GFP a las 0 y 8 semanas de la transducción. 162

Figura 77. Estabilidad de la expresión de clones MDCKII candidatosparaABCG2 ovina mediante análisis por western-blot163

Figura 78. Inmunolocalización del transportador ABCG2 ovino en los clones MDCKII 164

Figura 79. Transporte transepitelial de nitrofurantoína (10 μ M) en células parentales y transducidas con oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M) 166

Figura 80. Transporte transepitelial de danofloxacina (10 μ M) en células parentales y transducidas con oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M) 167

Figura 81. Transporte transepitelial de marbofloxacina (10 μ M) en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M) 168

Figura 82. Transporte transepitelial de orbifloxacina (10 μ M) en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M) 169

Figura 83. Transporte transepitelial de sarafloxacina (10 μ M) en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M) 170

Figura 84. Transporte transepitelial de difloxacina (10 μ M) en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M) 171

Figura 85. Transporte transepitelial de riboflavina (0,1 μ M) en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M) 175

TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de homología entre la secuencia nucleotídica y proteica deABCG2 de cabra y otras especies de mamíferos3	31	
Tabla 2. Rectas de calibración en los intervalos de concentración estudiados paracada fármaco en medio de cultivo, junto con los coeficientes de correlación	30	
Tabla 3. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de marbofloxacina (10 μ M) enpresencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de lamonocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas	103	
Tabla 4. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de difloxacina (10 μ M) enpresencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de lamonocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas	103	
Tabla 5. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de orbifloxacina (10 μ M) enpresencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de lamonocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas	104	
Tabla 6. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de sarafloxacina (10 μ M) enpresencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de lamonocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas	104	
Tabla 7. Valores de IC50 para la fumitremorgina C, en el ensayo de inhibición del efecto mediado por el transportador sobre la acumulación de mitoxantrona ($10\mu M$) y clorina e6 ($50\mu M$) en células MDCKII y MEF3.8 transducidas con Abcg2 murina y ABCG2 humana	107	
Tabla 8. Capacidad de la fumitremorgina C para revertir la resistencia a la mitoxantrona y al topotecan, mediada por el transportador ABCG2. Valores de IC50 para la mitoxantrona y el topotecan en células MDCKII y MEF3.8 transducidas con Abcg2 murina y ABCG2 humana	110	
Tabla 9. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de nitrofurantoína (10 μ M) enpresencia y ausencia de fumitremorgina C (1 y 5 μ M), determinados a amboslados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas	114	
Tabla 10. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de mitoxantrona (20 μ M) en		
presencia y ausencia de fumitremorgina C (1 μ M), determinados a ambos lados de		
la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas	114	

58
.72
.72
.73
.73
.74
.74
.76
.93

ABREVIATURAS

A-B: Apical-Basal
ABC: <u>ATP-Binding</u> Cassette, casete de unión al ATP
B-A: Basal-Apical
BCRP: <u>Breast Cancer Resistance Protein</u> , proteína asociada al cáncer de mama
BSA: albúmina sérica bovina
cDNA: DNA complementario
Ce6: clorina e6
CFTR: bomba transportadora de iones cloro
CNV: <u>C</u> opy <u>N</u> umber <u>V</u> ariation
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DANO: danofloxacina
DEPC: pirocarbonato de dietilo
DIFLO: difloxacina
DMEM: <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DORA: doramectina
EC ₉₀ : concentración de inhibidor capaz de reducir en un 90% la resistencia a un fármaco
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EMEM: <u>E</u> agle's <u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium
EQL: equol
FTC: fumitremorgina C
FVB: <u>Friend Virus, strain B</u> , cepa consanguínea de ratón
GFP: <u>G</u> reen <u>F</u> luorescence <u>P</u> rotein
HBS: tampón HEPES-NaCl
HEK: <u>Human Embrionic Kidney cells</u> , células embrionarias humanas de riñón
HPLC: cromatografía Líquida de Alta Resolución

IC₅₀: concentración a la que se consigue el 50% de la inhibición máxima

IRES: <u>Internal Ribosome Entry Site</u>

IVER: ivermectina

K_m: constante de Michaelis-Menten

Ko143:3-(6-isobutil-9-metoxi-1,4-dioxo-1,2,3,4,6,7,12,12^a-

octahidropirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indol-3-yl)-ácido propiónico éster ter-buril

LB: medio LB (Luria-Bertani)

LLC-PK1: línea celular porcina derivada del túbulo proximal del riñón

MCF-7/AdrVp3000: línea celular resistente a fármacos seleccionada a partir de la línea parental MCF-7, *Michigan Cancer Foundation* -7, (línea celular humana aislada de cáncer de mama)

MCS: sitio de clonación múltiple

MDCK: <u>Madin-Darby Canine Kidney Cells</u>, línea celular derivada de riñón de perro.

MDR: <u>Multid</u>rug <u>Resistance</u>, Multirresistencia a fármacos

MEF3.8: fibroblastos embrionarios de ratón

MF: mediana de las unidades de fluorescencia

mRNA: RNA mensajero

MRPs: Multidrug Resistance Protein, Proteínas asociadas a la resistencia de fármacos

MSD: <u>Membrane</u> <u>Spanning</u> <u>Domain</u>, Regiones transmembrana

MTT: bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MXR: mitoxantrona

NBD: <u>Nucleotide Binding Domain</u>, región de unión de nucleótidos

p: probabilidad

Papp: coeficiente de Permeabilidad Aparente

Pb: Pares de Bases

PBS: búfer fosfato salino

PhIP: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridina

P-gp: Glicoproteína P

SAP: <u>Shrimp Alkaline Phosphatase</u>

SBFF1: Scottish Black Face Fibroblast, fibroblastos fetales ovinos

SDS: dodecilsulfato sódico

Sf9: células procedentes del insecto Spodoptera frugiperda

SMX: sulfametoxazol

SNC: sistema nervioso central

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TAE: tampón TAE (tris, acetato y EDTA)

TE: tampón TE (tris, EDTA)

TKIs: inhibidores de tirosina quinasa

TM: región transmembrana

TMS: tilmicosin

TPT: topotecan

TRIS-HCl: 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol hydrochloride

UI: unidades internacionales

V_{max}: velocidad máxima

1. INTRODUCCIÓN

La familia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) está presente en la mayoría de organismos y estas proteínas poseen una estructura altamente conservada que sugiere un papel importante en la función celular. La relevancia farmacológica de este importante grupo de transportadores, cuya función es expulsar sus sustratos fuera de las células, se debe a que son responsables de la multirresistencia frente a compuestos antitumorales debilitando su acción quimioterapeútica en las células (Noguchi y cols., 2009). Por otra parte, ejercen una función protectora al limitar el transporte de diversos compuestos a través de las barreras existentes entre la circulación sistémica y diversos órganos (Sarkadi y cols., 2006). ABCG2/BCRP pertenece a esta familia de transportadores y tiene un papel clave en la protección de tejidos frente a xenobióticos siendo el principal mecanismo implicado en la aparición de residuos de fármacos y xenotoxinas en la leche (Vlaming y cols., 2009).

Si consideramos el ámbito terapéutico, la función de los transportadores ABC tiene consecuencias directas en la biodisponibilidad de fármacos (incluyendo la excreción a leche), distribución tisular y principalmente afecta a la eficacia de la acción farmacológica. La modulación de los transportadores relacionada con la acción inhibitoria de diversos compuestos cobra una importancia creciente en el ámbito terapéutico y en el manejo de la multirresistencia. Por otra parte, la propia fisiología de los organismos puede verse afectada cuando los sustratos son vitaminas o compuestos endógenos.

El conocimiento de factores que pueden afectar a la función de los transportadores es especialmente relevante. Este conjunto de factores es muy diverso y objeto de un amplio campo de investigación que no sólo se restringe a los agentes farmacológicos que actúan como moduladores, sino también a factores presentes en la dieta que pueden afectar a la expresión y función de ABCG2.

La influencia de las variaciones entre géneros, especies o individuos sobre todo asociadas a la existencia de polimorfismos centra el interés de la presente investigación. Los cambios en un único aminoácido debidos a polimorfismos como las diferencias entre los homólogos de diferentes especies pueden afectar de forma relevante tanto a la actividad como a la especifidad del transportador. Además, las variaciones interespecíficas en el caso de las propiedades inhibitorias de diversos compuestos, pueden tener implicaciones tanto para los modelos *in vitro* como *in vivo*, especialmente en el caso del ratón, ya que es el modelo más frecuentemente utilizado en el estudio de interacciones farmacológicas de este transportador, para su extrapolación a otras especies.

Así, el objetivo de la presente memoria es profundizar en las diferencias interespecíficas y polimórficas del transportador ABCG2 mediante la utilización de modelos celulares previamente establecidos o generados en el transcurso de este trabajo. La comparación funcional entre Abcg2 murina y ABCG2 humana como modelos iniciales para el estudio de interacciones con el transportador, nos ha permitido la identificación de diferentes fluoroquinolonas como nuevos sustratos y el análisis de las diferencias en la capacidad inhibitoria del inhibidor fumitremorgina C. En el caso de la comparación entre ABCG2 de rumiantes y sus variantes, ha sido necesaria la clonación de ABCG2 ovino y la generación y validación de diferentes modelos celulares, que nos han permitido realizar el estudio comparado funcional con la identificación de diferentes sustratos e inhibidores.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. TRANSPORTADORES ABC

El término de transportadores ABC fue introducido por primera vez por Chris Higgins (1992) y hace referencia a la principal característica de esta superfamilia: la presencia del sitio de unión a ATP (ATP-Binding Cassette). Sin embargo, la primera evidencia directa de transporte activo relacionado con resistencia a fármacos fue ya descrita en los años 70 por Dano (1973), quien observó un flujo de salida de daunomicina mediado por transportadores en contra de un gradiente electroquímico en células resistentes. La identificación de esta gran familia de proteínas en todos los seres vivos analizados hasta la fecha, desde microorganismos hasta humanos, así como el hecho de poseer una estructura y función altamente conservadas, sugiere que poseen un papel importante en la función celular. Muchos de estos transportadores poseen un papel protector, ya que limitan el transporte de fármacos y compuestos tóxicos a través de las barreras existentes entre la circulación sistémica y diversos órganos, tales como cerebro, tracto gastrointestinal y placenta. Además, también tienen otras muchas funciones fisiológicas como el transporte de lípidos, sales biliares, colesterol, hormonas, esteroides y metabolitos (revisado por Fukuda y Schuetz, 2012). Este transporte de compuestos se produce en contra de un gradiente de concentración siendo dependiente de ATP, e independiente tanto de un potencial electroquímico transmembrana como de un gradiente de protones.

Todos transportadores ABC comparten básica los una estructura independientemente de que su función sea importar o exportar el compuesto transportado. Esta estructura básica puede estar presente en una única proteína de una cadena polipeptídica (full-transporters), o en dos proteínas separadas (halftransporters). Así, están compuestos de uno o dos dominios transmembrana (Transmembrane domain, TMDs) y de uno o dos dominios de unión a ATP (Nucleotide Binding Domain, NBDs) (Figura 1). Las regiones TMD participan en la estructura del canal de transporte y están formadas por proteínas plegadas en hélice alfa que atraviesan varias veces la membrana plasmática, presentando una alta variabilidad estructural dependiendo del tipo de transportador ABC. El número de hélices transmembrana oscila entre 8 y 20 para los transportadores cuya función es importar y 12 para los exportadores. En cambio, las regiones NBD están altamente conservadas en toda la

familia de proteínas ABC y presentan los motivos característicos *Walker A y B* y el motivo *signature* (Figura 1B). Estas regiones se encargan de participar en la unión e hidrólisis de ATP para la obtención de energía. Esta unión ocasiona cambios conformacionales en los dominios NBDs haciendo que se aproximen y, a su vez, provocando que los dominios TMDs abran el conducto hacia la parte exterior o interior de la célula (revisado por Moussatova y cols., 2008).



Figura 1. Estructura general de los transportadores ABC. A) Representación esquemática de un transportador ABC: 2 dominios transmembrana (verde) y dos dominios de unión a ATP (azul). Algunos transportadores reciben el sustrato (rojo) desde la bicapa lipídica y otros desde la fase acuosa. Existen proteínas (amarillo) capaces de dirigir el sustrato hacia el transportador ABC (Moussatova y cols., 2008). B) Estructura de un *full-transporter* y de un *half-transporter* de la familia ABC (Fukuda y cols, 2012).

La secuenciación del genoma humano ha permitido caracterizar, hasta el momento, 49 genes ABC (<u>http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm</u>), 16 de los cuales tienen una función conocida y 14 están asociados con enfermedades genéticas (Stefkova y cols., 2004). Un ejemplo sería el **síndrome Dubin-Johnson**, caracterizado por ser una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que causa hiperbilirrubinemia crónica, un

deterioro en la secreción de conjugados aniónicos desde los hepatocitos hacia la bilis y la aparición de pigmentos en el hígado, todo ello relacionado con una pérdida de la funcionalidad del transportador ABCC2 en las membranas de los canalículos biliares (Chen y Tiwari, 2011). Otro ejemplo de enfermedad genética asociada a los transportadores ABC sería la **fibrosis quística**, una patología que afecta al transportador CFTR (Bomba transportadora de iones cloro), codificado por el gen ABCC7. CFTR es una bomba transportadora de iones cloro, que se localiza en células del pulmón, hepatocitos y colangiocitos. Como consecuencia de la alteración en el transportador, tiene lugar una acumulación anormal de moco en pulmones, páncreas e intestino que da lugar a infecciones en dichos órganos (Kim Chiaw y cols., 2011).

Se ha observado, también, que los transportadores ABC están implicados en la patogenia y tratamiento de numerosas enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central (SNC) como por ejemplo la epilepsia, el cáncer cerebral y el Alzheimer (Hartz y Bauer, 2011). Un punto clave en la enfermedad de **Alzheimer** es la acumulación de un péptido β -amiloide en el cerebro, posiblemente debida a una disminución en la eliminación de dicho péptido en la que participarían varios transportadores ABC (Wolf y cols., 2012).

Además, se conocen varias enfermedades asociadas a la pérdida de funcionalidad de algunos transportadores ABC que desempeñan un papel clave en el paso de lípidos a través de las membranas. Tal es el caso de la **sitosterolemia**, causada por una mutación en ABCG5 o ABCG8 produciendo pérdida de función del transportador y caracterizada por la hiperabsorción de esteroles de la dieta y, por tanto, responsable de la hipercolesterolemia en los individuos que la padecen (Woodward y cols., 2011).

2.1.1. PRINCIPALES MIEMBROS DE LA FAMILIA

El primer miembro de esta superfamilia fue identificado en 1976 por el grupo de Ling y se describió como una glicoproteína de membrana de 170kDa que se sobreexpresaba en células resistentes a la colchicina y se denominó glicoproteína P (**Pgp**). Está codificada por el gen ABCB1 (MDR1 en humanos; mdr1a y mdr1b en roedores). Consta de 1280 aminoácidos, con 12 segmentos transmembrana distribuidos en dos mitades homólogas, cada una de las cuales contiene 6 segmentos transmembrana que están unidos por un gran lazo citoplasmático; además presenta dos sitios de unión para el ATP y se caracteriza porque el primer lazo extracelular está altamente glicosilado (Figura 2). Es el transportador más ampliamente estudiado y se conocen numerosos sustratos entre los que podemos citar agentes quimioterapéuticos como antraciclinas, vinca alcaloides y taxanos; inhibidores de tirosina quinasas como imatinib, nilotinib y dasatinib; inhibidores de proteasas del HIV e inhibidores del HMG-CoA. La proteína se localiza en la membrana plasmática, específicamente en la porción apical/luminal de las células epiteliales pertenecientes al borde en cepillo del intestino, en la membrana de los canalículos biliares del hepatocito, la membrana luminal de las células epiteliales del túbulo proximal del riñón y en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica; además, se ha localizado en ovario, placenta, testículo, células de la médula espinal, etc (Cascorbi, 2006; Cui y cols., 2009). Este transportador desempeña un papel importante en la protección de tejidos frente a compuestos tóxicos y metabolitos (Glavinas y cols., 2004). Además, ensavos con ratones Mdr1a/b^{-/-} han demostrado que participa en el transporte de ivermectina, digoxina, saquinavir y paclitaxel, entre otros compuestos (revisado por Schinkel y Jonker, 2003).



Figura 2. Estructura general de la familia de transportadores ABC. Se muestran 4 tipos en los que se incluyen: **A**. P-gp y ABCG2 (Ford y cols., 2004) y **B**. MRP1-9 (Deeley y cols., 2006). La orientación intracelular y extracelular indicada para la P-gp es válida para el resto de los transportadores. NBD, *Nucleotide Binding Domain;* región de unión de nucleótidos. MSD, *Membrane Spanning Domain;* regiones transmembrana. ψ Sitio de glicosilación.

Algunos años después de la caracterización inicial del transportador P-gp, se identificó un nuevo miembro de esta superfamilia en los laboratorios de Cole (1992) y se le denominó ABCC1 o MRP1 (*Multidrug Resistence Protein 1*).

En relación a los MRPs, puede decirse que es una familia formada por varias proteínas de estructura similar con dos o tres dominios transmembrana (Figura 2). MRP1 se identificó al encontrarse sobreexpresado en la línea celular H69AR, que son células cancerígenas humanas de pulmón seleccionadas con doxorrubicina (Cole y cols., 1992). Este transportador, cuya localización es preferentemente basolateral, desempeña una función muy importante en la disponibilidad de fármacos y xenobióticos en las células y ejerce un papel protector frente a sustancias citotóxicas que se encuentra justificado por su distribución en regiones como la barrera hemato-encefálica y hematotesticular (Leslie y cols., 2005). Un ejemplo de la acción protectora de MRP1 se observa en los ratones Mrp1^{-/-} que, aunque son viables y fértiles, reflejan una mayor quimiosensibilidad en ciertos tejidos como por ejemplo los conductos seminíferos, el intestino, la mucosa orofaríngea y el plexo coroideo (revisado por Chen y Tiwari, 2011). MRP1 es un transportador muy versátil, capaz de transportar aniones orgánicos conjugados con glucurónido y sulfato. Además, algunos de estos conjugados son metabolitos endógenos (estradiol, glucurónido, estrona sulfato), mientras que otros son conjugados de xenotoxinas como el conjugado glucuronado del carcinógeno específico del tabaco (4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol) (Leslie y cols., 2001).

MRP2 (ABCC2) es un transportador de aniones orgánicos que se localiza en la membrana canalicular de los hepatocitos, en las membranas apicales del epitelio intestinal y renal, así como en la membrana amniótica. Participa en el transporte de bilirrubina y otros aniones orgánicos, y en la detoxificación de muchos compuestos endógenos y xenobióticos (Aye y cols., 2007). También se ha asociado este transportador con la resistencia a fármacos en células tumorales transportando los antitumorales etopósido, doxorrubicina, vincristina y metotrexato (Guminski y cols., 2006; Materna y cols., 2006).

MRP3 (ABCC3) comparte el mayor porcentaje de homología con MRP1, el 58% de los aminoácidos. Se expresa mayoritariamente en las glándulas adrenales, riñón, intestino delgado, colon, páncreas y vesícula biliar y, en menor medida, en los

11

pulmones, médula espinal, estómago y amígdalas (Borst y cols., 2006). En células epiteliales polarizadas se localiza en la membrana basolateral (Borst y cols., 2007). Este transportador posee un papel protector y contribuye en la secreción de aniones orgánicos tóxicos. Además, la alta afinidad de MRP3 por derivados glucuronados junto con su presencia en tejidos con alta capacidad de conjugación como el intestino, el hígado y los riñones, sugieren un importante papel del transportador en la eliminación de xenobióticos y residuos metabólicos tras su conjugación con ácido glucurónico (Tukey y Strassburg, 2000). Así, se ha observado transporte mediado por MRP3 de conjugados glucurónidos de paracetamol (Manautou y cols., 2005) y morfina (Zelcer y cols., 2005).

MRP4 (ABCC4) fue descrito inicialmente como transportador de 9-(2fosfonilmetoxietil) adenina, un nucleósido monofosfato que actúa como agente antiviral (Schuetz y cols., 1999). Este transportador comparte un 41% de homología con MRP1 y aparece en la mayoría de localizaciones tisulares con una baja expresión, con excepción de la próstata (Russel y cols., 2008). Podemos localizarlo tanto en la membrana basolateral como apical en células epiteliales, dependiendo del tejido. Por ejemplo, en células prostáticas tubuloacinares y hepatocitos, el transportador se localiza en la membrana basolateral, sin embargo, en las células del túbulo proximal del riñón, MRP4 se localiza en la membrana apical (Nies y cols., 2004). Este transportador participa en el transporte de conjugados esteroideos y prostaglandinas, aunque su importancia fisiológica no se ha determinado todavía. Entre otros sustratos descritos para este transportador podemos destacar anticancerígenos como topotecan, irinotecan o vincristina y antivirales como abacavir o ganciclovir (Borst y cols., 2007).

MRP5 (ABCC5) comparte solamente un 38% de semejanza homología con MRP1. Se encuentra poco expresado en la mayoría de los tejidos, exceptuando músculo esquelético, corazón, cerebro y córnea (Calatozzolo y cols., 2005). En células epiteliales, se localiza preferencialmente en la membrana basolateral (Nies y cols., 2004). Estudios *in vitro* han revelado que MRP5 confiere resistencia frente a varios agentes antitumorales como daunomicina y cisplatino, análogos de purinas (como 6mercaptopurina y 6-tioguanina), análogos de pirimidinas (como gencitabina, citosina arabinósido y 5-fluorouracilo) y antifolatos (como metotrexato); en cambio, no confiere resistencia frente a los vinca alcaloides como vincristina (Wielinga y cols., 2005; Borst y cols., 2007).

En cuanto al *half-transporter* **ABCG2** (Figura 2), es importante destacar que participa en la defensa frente a la acumulación de compuestos tóxicos y metabolitos en el organismo y está implicado en el fenómeno de multirresistencia a fármacos (revisado por Polgar y cols., 2008). Sus características serán tratadas más ampliamente en los epígrafes siguientes.

Los genes para **ABCG5** y **ABCG8** están localizados de forma adyacente en el cromosoma 2p21 y fueron identificados en ensayos realizados con el fin de encontrar las causas genéticas de la sitosterolemia, enfermedad autosómica recesiva del metabolismo lipídico (Berge y cols., 2000). Ambos transportadores se encuentran en la membrana apical de hepatocitos y enterocitos, así como en el interior de las células de la mucosa en la vesícula biliar (Klett y cols., 2004). Estos transportadores participan en la excreción de esteroles vegetales y colesterol hacia la bilis (Graf y cols., 2003).

2.2. BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN (BCRP/ABCG2)

El gen que codifica el transportador ABCG2 humano fue clonado por tres grupos de forma independiente. Así, Doyle y cols. (1998) aislaron el gen a partir de una sublínea celular humana de cáncer de mama (MCF-7/AdrVp3000), seleccionada por su resistencia a antraciclinas y doxorrubicina en presencia de verapamilo; debido a esta característica le dieron el nombre de Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). En el mismo año, Allikmets y cols. (1998) clonaron el transportador al identificar una secuencia con una elevada expresión en la placenta; por ello el nombre que le asignaron fue ABCP (transportador ABC en placenta). Un año más tarde, Miyake y cols. (1999) clonaron el mismo gen partiendo de una línea celular humana de carcinoma de colon resistente a la mitoxantrona (MXR). Con todo esto y dado que BCRP/MXR/ABCP es el segundo miembro de la subfamilia G de transportadores ABC, el Human Gene Nomenclature Committee propuso el nombre ABCG2. El gen ABCG2 humano se localiza en el cromosoma 4q22, tiene 66 Kb y consta de 16 exones (Figura 3).



Figura 3. Estructura del gen ABCG2 humano y de la proteína derivada mostrándose algunos de los polimorfismos descritos en humana (Staud y Pavek, 2005). NBD: *Nucleotide Binding Domain*, región de unión de nucleótidos; TM: *Transmembrane regions*, regiones transmembrana.

2.2.1. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA Y CONFIGURACIÓN FUNCIONAL

El transportador ABCG2 humano consta de 655 aminoácidos y posee 6 hélices transmembrana (residuos 397 a 655) y un sitio de unión a ATP (residuos 1 a 396). Como ya se ha mencionado con anterioridad en la presente memoria, ABCG2 es un *half-transporter* y requiere una homodimerización para ser funcional, confirmado mediante ensayos en oocitos de *Xenopus laevis* (Nakanishi y cols., 2003). Estudios bioquímicos posteriores han permitido observar ABCG2 en forma de homotetrámero que actuaría como modulador de la forma ABCG2 homodímera (Xu y cols., 2004). Se ha postulado que la formación de puentes disulfuro, especialmente en la cisteína 603, tiene un importante papel en la generación de dímeros/multímeros (Kage y cols., 2005). Sin embargo, recientes estudios de resonancia con fluorescencia en células han demostrado que la cisteína 603 no es esencial para la formación de dímeros/multímeros; además otros residuos como la cisteína 592 o la cisteína 608, también implicados en la formación de puentes disulfuro, podrían participar en la formación de los oligómeros (Ni y cols., 2010b).

Se han realizado varios estudios con el fin de conocer la topología de ABCG2 en la membrana plasmática (Xu y cols., 2004; Wang y cols., 2008a; Rosenberg y cols., 2010). Por ejemplo, se han insertado 20 hemaglutininas en distintos puntos de ABCG2 y se han expresado las diferentes variantes obtenidas de forma transitoria en células HEK (Wang y cols., 2008a). La polaridad de los insertos con respecto a la membrana plasmática se determinó mediante inmunofluorescencia en presencia o ausencia de detergentes permeabilizadores de la membrana. El estudio confirmó la existencia de 6 hélices transmembrana (Figura 4), aunque no todos los resultados estuvieron de acuerdo con los modelos informáticos predichos; solamente coincidieron las regiones transmembrana 1, 3, 4 y 6. Según este modelo, se confirmarían las posiciones de varios residuos predichas mediante otros métodos bioquímicos. Así, el residuo 590 de aspartato, sitio de N-glicosilación de ABCG2, se encontraría en la región extracelular que conecta el dominio transmembrana 5 con el 6. El residuo 603 de cisteína, responsable de la formación de puentes disulfuro, se encontraría en la misma región que el residuo anterior. El residuo 482 de arginina, crucial en la especificidad de sustratos y en el transporte de ABCG2, se situaría en la región transmembrana 3, próximo a la interfase entre el citosol y la membrana plasmática.



Figura 4. Conformación de ABCG2 en la membrana plasmática. Se observa el sitio de unión a ATP y el dominio transmembrana formado por 6 regiones (Ni y cols., 2010a).

Se ha logrado obtener un alto nivel de expresión de ABCG2 con *tags* de histidina en células de insecto (Pozza y cols., 2009) y en la levadura *Pichia pastoris* (Mao y cols., 2004), facilitando así la purificación del transportador mediante cromatografía de afinidad para estudios estructurales. ABCG2 purificada mediante distintas soluciones con detergentes es capaz de unirse a determinados compuestos y de hidrolizar el ATP, además de permitir su estudio mediante microscopía electrónica y cristalografía bidimensional, observándose cambios conformacionales en el transportador en presencia de mitoxantrona (McDevitt y cols., 2006; Pozza y cols., 2006; Rosenberg y cols., 2010).

2.2.2. DISTRIBUCIÓN TISULAR Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA

La mayoría de los autores coinciden en la función protectora de ABCG2 frente a sustancias tóxicas (revisado por Robey y cols., 2009) debido a que ABCG2 se expresa mayoritariamente en la membrana apical tanto de células secretoras (como en la zona reticular de la glándula adrenal, células de Sertoli/Leydig de los testículos o sincitiotrofoblastos en la placenta) como de células de órganos clave para la biodisponibilidad de fármacos como el intestino y el hígado. Otros tejidos donde se expresa el transportador son el tejido hematopoyético, la barrera hematoencefálica, los testículos y la glándula mamaria (Figura 5). De todos los tejidos donde podemos encontrar ABCG2, la máxima expresión se encuentra en la placenta (Doyle y Ross, 2003) y también está presente en las células SP (*side population*) que es una subpoblación de las células *stem* hematopoyéticas, aunque se ha observado una disminución significativa en la población de células SP.

En cuanto a su implicación en procesos de oxido-reducción (REDOX), es conocido que en condiciones fisiológicas normales existe un equilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes, sin embargo, si se produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), el estrés oxidativo causado puede originar múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer. ABCG2 se encuentra sobreexpresado en cánceres como la leucemia siendo responsable de la baja respuesta frente a agentes quimioterapéuticos. Además podría estar implicado en fenómenos directamente

16

relacionados con el estrés oxidativo, ya que contiene 11 residuos de cisteína sensibles a alteraciones REDOX. Dichos procesos, en ocasiones asociados a tratamientos farmacológicos, ocasionan cambios conformacionales en el transportador, modificaciones de la biosíntesis de cofactores necesarios para su funcionamiento, cambios en la expresión del transportador a niveles transcripcionales, post-transcripcionales, epigenéticos y amplificación de las copias de los genes que codifican para el transportador. Así, se ha sugerido que ABCG2 podría ejercer como mecanismo compensatorio ante el incremento de productos asociados al estrés oxidativo (revisado por Kuo, 2009).



Figura 5. Órganos en los que se localiza el transportador ABCG2. Las flechas pequeñas indican la dirección del transporte mediado por ABCG2 en cada órgano. Las flechas grandes indican la excreción neta en el organismo de los sustratos de ABCG2. La expresión en células endoteliales, capilares y venas en los distintos tejidos no aparece indicada (Vlaming y cols., 2009).

En el **riñón**, podemos localizar ABCG2 en el túbulo distal (Fetsch y cols., 2006) y, estudios posteriores, han detectado expresión en el borde en cepillo de las células

epiteliales renales del túbulo proximal (Huls y cols., 2008), lo que sugiere una posible participación de ABCG2 en la excreción renal de compuestos. La función renal de ABCG2 se confirma al observarse una disminución en la excreción renal de 6-hidroxi-5,7-dimetil-2-metilamino-4-(3-piridilmetil) sulfato de benzotiazol y de sulfato de edaravon en ratones Abcg2^{-/-} en comparación con ratones de tipo *wild-type* (Mizuno y cols., 2004). Además, experimentos en células LLC-PK1, una línea celular de los túbulos proximales de cerdo, revelaron que ABCG2 participa en la secreción apical de urato en las células del túbulo proximal del riñón (Woodward y cols., 2011).

Se ha descrito la expresión de ABCG2 en hígado, en la membrana canalicular de los hepatocitos (Fetsch y cols., 2006), en los conductos y conductillos biliares y los vasos sanguíneos del endotelio hepático (Vander Borght y cols., 2006) y en la membrana luminal de las células epiteliales de la vesícula biliar (Aust y cols., 2004). En hepatocitos humanos, ABCG2 se expresa en la membrana apical (Ieiri y cols., 2009) y está orientada para intervenir en el transporte hacia el canalículo biliar. Así, se ha observado que la excreción biliar del antibiótico nitrofurantoína fue casi indetectable en los ratones Abcg2^{-/-} en comparación con animales *wild-type* (Merino y cols., 2005b) demostrando el papel del transportador en la excreción biliar de compuestos. Este modelo también ha servido para demostrar en ratones una mayor actividad del transportador en la secreción biliar en el caso de animales macho (Merino y cols., 2005c). El papel de ABCG2 en el transporte biliar también se confirmó para los antibióticos fluoroquinolónicos ciprofloxacina, grepafloxacina, ofloxacina, ulifloxacin en un modelo murino (Ando y cols., 2007), así como su relación con el transporte biliar de 4-sulfato metilumbeliferil, observado en un modelo de rata (Zamek-Gliszczynski y cols., 2006). Además, Blazquez y cols. (2012) han observado transporte de ácidos biliares mediado por ABCG2, en ausencia del principal transportador ABCB11, en los hepatocitos.

En cuanto al **sistema gastrointestinal**, estudios iniciales sobre la expresión de ABCG2 revelaron altos niveles del transportador en el intestino. Una evaluación más específica de la expresión de ABCG2 a lo largo del tracto gastrointestinal humano mostró que los niveles de ABCG2 fueron más altos en el duodeno, disminuyendo progresivamente a lo largo del tracto gastrointestinal desde el íleon terminal, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoide hasta el recto, donde

18

se detectaron los niveles más bajos de ABCG2 (Gutmann y cols., 2005). La expresión de ABCG2 en el tracto gastrointestinal sugiere que desempeña un papel limitando la absorción de los sustratos. Jonker y cols. (2000) confirmaron esta función, al detectar niveles plasmáticos de topotecan, 6 veces mayores en ratones Abcg2^{-/-} tras su administración oral. Se ha demostrado también un aumento de la absorción intestinal de antibióticos (Merino y cols., 2006), flavonoides como la quercetina (Sesink y cols., 2005), antiinflamatorios como la sulfasalazina (Zaher y cols., 2006) y de compuestos carcinógenos como la aflatoxina B1 y la toxina 2-amino-1-metil-6 phenylimidazo [4,5-b] piridina (PhIP) (van Herwaarden y cols., 2006) en ratones Abcg2^{-/-} en comparación con ratones *wild-type*, proporcionando una sólida evidencia para justificar el papel de ABCG2 en la absorción de fármacos y otros compuestos tras su administración por vía oral.

ABCG2, junto con la P-gp, desempeña un papel importante a nivel de **la barrera hematoencefálica**, limitando el paso de sustancias tóxicas hacia el sistema nervioso. Cooray y cols. (2002) confirmaron la localización de ABCG2 en el endotelio de la barrera hematoencefálica en humanos, y Hori y cols. (2004) llegaron a la misma conclusión en cerebro de rata. En ratones, la inhibición conjunta de ambos transportadores produce un aumento en la entrada de imatinib, que es un inhibidor de tirosina quinasas, hacia el sistema nervioso (Breedveld y cols., 2005), un descubrimiento que se confirmó más tarde empleando ratones *knock-out* para ambos transportadores (Oostendorp y cols., 2009b); esta conducta se repite en otros compuestos de la misma familia como sorafenib (Lagas y cols., 2010) y sunitinib (Tang y cols., 2012). Uno de los mayores efectos observados de ABCG2 se encuentra recogido en el trabajo de Enokizono y cols. (2007), donde describen un aumento de 9,2 veces en la entrada del flavonoide genisteina en el cerebro en ratones Abcg2^{-/-} en comparación con ratones *wild-type*.

La expresión del transportador en la **barrera hematotesticular** (Figura 6) es otro ejemplo más de su papel protector, ya que actúa frente a mutágenos genotóxicos que pueden afectar a las células germinales. De hecho, se han detectado altos niveles de ABCG2 en las células intersticiales del testículo, así como en las células de Sertoli y de Leydig (Fetsch y cols., 2006), en células mioides y en las células endoteliales de la pared luminal del testículo (Bart y cols., 2004). Enokizono y cols. (2008) observaron

que el ratio testículo/plasma de los sustratos PhIP, N-hidroxilo PhIP, MeIQx, dantroleno, y prazosin fue más alto en ratones para Abcg2^{-/-} en comparación con ratones *wild-type*, lo que confirma el papel protector de la expresión de ABCG2 en el testículo.



Figura 6. Representación esquemática de la localización de los transportadores ABC en el testículo, el túbulo seminífero y los capilares sanguíneos testiculares (Vlaming y cols., 2009).

Al igual que otros transportadores ABC (como P-gp, MRP1-3 y 5), ABCG2 también se expresa en la **placenta**, donde es el transportador con mayor expresión en humanos. Está localizado en la membrana plasmática de los sincitiotrofoblastos (Figura 7), limitando la exposición del feto a toxinas, fármacos y xenobióticos y ejerciendo, por tanto, un papel protector al expulsar los fármacos y toxinas hacia el torrente sanguíneo de la madre. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que ABCG2 interviene en el transporte del antitumoral mitoxantrona (Kolwankar y cols., 2005) y del antidiabético glibenclamida (Gedeon y cols, 2008) en vesículas de membrana preparadas a partir de placenta humana, así como en el transporte de mitoxantrona y Hoechst 33342 en

vesículas de membrana aisladas de las células de placenta BeWo (Ceckova y cols., 2006) o en trofoblastos placentarios primarios humanos (Evseenko y cols., 2006). En estudios ex vivo, ABCG2 humana y de rata han demostrado disminuir significativamente el transporte materno-fetal de PhIP (Myllynen y cols., 2008), glibenclamida (Pollex y cols., 2008), y cimetidina (Staud y Pavek, 2005). En ratones gestantes Mdr1a/b^{-/-}, la coadministración del inhibidor de Abcg2 GF120918 causó un aumento significativo en la concentración fetal de topotecan (Jonker y cols., 2000). Además, se examinó el papel de Abcg2 en la exposición fetal de nitrofurantoína en ratones gestantes, sugiriendo claramente que Abcg2 limita significativamente la distribución de nitrofurantoína al feto (Zhang y cols., 2007). También se observó que los niveles fetales de glibenclamida en los ratones Abcg2^{-/-} en gestación era dos veces mayor que en el caso de ratones wild-type (Zhou y cols., 2008). Estos estudios respaldan el papel de ABCG2/Abcg2 en la limitación de la exposición fetal a fármacos exógenos y xenobióticos. Además de esta función protectora del transportador, se han descrito otros papeles de ABCG2 en la placenta. ABCG2 podría estar involucrado en la regulación de la síntesis de estrógeno placentario modificando las concentraciones de dehidroepiandrosterona sulfato y 3-sulfato de estrona en la placenta (Grube y cols., 2007). Recientemente, se ha observado que ABCG2 transporta activamente esfingosina-1-fosfato, interviniendo por tanto en la diferenciación de los citotrofoblastos a sincitiotrofoblastos (Takabe y cols., 2010). Además, también se ha demostrado una reducción significativa del trasporte de ácidos biliares a través de la placenta de ratas al inhibir ABCG2 con fumitremorgina C, así como en ratones Abcg2-^{/-} en gestación (Blazquez y cols., 2012). Además, los cambios drásticos de hormonas que se producen durante el embarazo pueden afectar a la expresión de ABCG2 en la placenta. Así, se ha observado que la progesterona, el estradiol, el lactógeno placentario y la prolactina humana estimulan la expresión del transportador en células BeWo (Wang y cols., 2008b; Wang y cols., 2008c). En ratones se ha detectado expresión de Abcg2 en el saco vitelino durante la primera etapa de la gestación (Kalabis y cols., 2007) y su papel parece ser similar al llevado a cabo en la placenta.



Figura 7. Representación esquemática de los transportadores que se expresan en la placenta humana **A**. Microestructura de la barrera placentaria. **B**. Principales transportadores y su localización. ABCG2/BCRP, *Breast Cancer Resistance Protein*; MDR, *Multidrug Resistance Protein*; MRP, *Multidrug Resistance-associated Protein*; NET, *Noradrenalin Transporter*; OAT, *Organic Anion Transporter*; OATP, *Organic Anion-Transporting Polypeptide*; OCTN, *Organic Cation Transporter*; SER, *Serotonin Transporter* (Vahakangas y Myllynen, 2009).

Cabe destacar la expresión del transportador ABCG2 en la **glándula mamaria** en lactación de distintas especies como ratones, ovejas, vacas y humanos, y su papel en la excreción de fármacos a leche (Jonker y cols., 2005; Pulido y cols., 2006). Estudios inmunohistoquímicos y por western-blot realizados en diferentes estados de desarrollo de la glándula mamaria, revelaron que Abcg2 no se expresa en ratones hembra de 8 ó 14 semanas de edad, pero durante la gestación y, especialmente en la lactación, aumenta su expresión considerablemente, disminuyendo rápidamente durante la involución de la glándula (Figura 8). En contraposición con el papel protector propuesto en la placenta, indicado anteriormente, varios estudios demostraron que ABCG2 en la glándula mamaria actúa concentrando compuestos en la leche materna. Jonker y cols. (2005) detectaron unos niveles mayores de sustratos de ABCG2 como el antitumoral topotecan, la toxina PhIP y el protector gástrico cimetidina en la leche de ratones lactantes *wild*-

type en comparación con ratones Abcg2^{-/-}. De manera similar, ABCG2 concentra otros carcinógenos de la dieta (van Herwaarden y cols., 2006), así como el antiparasitario moxidectina (Pérez y cols., 2009a) y los antibióticos nitrofurantoína, ciprofloxacina, enrofloxacina y danofloxacina en leche de ratones y ovejas (Merino y cols., 2006; Pulido y cols., 2006; Pérez y cols., 2009b; Real y cols., 2011a). Además, algunas vitaminas como la riboflavina (vitamina B₂), la biotina y la vitamina K son transportadas hacia la leche mediante ABCG2 (van Herwaarden y cols., 2007; Vlaming y cols., 2009). Adicionalmente, nuestro grupo de investigación ha demostrado en ganado ovino que la secreción en leche de algunos antibióticos se puede inhibir con la coadministración de inhibidores de ABCG2 como son algunos flavonoides o lactonas macrocíclicas (Pulido y cols., 2006; Pérez y cols., 2009b; Real y cols., 2011a).



Figura 8. Inmunolocalización del transportador ABCG2 en muestras de glándula mamaria de ratón. (a) hembra virgen de 14 semanas; (b) 5,5 días tras el coito; (c) 15,5 días tras el coito; (d) control negativo (Abcg2^{-/-}); (e) 1 semana de lactación; (f) 2 semanas de lactación; (g) 1 semana de involución; (h) 4 semanas de involución. La presencia del transportador ABCG2 se pone de manifiesto empleando estreptavidina-biotina inmunoperoxidasa (Jonker y cols., 2005).

Los trabajos de Zhou y cols. (2002) en medula ósea de ratón y, posteriormente de Scharenberg y cols. (2002) en humanos permitieron identificar a ABCG2 como un marcador de **células** *stem* (multipotentes) a través de la expulsión del Hoechst 33342, un colorante fluorescente, sustrato del transportador. ABCG2 se expresa en una subpoblación de las células *stem*, denominada SP (*side population cells*), presente en la mayoría de los tejidos corporales (Fatima y cols., 2012) incluyendo tejido muscular y óseo. Los ratones Abcg2^{-/-} poseen una cantidad normal de células *stem*

hematopoyéticas, aunque se ha observado una disminución significativa en la población de células SP. Esta subpoblación SP presenta características de células stem ya que pueden autorrenovarse, y diferenciarse al responder a las vías señalización propias de las células stem, además son resistentes a agentes quimioterapeúticos. Las células SP procedentes de ratones Abcg2^{-/-} son más sensibles a la mitoxantrona, que es un agente quimioterapéutico sustrato de Abcg2 (Zhou y cols., 2002). La expresión de ABCG2 parece que se correlaciona con el mantenimiento de la población en situación de pluripotencialidad, participando en la autorrenovación, así como en la regeneración de tejido dañado (Huls y cols., 2008). El factor Nrf2 que es un sensor de estrés oxidativo, es capaz de mantener el fenotipo celular SP induciendo la expresión de ABCG2 a través de ARE (elemento de respuesta antioxidante) al actuar sobre su promotor. El fenotipo SP también se ha encontrado en células stem embrionarias (ES) en las que su renovación depende de la homeostasis del hemo regulada por ABCG2. Así, el aumento de los niveles de porfirina en células ES se correlaciona negativamente con la expresión del gen Nanog, gen implicado en el mantenimiento de la pluripotencia (Susanto y cols., 2008). Se ha descrito también que la inhibición del transportador por RNAi en células tumorales, disminuye la proliferación celular (Chen y cols., 2010) y el efecto contrario, a través de la activación de la señalización del oncogén Notch implicado en el desarrollo de leucemia aumenta la expresión de ABCG2 en células SP (Bhattacharya y cols., 2007).

Por último, ABCG2 también se expresa en las **células endoteliales** de vénulas y capilares; sin embargo, es poco habitual encontrarla en el endotelio de arteriolas (Maliepaard y cols., 2001). Su presencia en el endotelio de las vénulas podría estar relacionada con el hecho de que, en condiciones de hipoxia, aumenta su expresión, lo que protege a las células y a los tejidos de la acumulación tóxica de protoporfirinas generadas en condiciones de baja tensión de oxígeno (revisado por Krishnamurthy y Schuetz, 2006).
2.2.3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE SUSTRATOS E INHIBIDORES DE ABCG2

ABCG2 es capaz de transportar un amplio espectro de compuestos, solapándose en algunos casos con sustratos de P-gp y MRP1. Fundamentalmente se trata de moléculas hidrofóbicas cargadas positiva o negativamente. Cabe destacar que la mayoría de las células que sobreexpresan ABCG2 son resistentes a agentes quimioterapéuticos como la mitoxantrona, topotecan, irinotecan, indolcarbazoles, antifolatos e inhibidores de tirosina quinasas como imatinib, gefitinib y erlotinib (Polgar y cols., 2008). Como se ha comentado a lo largo de esta revisión, otros sustratos del transportador son algunos antibióticos (nitrofurantoína, fluoroquinolonas), la vitamina B2 y la biotina, el ácido úrico y los ácidos biliares. La estructura de los compuestos va a ser determinante a la hora de ser o no transportados por ABCG2. Por ejemplo, las células que sobreexpresan ABCG2 son resistentes a 9-aminocaptotecina pero no a 9nitrocamptotecina (Rajendra y cols., 2003). Varios estudios han reflejado que el anillo de las camptotecinas, así como la alta polaridad de las moléculas, hacen que muchos de sus análogos sean sustratos de ABCG2 (Bates y cols., 2004). También se ha sugerido que la presencia de un grupo amino unido a un anillo heterocíclico, así como la fusión de anillos heterocíclicos, es determinante en la interacciones de compuestos con el transportador (Giacomini y cols., 2010). ABCG2 también interacciona con las porfirinas y análogos de porfirinas (Krishnamurthy y col., 2004) como la feoforbida A que es un metabolito clorofílico empleado como fotosensibilizador en el tratamiento de tumores y ha sido descrito como sustrato de ABCG2 (Robey y cols., 2004).

La inhibición de ABCG2 se considera como una estrategia para el tratamiento farmacológico del cáncer, ya que en algunos tumores hay una alta expresión del transportador y su inhibición permitiría la acumulación intracelular de agentes quimioterapéuticos. También se contempla la modulación de la biodisponibilidad, que modificaría la distribución tisular y, por tanto, la eficacia de sus sustratos, incluyendo los antitumorales. Por ejemplo, el empleo de curcumina, un producto natural no tóxico, como inhibidor de Abcg2 intestinal produce un aumento en la biodisponibilidad del sustrato sulfasalazina (Shukla y cols., 2009). Al igual que ABCG2 comparte sustratos con otros transportadores, algunos inhibidores de la proteína también inhiben el

transporte mediado por P-gp y MRP1, como el tariquidar (Minderman, y cols., 2004). Se han descrito varios ensayos preclínicos in vitro e in vivo en los que se emplean moduladores de los transportadores ABC para aumentar la biodisponibilidad y eficacia de fármacos como docetaxel, vinblastina, etopósido, digoxina, indinavir, saquinavir, tacrolimus, nelfinavir, talinolol, topotecan, methotrexate, irinotecan, SN-38, PhIP y erlotinib (Oostendorp y cols., 2009a). El primer inhibidor de ABCG2 descrito fue la fumitremorgina C (Rabindran y cols., 2000), una toxina aislada de Aspergillus fumigatus, su análogo Ko143, es un inhibidor de ABCG2 ampliamente utilizado en ensavos de laboratorio (Allen y cols., 2002). Además se conoce un amplio número de sustancias inhibidoras entre los que se encuentran compuestos esteroideos como corticosterona y digoxina, antivirales como el ritonavir y saquinavir, inmunosupresores como el tacrolimus y sirulimus, inhibidores de tirosina quinasa como imatinib y nilotinib, o flavonoides como naringenina, daidzeina y genisteína (revisado por Polgar y cols., 2008). En relación con la inhibición de estos compuestos, Zhang y cols. (2004) han observado que la interacción de ABCG2 con los distintos flavonoides está determinada por la presencia de un doble enlace en el anillo C, una hidroxilación en la posición 5, la ausencia de hidroxilación en la posición 3 y el residuo del anillo B en la posición 2.

Se puede establecer que a pesar de que el número de sustratos e inhibidores descritos de ABCG2 es bastante elevado, la relación entre la estructura de la proteína y las características estructurales de los compuestos necesarias para la interacción con el transportador, necesita ser estudiada en profundidad debido a su importancia terapéutica.

2.2.4. POLIMORFISMOS DE ABCG2

Podemos definir polimorfismo genético como una variación en la secuencia del DNA entre los distintos individuos de una población. Pueden existir variaciones en el número de repeticiones en tándem de una unidad o motivo nucleótido (microsatélites), variaciones en el número de copias de un fragmento genómico (*Copy Number Variation*; CNV) o variaciones puntuales en la secuencia, ya sean

inserciones/deleciones o sustituciones de una sola base nitrogenada (*Single Nucleotide Polymorphism*; SNP).

Los SNPs que afectan a la secuencia codificante de una proteína pueden modificar o no la cadena de aminoácidos de la misma. Se denominan SNPs no sinónimos a los primeros y SNP sinónimos a los segundos. También son importantes los SNPs que se encuentran en regiones no codificantes, ya que pueden tener consecuencias en el proceso de *splicing* y/o la unión de factores de transcripción.

El estudio de los SNPs resulta de gran interés para la investigación biomédica, en especial los que afectan a proteínas que participan en el metabolismo y transporte de estos fármacos. El primer polimorfismo que se describió en transportadores ABC afectó a P-gp en humanos (una sustitución de glicina por valina en el aminoácido 185), y se relacionó con niveles de expresión reducidos y consecuentemente, niveles plasmáticos de digoxina elevados (Hoffmeyer y cols., 2000).

En cuanto a ABCG2 humano se han descrito en torno a 80 variaciones naturales de la secuencia (revisado por Meyer zu Schwabedissen y Kroemer, 2011), siendo 26 de los polimorfismos no sinónimos, 5 polimorfismos sinónimos (c.114T>C, c.369C>T, c.474C>T, c.1098G>A y c.1425A>G), 3 mutaciones sin sentido (Q126X, E334X y R575X), y una mutación en el marco de lectura (c.1515delC). Entre los numerosos polimorfismos descritos (Figura 9), el cambio más conocido en líneas celulares es el de arginina por treonina o glicina en la posición 482 que modifica la especificidad de sustrato del transportador (Allen y cols., 2003). Estudios de transfección con sistemas de expresión vírica han reflejado que el transporte de rodamina 123 mediado por ABCG2 depende del aminoácido en la posición 482. La presencia de un residuo de glicina o de treonina en dicha posición permite el transporte de la rodamina 123, sin embargo si se trata de arginina no se produce transporte del compuesto (Honjo y cols., 2001). Otro ejemplo es el transporte de antraciclinas mediado por ABCG2 en presencia de glicina o treonina en la posición 482, sin embargo, estas mutaciones hacen que pierda su capacidad para transportar metotrexato (Volk y cols., 2000). Mitomo y cols. (2003) observaron que células que expresaban alguna de las variantes mutadas poseían niveles mayores de resistencia a mitoxantrona (glicina 482, 47 veces; treonina 482, 54 veces) en comparación con las células que expresaban ABCG2 wild-type (arginina 482,

15 veces). Se piensa que la carga intracelular en la posición 482 es importante para las interacciones electrostáticas con algunos sustratos en la interfase entre la membrana y el citosol. Esto demuestra que una mutación en un aminoácido puede modificar la capacidad del transportador. Hasta el momento estas mutaciones en la posición 482 no se han encontrado en la población humana; se han identificado únicamente en cultivos celulares.



Figura 9. Representación esquemática del transportador ABCG2 humano y localización de varios de sus polimorfismos no sinónimos descritos (revisado por Ishikawa y cols., 2010).

Los SNPs más frecuentes identificados en la población humana se localizan en el exón 2 (G34A dando lugar a V12M) y en el exón 5 (C421A dando lugar a Q141K). El SNP Q141K se encuentra en la población japonesa y china en una alta frecuencia (30 – 60%) y en las poblaciones caucásica, africana y americana en una baja frecuencia (5 – 10%) (Imai y cols., 2002). Varios estudios han demostrado que el SNP Q141K implica menores niveles de expresión de la proteína en comparación con ABCG2 *wild-type*, tanto en células transfectadas como en tejidos humanos (Kondo y cols., 2004). Así, individuos con la variante Q141K presentan mayores niveles en plasma de sustratos de ABCG2 en comparación con los individuos con la variante *wild-type* (Sparreboom y cols., 2005; Li y cols., 2007) y serían más susceptibles de presentar enfermedades como la diarrea derivada de tratamientos con gefitinib (Giacomini y cols., 2010). Además, la presencia de Q141K está relacionada con un aumento de los niveles de ácido úrico en plasma y, por tanto, con un mayor riesgo de padecer gota (Matsuo y cols., 2011).

Furukawa y cols. (2009) han observado que la presencia de Q141K implica un aumento en la degradación lisosomal y proteosomal en comparación con ABCG2 *wild-type*, constituyendo una posible explicación para los menores niveles de proteína en la variante mutada.

Otros dos SNPs descritos se encuentran en el exón 6 (A616C dando lugar a I206L) y en el exón 15 (A1768T dando lugar a N590Y) (Zamber y cols., 2003). Vethanayagam y cols. (2005) analizaron la expresión y la funcionalidad de estos dos SNPs, utilizando un modelo celular (células HEK); los resultados obtenidos indicaron que I206L presentaba niveles de expresión más bajos, aunque con mayor actividad, mientras que N590Y se caracterizó por niveles de expresión más elevados y menor actividad en comparación con la variante wild-type. Itoda y cols. (2003) han descrito diversos SNPs en pacientes japoneses, dos de los cuales resultaron en sustituciones de aminoácidos, T1291C (F431L) y T1465C (F489L), y un tercero en el que una glutamina en posición 126 es sustituida por un codón de terminación C376T (O126Stop). Kondo y cols. (2004) extendieron sus estudios a otros SNPs y sugirieron que G1322A (S441N) podría afectar a la expresión y a la localización celular del transportador. Algunos de estos polimorfismos, como son S441N y Q126Stop además de otros como F208S, S248P y E334Stop se caracterizan porque presentan un transporte anormal de hematoporfirinas, lo que podría relacionarse con una mayor susceptibilidad a fototoxicidad inducida por porfirinas en personas que presenten estos alelos (Tamura y cols., 2006).

Recientemente, se ha observado que ABCG2 nos proporciona una nueva clasificación de los grupos sanguíneos humanos. Así, este transportador es responsable de la presencia del antígeno Jr^a (*Junior antigen*) y se han descrito 8 mutaciones de ABCG2 relacionadas con el fenotipo $Jr^{(a-)}$ y con una mayor susceptibilidad a los sustratos del transportador (Saison y cols., 2012; Zelinski y cols., 2012).

Dentro del ámbito de la investigación de los polimorfismos de ABCG2 pero en otro contexto, se han descrito polimorfismos en especies domésticas relacionadas con aspectos relativos a la producción animal. Cohen-Zinder y cols. (2005) describieron en **rumiantes** un polimorfismo que afectaría a ABCG2, el polimorfismo no sinónimo Y581S, que se localizó en el exón 14 del gen bovino. Estos autores relacionaron el SNP

con un mayor contenido en grasa y proteínas en leche y una menor producción en vacas de raza Holstein. Estos resultados fueron confirmados más adelante en estudios realizados por Olsen y cols. (2007) en vacas Rojas Noruegas. Los efectos del SNP fueron similares en las dos poblaciones, con un aumento del 0.15% de proteína y 0.14% de grasa en vacas Rojas Noruegas y del 0,13% de proteína y 0,09% de grasa en vacas Holstein respecto a los valores correspondientes a las poblaciones que expresaban el alelo wild-type. Estudios realizados por Ron y cols. (2006) para conocer la prevalencia de cada una de las variantes, mostraron que la Y581 fue predominante en la mayoría de las razas estudiadas. La variante S581 se detectó en las razas Azul Belga, Frisona Inglesa, Roja Bohemia, Angus Alemana, Parda Alemana, Simmental Alemana, Holstein Israelí, Menorquina y Holstein Inglesa. Las razas con una frecuencia mayor del alelo S581 fueron la Holstein Israelí (20%) y la Simmental Alemana (14%). Estos mismos autores indicaron que el hecho de que este alelo sólo se detectara en animales pertenecientes a la especie Bos taurus y no en los pertenecientes a Bos indicus podría indicar que Y581 es el alelo ancestral y que la sustitución Y581S ocurrió tras la separación de los linajes de Bos indicus y Bos taurus.

Wu y cols. (2008) compararon los aminoácidos que se sitúan en posición 581 en distintas especies (Figura 10). Así, en cabra, oveja, vaca y perro aparece tirosina en posición 581; sin embargo, en cerdo, humano, mono, ratón y rata la fenilalanina ocupa esta posición.

TLLMTISFVF	MMIFSGLLVN	LKTIGAWLSW	LQYLSIPRYG	Y	AALQHNEFL GQNFCPGLNV
TLLMTISFVF	MMIFSGLLVN	LKTIGAWLSW	LQYLSIPRYG	Y	AALQHNEFL GQNFCPGLNV
TLLMTISFVF	MMIFSGLLVN	LKTVVPWLSW	LQYLSIPRYG	Y	AALQHNEFL GQNFCPGLNV
TLLMTITFVF	MMIFSGLLVN	LRTVGPWLSW	LQYLSIPRYG	Y	AALQYNEFL GQNFCPGVNV
TLLMTISFVF	MMIFSGLLVN	LKTVVPWLSW	LQYFSIPRYG	FS	ALQYNEFL GQNFCPGLNV
TLLMTICFVF	MMIFSGLLVN	LTTIASWLSW	LQYFSIPRYG	F	ALQHNEFL GQNFCPGLNA
TLLMTICFVF	MMIFSGLLVN	LTTIASWLSW	LQYFSIPRYG	FT	ALQHNEFL GQNFCPGLNA
TLLMTIAFVF	MMLFSGLLVN	I LRTIGPWLSW	LQYFSIPRYG	FT	ALQYNEFL GQEFCPGFNV
TLLMTISFVF	MMLFSGLLVN	I LRTIGPWLSW	LQYFSIPRYG	FT	ALQHNEFL GQEFCPGLNV
	TLLMTISFVF TLLMTISFVF TLLMTISFVF TLLMTISFVF TLLMTICFVF TLLMTICFVF TLLMTIAFVF TLLMTISFVF	TLLMTISFVF MMIFSGLLVN TLLMTISFVF MMIFSGLLVN TLLMTISFVF MMIFSGLLVN TLLMTITFVF MMIFSGLLVN TLLMTICFVF MMIFSGLLVN TLLMTICFVF MMIFSGLLVN TLLMTIAFVF MMLFSGLLVN	TLLMTISFVF MMIFSGLLVN LKTIGAWLSW TLLMTISFVF MMIFSGLLVN LKTIGAWLSW TLLMTISFVF MMIFSGLLVN LKTVVPWLSW TLLMTIFVF MMIFSGLLVN LKTVVPWLSW TLLMTICFVF MMIFSGLLVN LTTIASWLSW TLLMTICFVF MMIFSGLLVN LTTIASWLSW TLLMTIAFVF MMLFSGLLVN LRTIGPWLSW	TLLMTISFVFMMIFSGLLVNLKTIGAWLSWLQYLSIPRYGTLLMTISFVFMMIFSGLLVNLKTIGAWLSWLQYLSIPRYGTLLMTISFVFMMIFSGLLVNLKTVVPWLSWLQYLSIPRYGTLLMTISFVFMMIFSGLLVNLRTVGPWLSWLQYFSIPRYGTLLMTICFVFMMIFSGLLVNLTIASWLSWLQYFSIPRYGTLLMTICFVFMMIFSGLLVNLTTIASWLSWLQYFSIPRYGTLLMTICFVFMMIFSGLLVNLTTIASWLSWLQYFSIPRYGTLLMTIAFVFMMIFSGLLVNLRTIGPWLSWLQYFSIPRYGTLLMTISFVFMMLFSGLLVNLRTIGPWLSWLQYFSIPRYG	TLLMTISFVFMMIFSGLLVNLKTIGAWLSWLQYLSIPRYGY.TLLMTISFVFMMIFSGLLVNLKTIGAWLSWLQYLSIPRYGY.TLLMTISFVFMMIFSGLLVNLKTVVPWLSWLQYLSIPRYGY.TLLMTITFVFMMIFSGLLVNLRTVGPWLSWLQYFSIPRYGF.TLLMTISFVFMMIFSGLLVNLKTVVPWLSWLQYFSIPRYGF.TLLMTICFVFMMIFSGLLVNLTTIASWLSWLQYFSIPRYGF.TLLMTICFVFMMIFSGLLVNLTTIASWLSWLQYFSIPRYGF.TLLMTIAFVFMMIFSGLLVNLRTIGPWLSWLQYFSIPRYGF.TLLMTISFVFMMLFSGLLVNLRTIGPWLSWLQYFSIPRYGF.

Figura 10. Secuencia parcial de aminoácidos del transportador ABCG2 en diferentes especies y comparativa del residuo situado en posición 581 (residuos situados dentro del cuadro). En rumiantes y perros aparece una tirosina, mientras que otras especies de mamíferos presentan fenilalanina (Wu y cols., 2008).

En cuanto al efecto del SNP Y581S bovino sobre el transporte de fármacos, estudios iniciales de nuestro grupo de investigación, tras su clonación y expresión transitoria, demostraron diferencias significativas en la acumulación de mitoxantrona

entre ambas variantes (Merino y cols., 2009). Posteriormente, la generación de células MDCKII con expresión estable de ambas variantes, permitió demostrar que la variante Y581S bovina muestra un mayor transporte *in vitro* de algunas fluoroquinolonas (Real y cols., 2011b).

En cuanto a ABCG2 de oveja, Duncan y cols. (2007) secuenciaron el cDNA del transportador en oveja a partir de muestras de hígado, y hallaron dos polimorfismos sinónimos, G554A y C973T. García-Fernández y cols. (2011) han identificado nueve SNPs sinónimos de ABCG2 en ovejas Churras, tres de los cuales (localizados en el intrón 3, exón 6 y exón 9) podrían intervenir en el porcentaje de grasa de la leche.

2.2.5. ABCG2: DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS

El gen ABCG2 está altamente conservado (Tabla 1) y ha sido encontrado en todos los vertebrados secuenciados hasta el momento, incluyendo reptiles, peces y aves. En la mayoría de las especies hay presente un solo gen (Annilo y cols., 2006). La excepción son los roedores que presentan una o más copias de un gen estrechamente relacionado (*ABCG3*) y los peces que presentan tres o más genes *ABCG2* (Mickley y cols., 2001). Análisis filogenéticos revelan que las secuencias de ABCG2 en primates se encuentran agrupadas dentro del mismo clúster (Figura 11). A pesar de que ABCG2 está altamente conservado en las especies analizadas hasta el momento, podemos encontrar numerosas variaciones en la expresión, funcionalidad y especificidad del transportador (Li y cols., 2008b).

	Gen		Proteína		
Especies	GenBank accession No.	Homología (%)	GenBank accession No.	Homología (%)	
Cabra	DO904356	100	ABI73985	100	
Oveja	NM_001078657	99	NP_001072125	99	
Vaca	BT030709	97	ABS45025	96	
Perro	NM 001048021	89	NP 001041486	86	
Cerdo	NM_214010	87	NP_999175	86	
Humano	NM_004827	87	NP_004818	85	
Mono	NM_001032919	87	NP_001028091	85	
Ratón	NM_011920	81	AAH53730	80	
Rata	AB105817	78	EDL88030	79	

Tabla 1. Porcentaje de homología entre la secuencia nucleotídica y proteica de ABCG2 de cabra y otras especies de mamíferos (Wu y cols., 2008).



Figura 11. Análisis evolutivo de *ABCG2*. Las secuencias completas de *ABCG2* humano, junto con otros mamíferos, el pollo y la secuencia de *ABCG1* humano fueron alineadas para diseñar un árbol genealógico mediante el método de la Evolución Mínima (Robey y cols., 2009).

El **ratón** ha sido un modelo ampliamente utilizado en ensayos de biodisponibilidad de fármacos y concretamente en estudios preclínicos previos a la extrapolación a otras especies. El transportador Abcg2 murino consta de 657 aminoácidos y está localizado en el cromosoma 6 (Allen y Schinkel, 2002). A la hora de extrapolar a humanos los resultados obtenidos en este modelo animal hay que tener en cuenta que Abcg2 murino y ABCG2 humano comparten sólo el 81% de sus aminoácidos (Allen y cols., 1999), pudiendo existir, por tanto, diferencias tanto en la actividad como en la especificidad por los sustratos e inhibidores tal como ha sido sugerido (Merino y cols., 2006). Además, existen diferencias interespecíficas descritas en cuanto a la expresión de ABCG2 (Figura 12). Como se ha descrito en apartados anteriores de la presente memoria, en humanos, ABCG2 se expresa mayoritariamente en la placenta y, en menor medida, en cerebro, próstata, intestino delgado, testículos, ovarios, colon, hígado y riñón. Sin embargo, Abcg2 murina se expresa mayoritariamente en riñón y, de forma moderada, en hígado, colon, corazón, bazo y

placenta (Jonker y cols., 2000) (Figura 12). Todo ello implica que los resultados obtenidos en ratón para excreción renal estarían sobreestimados en comparación con lo que se produciría en humana; de igual modo, la transferencia feto-materna estaría subestimada.



Figura 12. Distribución tisular de Abcg2 murina en machos y hembras (Tanaka y cols., 2005)

Continuando con los modelos en roedores, la **rata** también es empleada en ensayos de caracterización de los transportadores ABC. Tanaka y cols. (2005) han descrito la distribución tisular del transportador ABCG2 en rata (Figura 13). Así, encontraron unos niveles altos de ABCG2 en riñón, intestino delgado e intestino grueso, unos niveles moderados en testículo y bajos niveles del transportador en otros tejidos como la placenta, hígado y cerebro. Por otra parte, Vander Borght y cols. (2006) han observado unos niveles de ABCG2 significativamente menores en hígados de rata en comparación con muestras humanas, lo cual podría implicar diferencias funcionales relacionadas con la absorción, eliminación hepática y excreción de compuestos tóxicos endógenos y exógenos.



Figura 13. Distribución tisular de ABCG2 de rata en machos y hembras (Tanaka y cols., 2005)

Al igual que en el ratón, a pesar de que se ha descrito una alta expresión de ABCG2 en la placenta humana con un posible papel protector frente a xenobióticos, los niveles del transportador en placenta de rata son bajos, lo cual sugiere que dicha función es menos importante en roedores. Sin embargo, la expresión de ABCG2 en riñón de rata y ratón es relativamente alta en comparación con humanos, lo cual sugiere un importante papel del transportador en la excreción renal de fármacos en roedores. Además, en cuanto a diferencias en la actividad, Nozaki y cols. (2007) han observado diferencias en la potencia inhibitoria de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos sobre el transporte de metotrexato comparando fragmentos de riñón humano y de rata. Por su parte, Kawase y cols. (2009), empleando sacos intestinales, observaron un aumento del transporte apical-basal de nitrofurantoina (sustrato de ABCG2) mediado por crisina en duodeno, yeyuno e íleon de rata. Sin embargo, en ratón el efecto de la crisina fue muy pequeño probablemente debido a niveles de Abcg2 inferiores en el intestino delgado. De todas formas, se ha demostrado que la crisina inhibe de manera diferencial el transporte transepitelial *in vitro* de nitrofurantoina mediado por ABCG2 humana y ABCG2 de rata (Wang y Morris, 2007). El obtener resultados comparativos entre estas especies y la humana o generar modelos celulares que permitan comparar resultados para poder extrapolarlos a futuras aplicaciones en humana sería de gran utilidad para estudios farmacocinéticos y de toxicidad de fármacos.

Mientras que la expresión de los transportadores ABC ha sido ampliamente estudiada en roedores y humanos, los estudios relativos a ABCG2 en aves son todavía escasos. Se ha descrito el transporte de rodamina 123 mediado por P-gp y por ABCG2 mediante ensayos con esplenocitos de pollo, lo cual contrasta con lo que sucede en humana donde dicho compuesto no es transportado por ABCG2 wild-type (Haritova y cols., 2006). Posteriormente, se investigó la expresión de ABCG2 en distintos tejidos de pavo. Los mayores niveles de expresión de ABCG2 se encontraron en el intestino no observándose diferencias entre el intestino grueso y delgado, como sucedía en humanos y roedores. Niveles similares de expresión se encontraron en el hígado. También se observaron niveles bastante altos de ABCG2 en riñón, pulmones, cerebro y glándulas adrenales. Además, los animales tratados con mesilato de danofloxacina experimentaron una inducción en el mRNA de ABCG2 en duodeno e hígado (Haritova y cols., 2008). A pesar de conocerse la participación de ABCG2 en el transporte de ácido úrico en humanos, no se ha observado dicho transporte en pollos donde la eliminación de ABCG2 de las células epiteliales del túbulo proximal no modificó el transporte de este compuesto, quedando como máximo responsable MRP4 (Bataille y cols., 2011).

En gato, la secuencia completa del gen *ABCG2* está constituida por 1965 pares de bases (pb), formando 16 exones. La comparación con las secuencias de *ABCG2* humano, murino y canino muestra homologías del 90, 83 y 94% respectivamente. A nivel de aminoácidos, ABCG2 felina posee una homología con las especies anteriores del 86, 81 y 90% respectivamente. Aunque no se ha descrito ninguna mutación por deleción o inserción en el cDNA de ABCG2 felino, se han identificado cuatro cambios de aminoácidos (E159M, S279L, H283Q y T644I). Comparando con otras 10 especies de mamíferos en regiones conservadas, tanto E159M como H283Q consisten en un cambio de aminoácido polar (ácido glutámico e histidina) por uno apolar (metionina y glutamina), mientras que T644I se trata de un cambio de aminoácido polar cargado positivamente (treonina) por un aminoácido polar cargado negativamente (isoleucina). El aminoácido en la posición 279 es serina (aminoácido polar) en humanos, chimpancés, macacos, caballo, ratón, rata y perro; aspartato (aminoácido polar cargado negativamente) en oveja y cabra; alanina (aminoácido apolar) en vaca y leucina

(aminoácido apolar) en gato. La presencia de estos cambios de aminoácido en ABCG2 felina hacen que dicho transportador sea menos eficiente (Ramírez y cols., 2011). En estudios de fototoxicidad con células HEK293 expresando ABCG2 humana y felina, se observó que el transportador felino ofrece una protección mínima frente a la enrofloxacina en comparación con ABCG2 humano. Además, los estudios de acumulación de sustratos mostraron una menor capacidad de transporte de la proteína felina frente a la humana. Cabe destacar que en gato se han descrito varias reacciones adversas y aumento de susceptibilidad a fármacos entre los que se encuentran las fluoroquinolonas, sustratos de ABCG2 (Ford y cols., 2007; Albarellos y Landoni, 2009). Así, en esta especie las dosis establecidas para tratamientos de acetaminofeno son entre 3 y 5 veces menores que para perros y humanos (Lascelles y cols., 2007).

Li y cols. (2008b) realizaron un estudio comparativo de los transportadores en hepatocitos de rata, humanos, **perro** y **mono**. Así, observaron que se producía transporte de feoforbida A, sustrato exclusivo de ABCG2, en los hepatocitos humanos y de perro, siendo muy limitado en el caso de hepatocitos de rata y mono. Estudios inmunohistoquímicos han reflejado patrones similares de expresión de ABCG2 en las membranas de los hepatocitos en humanos y perros, tanto en individuos sanos como con hepatitis. Estos hallazgos representan una gran ventaja para el estudio de enfermedades hepáticas (Ijzer y cols., 2010).

Los ensayos para la caracterización de ABCG2 en pequeños rumiantes comenzaron con la clonación del cDNA de ABCG2 **caprino** a partir de muestras de tejido de glándula mamaria (Wu y cols., 2008) y de ABCG2 **ovino** a partir de hígado (Duncan y cols., 2007). La secuencia del transportador caprino está formada por 1977 pb y la proteína resultante tiene también 658 aminoácidos. Como era de esperar, la mayor homología de ABCG2 caprino tanto en la secuencia nucleotídica, como en la proteína, se ha observado con otros rumiantes (99% con oveja y 96-97% con vaca). Para rata y ratón la homología fue del 81 y 78% en la secuencia de nucleótidos y del 80 y 79% en la de aminoácidos, respectivamente (Tabla 1).

En cuanto a la **vaca**, Cohen-Zinder y cols. (2005) secuenciaron el gen bovino, ubicado en el cromosoma 6, cuyo cDNA consta de 2029 pb y da lugar a una proteína de 658 aminoácidos. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el transportador bovino sufre una menor inhibición mediante flavonoides que el humano pero mayor que el murino (Merino y cols., 2009). Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado una comparación sistemática del transportador entre especies de rumiantes, lo que será objeto de la presente memoria.

2.3. METODOLOGÍA *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE TRANSPORTADORES ABC

El hecho de que ABCG2, al igual que otros transportadores ABC, participe en el fenómeno de multirresistencia a fármacos y en la protección frente a xenobióticos, ha suscitado un creciente interés en la industria farmacéutica, ya que el estudio de las interacciones entre fármacos y los transportadores nos permite predecir la distribución de compuestos activos a nivel celular y sistémico. Además, teniendo en cuenta que las modificaciones funcionales del transporte tienen una gran importancia en la fase final del desarrollo de fármacos, aparece la necesidad de realizar ensayos a gran escala para analizar las interacciones fármaco-transportador. Sin embargo, los ensayos *in vivo*, realizados generalmente en ratones, son relativamente caros y están significativamente limitados, ya que existen diferencias funcionales entre los transportadores ABC murinos y humanos como hemos descrito. Por todo lo anterior, los ensayos *in vitro*, realizados tanto en células intactas como con membranas, se presentan como un método rápido, eficiente y que permite realizar ensayos a gran escala, reduciendo costes y sacrificio masivo de animales (revisado por Hegedus y cols., 2009b).

Entre las células que se emplean para la expresión de ABCG2 podemos destacar las células **PA317**, células derivadas de fibroblastos murinos (Miwa y cols., 2003), las **Sf9**, células procedentes del insecto *Spodoptera frugiperda* (Pozza y cols., 2009), las **LLC-PK1**, células porcinas epiteliales polarizadas derivadas del túbulo proximal del riñón (Kondo y cols., 2004), las **Caco-2**, células intestinales procedentes de cáncer de colon humano (Xia y cols., 2005), las **MEF3.8**, fibroblastos embrionarios inmortalizados obtenidos a partir de ratones triple *knock-out* Mdr1a/b^{-/-}, Mrp1^{-/-} (Jonker y cols., 2000), las **HEK293**, fibroblastos embrionarios humanos (Polgar y cols., 2004), o las **MDCKII**, células polarizadas de epitelio renal canino (Pavek y cols., 2005). Estas células transducidas con ABCG2 nos permiten realizar gran variedad de ensayos *in*

vitro para la caracterización del transportador, así como el estudio de las interacciones producidas con distintos fármacos.

Entre los estudios *in vitro* más ampliamente utilizados son los **ensayos de citotoxicidad** que nos permiten evaluar la respuesta de una población celular frente a distintos compuestos. Así, existen numerosos métodos disponibles para evaluar la toxicidad en células cultivadas en pocillos tras el tratamiento de 24 a 72 horas con el compuesto de interés. Entre estos métodos, podemos destacar los ensayos colorimétricos de MTT, para determinar proliferación celular (Zheng y cols., 2009), y LDH, para determinar la actividad de la lactato deshidrogenasa (Wu y cols., 2005). En ambos casos la formación de un producto coloreado es directamente proporcional al número de células vivas, proporcionándonos un valor indirecto de citotoxicidad. Estos ensayos nos permiten evaluar la citotoxicidad a gran escala de distintos compuestos. Además, son muy útiles para determinar si un transportador ABC confiere resistencia frente a un compuesto quimioterapéutico mediante ensayos comparativos con células parentales y células transfectadas con el transportador de interés (Calcagno y cols., 2007). Por otra parte, mediante la utilización de inhibidores podemos estudiar la posibilidad de revertir la resistencia mediada por transportadores ABC.

Teniendo en cuenta que las barreras biológicas presentes en los distintos órganos poseen al menos una capa celular clave en los procesos de intercambio de compuestos, los **ensayos de transporte** *in vitro* empleando **monocapas celulares** constituyen un modelo de barrera farmacológica de gran utilidad para determinar el transporte bidireccional de compuestos (Merino y cols., 2005b). Para el desarrollo de este tipo de ensayos existen placas con insertos, con filtros de distintos materiales y distinto tamaño de poro, disponibles comercialmente. En estos ensayos hay que tener en cuenta la permeabilidad pasiva de los compuestos, ya que puede interferir en los resultados del transporte activo. Además, debemos controlar los distintos parámetros que intervienen como el tiempo de incubación o el rango de concentraciones. También debemos tener en cuenta la presencia de transportadores endógenos en las células empleadas, como es el caso de las células MDCKII (Pavek y cols., 2005) y Caco-2 (Xia y cols., 2005). Para ello, es conveniente realizar los ensayos paralelamente en células parentales y células transfectadas con el transportador de interés (revisado por Hegedus y cols., 2009b) y complementarlo con la utilización de inhibidores específicos.

Continuando con los ensayos *in vitro* que emplean células intactas, podemos destacar los ensayos de acumulación intracelular mediante **citometría de flujo** que nos permiten determinar la acumulación o el transporte de compuestos fluorescentes sustratos de ABCG2 como mitoxantrona, feoforbida a, topotecan o bodipy-prazosina. Este método nos permite identificar sustratos e inhibidores de transportadores ABC de forma rápida y a gran escala (Calcagno y cols., 2007).

Por otro lado, otra posibilidad para caracterizar de forma económica y a gran escala los transportadores ABC es el empleo de **membranas** aisladas a partir de células que sobreexpresan el transportador de interés, ya sean células transfectadas, infectadas mediante virus o seleccionadas mediante fármacos (Pavek y cols., 2005; Ozvegy y cols., 2001; Volk y cols., 2000). Para este fin, cabe destacar el amplio uso de las células de insecto Sf9 infectadas mediante baculovirus por su capacidad para expresar un alto nivel del transportador de interés. Sin embargo, dicho transportador no siempre es funcional, posiblemente debido a los bajos niveles de colesterol presentes en las membranas de las células de insecto o a una glicosilación defectuosa de la proteína (revisado por Hegedus y cols., 2009b).

Teniendo en cuenta que los transportadores ABC emplean la energía procedente del ATP para transportar sus sustratos a través de la membrana celular, los ensayos de actividad ATPasa constituyen una importante herramienta para el estudio de transporte de fármacos mediado por transportadores en vesículas de membrana. Esta técnica nos permite identificar el transporte de sustratos mediante la detección colorimétrica del fosfato inorgánico liberado durante la hidrólisis del ATP (Valdameri y cols., 2012). Sin embargo, algunos compuestos con bajo ratio de transporte podrían no generar un aumento detectable del fosfato inorgánico liberado y, por tanto, proporcionarnos un falso negativo. Además, empleando concentraciones crecientes de un compuesto podemos observar estimulación e inhibición de la actividad ATPasa, posiblemente debido a la existencia de un sitio de unión secundario de baja afinidad en el transportador; una vez que este sitio secundario está saturado con el sustrato, podría observarse inhibición del transporte. Por ello, es conveniente emplear un amplio rango de concentraciones del compuesto de interés (revisado por Hegedus y cols., 2009b). También se puede estudiar la inhibición del transportador mediante la adición de inhibidores que nos modulen la actividad ATPasa.

Otra posibilidad para caracterizar las interacciones entre distintos compuestos y los transportadores ABC *in vitro*, son los **ensayos de transporte** dependientes de ATP **con membranas** que nos permiten detectar un aumento en la acumulación del sustrato transportado en las membranas que expresan el transportador (Ji y Morris, 2005). Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de algunos compuestos dificulta su acumulación en las membranas, proporcionándonos un falso negativo. Estos ensayos complementados con los ensayos de ATPasa son frecuentemente empleados por la industria farmacéutica para el descubrimiento de sustratos e inhibidores de ABCG2 (Giacomini y cols., 2010).

Por último, los **ensayos de fotoafinidad** permiten la detección directa de una proteína mediante una unión covalente entre un ligando y su receptor específico. Así, un compuesto sustrato del transportador ABC de interés marcado radiactivamente (yodoarilazidoprazosina (IAAP), dihidropiridinas, taxanos o propafenones) se une covalentemente a dicho transportador mediante exposición a luz ultravioleta. Dicha unión puede ser alterada o inhibida en presencia de otro compuesto sustrato del transportador en el momento de la unión (Peer y cols., 2005). Sin embargo, este tipo de ensayos no nos permiten diferenciar entre sustratos e inhibidores del transportador, son más complejos de realizar y no están optimizados para realizarse a gran escala, no siendo, por tanto, utilizados de forma rutinaria en la industria farmacéutica.

Con todo lo anteriormente expuesto, podemos concluir que los ensayos *in vitro* representan una herramienta muy útil para la caracterización de las interacciones entre compuestos y transportadores ABC. Además, pueden ser realizados con un relativo bajo coste y a gran escala permitiéndonos analizar un amplio número de compuestos, como paso previo a los ensayos *in vivo*.

2.4. FUMITREMORGINA C: INHIBIDOR ESPECÍFICO DE ABCG2

La fumitremorgina C es una micotoxina aislada de *Aspergillus fumigatus* (Figura 14). Este compuesto es un potente y específico inhibidor del transportador ABCG2 (Rabindran y cols., 2000; Allen y cols., 2002) utilizado como inhibidor modelo *in vitro*. Su utilización *in vivo* se ha visto limitada porque, al igual que otros miembros de la familia de los alcaloides, es neurotóxico y produce temblores y convulsiones en ratones y otros animales (Cole y cols., 1981; Nishiyama y Kuga, 1989). Por ello, se han elaborado análogos sintéticos menos tóxicos con similares propiedades inhibitorias, tales como Ko132 y Ko143 (Allen y cols., 2002). Sin embargo, Garimella y cols. (2005) han determinado la farmacocinética en plasma y la distribución tisular de la fumitremorgina C empleado a una dosis de 25 mg/kg en ratón, sin observar efectos tóxicos.



Figura 14. Estructura química de la fumitremorgina C, inhibidor del transportador ABCG2 estudiado en la presente memoria.

La fumitremorgina C ha sido utilizada en estudios *in vitro* que han permitido comparar variantes de ABCG2 humana (con treonina o glycina en la posición 482) y *wild-type* (con arginina en la posición 482) mediante la inhibición del transporte de un sustrato específico, como por ejemplo la feoforbida A. Otros estudios, utilizan la fumitremorgina C para revertir la resistencia a antitumorales de células que sobreexpresan el transportador (Rabindran et al., 2000) aumentando su citotoxicidad. En general, este compuesto es ampliamente utilizado como control positivo de inhibición del transportador (Gupta et al., 2007; Hauswald y cols., 2009; Solazzo y cols., 2009; Paturi y cols., 2010), así como para la identificación del fenotipo SP en células madre

(Mathew y cols., 2009), estudios de citotoxicidad mediada por ABCG2 (Tiwari y cols., 2009) y determinación de especificidad de sustrato (Takenaka y cols., 2007; Susanto y cols., 2008).

Además, se ha establecido una correlación entre la expresión de ABCG2 y la inhibición del transporte de sustratos mediada por fumitremorgina C. Dicha inhibición puede detectarse en células que expresan poca proteína, siendo éste un método muy útil para determinar la expresión y función de ABCG2 en muestras clínicas (Robey et al., 2004).

Casi todos los estudios de inhibición utilizando fumitremorgina C se han realizado con ABCG2 humana, pero existen pocos ensayos que empleen este compuesto como inhibidor de la Abcg2 murina (Allen et al., 2002). La posible existencia de variación interespecífica de las propiedades inhibitorias de la fumitremorgina C podría tener una gran importancia en la utilización de los modelos *in vitro* y en el estudio de las interacciones farmacológicas. Dicho conocimiento sería de gran utilidad para el diseño e interpretación de los resultados experimentales obtenidos empleando Abcg2 murina, así como su posterior extrapolación a la situación humana. Por lo tanto, ante la ausencia de estudios comparativos entre la inhibición de la fumitremorgina C en Abcg2 de ratón y ABCG2 humana, uno de los objetivos de la presente memoria será el desarrollo de un estudio para analizar las posibles diferencias de la actividad del inhibidor frente a ABCG2 en ambas especies.

2.5. FLAVONOIDES: EQUOL

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas presentes en las plantas, que incluyen bayas, uvas, nueces, cacahuetes, granadas y otras frutas y hortalizas (Manach y cols., 2005). Muchos de los polifenoles están disponibles como suplementos alimenticios. Los polifenoles más estudiados son los fitoestrógenos, que podemos clasificar en tres grupos: isoflavonas que provienen principalmente de la soja, los lignanos que se encuentra en grandes cantidades en la linaza y los cumestanos que son derivados de plantas como la alfalfa. La utilización de las isoflavonas se ha sugerido como posible tratamiento para muchas enfermedades incluyendo enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, enfermedades relacionadas con la edad y tumores

dependientes de hormonas (Setchell y cols., 2002). Sin embargo, no existen altos niveles de isoflavonas en su forma biológicamente activa en los productos alimenticios naturales. Por ejemplo, la daidzina, el precursor de la daidzeína, es la forma glicosídica que contiene una porción de carbohidrato de la molécula y es la que aparece en la soja. La daidzina es metabolizada por las bacterias intestinales, que hidrolizan los hidratos de carbono, a la isoflavona biológicamente activa, daidzeína (Setchell y cols., 2002; 2005). En sangre, aparecen mayoritariamente los compuestos conjugados con glucurónico y sulfato.

El equol (7-hidroxi-3-(49-hidroxifenil)-cromanol) (Figura 15) es un metabolito de la isoflavona daidzeína y pertenece al grupo de los estrógenos no esteroideos. Este flavonoide es producido en el intestino humano mediante la degradación bacteriana de la daidzeína (Minamida y cols., 2008). Si bien, hay evidencias que sugieren que el equol se encuentra presente en el repollo blanco (Hounsome y cols., 2009).



Figura 15. Estructura química del equol, flavonoide estudiado en la presente memoria

En los últimos 15 años los flavonoides, siendo productos naturales, han sido ampliamente estudiados como compuestos reguladores de los transportadores ABC. Desde que en 1993 el grupo de Versantvoort presentó a la isoflavona genisteína como inhibidora del transporte mediado por MRP1, se han descrito numerosos flavonoides que actúan como inhibidores de este transportador (apigenina, kaempferol, naringenina, quercetina y otros) (Wu y cols., 2005). Además, se ha sugerido que los flavonoides también podrían estimular el transporte mediado por MRP1. Así, la genisteína, la daidzeína y la quercetina inhiben el transporte de daunorubicina pero estimulan el transporte de rodamina123 en células cancerígenas de pulmón (Versantvoort y cols., 1996).

También se han descrito varios flavonoides capaces de inhibir el transporte mediado por P-gp (acacetina, galangina, miricetina, morina, biochanina A y kaempferol) (revisado por Wesolowska y cols., 2010). Además, se han descrito flavonoides capaces de estimular el transporte mediado por P-gp dependiendo del sustrato. Así, Kitagawa y cols. (2005) observaron que el kaempferol inhibe el transporte de rodamina123 en células KB-C2 que sobreexpresan P-gp y, sin embargo, Chieli y cols. (1995) lo habían descrito como estimulador del transporte de doxorubicina en hepatocitos de rata.

Al igual que en los casos anteriores, también se han descrito numerosos flavonoides capaces de inhibir el transporte mediado por ABCG2 como genisteína, naringenina, acacetina o kaempferol (Katayama y cols., 2007). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que los flavonoides genisteína y daidzeína inhiben el transporte *in vitro* de enrofloxacina en cultivos celulares que sobreexpresan ABCG2, así como, una reducción de la secreción en leche de enrofloxacina tras su coadministración con genisteína en ovejas (Pulido y cols., 2006). Además, también se ha observado una modulación de la secreción de nitrofurantoína (sustrato de ABCG2) en leche de ovejas tras una dieta con contenido variable en isoflavonas (Pérez y cols., 2009b). Recientemente, nuestro grupo también ha demostrado una inhibición en la secreción hacia leche de nitrofurantoína mediada por Abcg2 en ratones tras su coadministración con genísteina o daidzeína (Merino y cols., 2010). La interacción *in vitro* de equol con el transportador ABCG2 de rumiantes es parte del objeto de la presente memoria.

2.6. FLUOROQUINOLONAS: DIFLOXACINA, DANOFLOXACINA, MARBOFLOXACINA, ORBIFLOXACINA Y SARAFLOXACINA

Las fluoroquinolonas pertenecen al grupo de las quinolonas, antibióticos ampliamente utilizados en terapéutica humana y veterinaria.

Las quinolonas son derivados de síntesis de la cloroquina, siendo su principal integrante el ácido nalidíxico (1-8 naftiridina), identificado por Lesher en 1962. La introducción de un átomo de flúor en la molécula básica de las quinolonas dio lugar a la aparición de las fluoroquinolonas, que presentan una potente actividad antibacteriana. La norfloxacina fue la primera en ser comercializada y se caracteriza por la presencia de un átomo de flúor en posición 6 y un anillo piperazínico en posición 7 (Ito y cols., 1980).

En función de su espectro de actividad, las quinolonas disponibles para uso clínico han sido clasificadas en cuatro generaciones:

-Primera generación: se utilizan exclusivamente como antisépticos urinarios porque no alcanzan niveles séricos terapéuticos y se eliminan por orina en forma activa; algunas de ellas son ácido nalidíxico, ácido pipemídico y ácido oxolínico.

-Segunda generación: se corresponden con las fluoroquinolonas, debido a que presentan un residuo de flúor en el carbono 6. Tienen un espectro de actividad más amplio, cubriendo estafilococos y *Pseudomona aeruginosa*, y actuando tanto en el tracto urinario (norfloxacina, enoxacina y lomefloxacina), como a nivel sistémico (ciprofloxacina y ofloxacina). Existen otros miembros de este grupo (esparfloxacina y grepafloxacina) que muestran gran actividad frente a *Streptococcus pneumoniae*, pero cuya utilización ha sido restringida debido a su toxicidad.

-Tercera generación: surgieron ante la necesidad clínica de compuestos con un espectro antibacteriano más amplio, específicamente contra bacterias gram-positivas. Tienen actividad contra enterobacterias, *P. aeruginosa*, gérmenes atípicos y estreptococos. El miembro más reciente de este grupo es la gemifloxacina, cuyo espectro de actividad incluye algunos microorganismos anaerobios.

-Cuarta generación (también considerada tercera B): estos nuevos fármacos fueron sintetizados para aumentar el espectro antibacteriano contra microorganismos

anaerobios, preservando la actividad de las quinolonas de tercera generación. Algunos ejemplos son la moxifloxacina y la levofloxacina.

Cabe destacar que puede existir cierta discrepancia entre autores respecto a la clasificación de las quinolonas; Ball (2000) las clasifica en tres grupos mientras que Van Bambeke y cols. (2005) añaden el cuarto grupo.

Las fluoroquinolonas estudiadas en la presente memoria son la difloxacina, marbofloxacina, orbifloxacina, sarafloxacina y danofloxacina (Figura 16), seleccionadas precisamente por su amplia utilización. Martínez y cols. (2006) las clasifican como de segunda generación, excepto la orbifloxacina que la engloban en el grupo de la tercera generación.





С





Figura 16. Estructuras de la difloxacina (A), marbofloxacina (B), orbifloxacina (C), sarafloxacina (D) y danofloxacina (E) fluoroquinolonas estudiadas en la presente memoria. Como podemos observar los cinco fármacos presentan residuos de flúor en el carbono 6, por lo que se incluyen en el grupo de las fluoroquinolonas.

2.6.1. UTILIZACIÓN CLÍNICA

Debido a sus características farmacológicas, las fluoroquinolonas se utilizan en el tratamiento de una amplia variedad de patologías bacterianas que afectan al aparato urinario, piel, partes blandas, hueso, aparato respiratorio y glándula mamaria de animales domésticos, especialmente bovinos y aves, pero también otros rumiantes, como ovejas, perros y gatos. Algunas fluoroquinolonas también se emplean en medicina humana; así, la esparfloxacina se utiliza para el tratamiento de la gonorrea y la ciprofloxacina en infecciones del tracto urinario (Hooper, 2000).

La difloxacina se emplea en el tratamiento de infecciones bacterianas en el tracto urinario, respiratorio y en la piel en perros. Su espectro de antibacteriano es muy amplio, incluyendo bacterias gram-negativas (Pasteurella, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Enterobacter, Pseudomonas) y gram-positivas (Staphylococcus, Streptococcus) (van den Hoven y cols., 2000). Ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la pasteurelosis neumónica inducida experimentalmente en terneros (Olchowy y cols., 2000) y endocarditis experimental por *Staphylococcus aureus* en conejos (Boscia y cols., 1988) así como para el tratamiento de mastitis en rumiantes (Marín y cols., 2007).

El espectro antibacteriano de la marbofloxacina incluye Enterobacter, Pasteurella, Pseudomonas y Staphylococcus. Esta fluoroquinolona es utilizada para las infecciones de la piel, sistema respiratorio y del tracto urinario en perros y gatos (Rougier y cols., 2005), así como de la glándula mamaria en ganado vacuno (Escudero y cols., 2011). También ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de infecciones de *Escherichia coli* en pavos (Haritova y cols., 2006).

La orbifloxacina está indicada para el tratamiento de infecciones de la piel, tejidos blandos y del tracto urinario en perros y gatos (Davis y cols., 2006), el tratamiento de infecciones gastrointestinales y respiratorias en ganado vacuno y cerdos (Nakamura, 1995) y el tratamiento de mastitis en rumiantes (Kroemer y cols., 2012). La sarafloxacina es ampliamente utilizada en la prevención y tratamiento de colibacilosis (Jones y col., 1998).

El espectro de actividad de la danofloxacina también es amplio, incluyendo la mayoría de bacterias gram-negativas, algunas gram-positivas, micoplasmas y patógenos intracelulares pertenecientes a los géneros *Brucella* o *Chlamydia*; sin embargo, apenas

presenta actividad frente anaerobios (Hannan y cols., 1989; Wolfson, 1989; Neu, 1991; Appelbaum y Hunter, 2000). En medicina veterinaria se utiliza en el tratamiento de enfermedades respiratorias en vacas, ovejas y pollos, ya que tiende a concentrarse en pulmón (Giles y cols., 1991), y es efectiva frente a los patógenos respiratorios más importantes en vacas, como *Pasteurella haemolytica, P. multocida, Haemophilus somnus, Mycoplasma bovis, y M. dispar.* McKellar y cols. (1998) demostraron que la danofloxacina también es efectiva contra gastroenteritis y septicemia en ovejas, y Poutrel y cols. (2008) recomiendan su empleo en el tratamiento de mastitis.

Las fluoroquinolonas actúan produciendo daños en el ADN bacteriano que provocan un superenrollamiento defectuoso del material genético (Gellert y cols., 1977). Para ello, inhiben la actividad de la ADN girasa (también conocida como topoisomerasa II), una enzima presente en todas las bacterias encargada de catalizar el superenrollamiento de la doble hélice de ADN. Otra diana de las fluoroquinolonas es la topoisomerasa IV, enzima encargada de la relajación de la doble hélice de ADN y de la separación de los cromosomas hermanos antes de la replicación (Zechiedrich y Cozzarelli, 1995).

El desarrollo de resistencias a fluoroquinolonas está provocado mayoritariamente por mutaciones en la ADN girasa (Nakamura y cols., 1989; Yoshida y cols., 1990) y, en menor medida, por mutaciones en la topoisomerasa IV, dando lugar a mayores niveles de resistencia (Vila y cols., 1996).

Los transportadores ABC y la disminución en la permeabilidad de la pared bacteriana son otras de las causas implicadas en el desarrollo de resistencias. Sin embargo, estas resistencias suelen ser menos específicas y producen resistencia cruzada a distintos tipos de antimicrobianos, ya que son un mecanismo común a varios de estos agentes (revisado por Poole, 2000).

El uso de fluoroquinolonas está limitado por la aparición de efectos adversos que suelen depender de la dosis y de la especie (Bertino y Fish, 2000). Algunos ejemplos de toxicidad descritos en humanos serían molestias gastrointestinales o de las articulaciones (Van Bambeke y cols., 2005), así como fotosensibilidad, interacciones medicamentosas, efectos sobre el sistema nervioso (incluyendo convulsiones, ataxia, mareos, insomnio, inquietud, somnolencia y temblores) y cristaluria (que conduce a

uropatía obstructiva). Muchos de estos efectos tóxicos también se han descrito en perros y gatos. Además, en especies veterinarias, también se han descrito artropatías en animales jóvenes, especialmente perros, y toxicidad ocular (incluyendo degeneración de la retina en los gatos) (revisado por Martinez y cols., 2006). Burkhar y cols (1992) han descrito lesiones en condrocitos de perros Beagle (de 3 años) causadas por la difloxacina o sus metabolitos. El tratamiento de pioderma con marbofloxacina en perros puede ocasionar algunos efectos adversos como apatía, anorexia, vómitos, heces blandas, flatulencia y polidipsia, aunque estos efectos adversos se observaron en sólo 6 de 81 perros (Paradis y cols., 2001). Otro estudio similar con orbifloxacina para el tratamiento de pioderma estafilocócica en perros detectó solamente un caso de reacción cutánea adversa en los 23 animales evaluados (Scott y cols., 2006).

2.6.2. INTERACCIÓN CON TRANSPORTADORES ABC

La mayoría de las quinolonas se absorben rápidamente a nivel intestinal con una biodisponibilidad cercana al 90% y, a continuación, se distribuyen bien y penetran en la mayor parte de tejidos. Sin embargo, algunas de ellas muestran baja biodisponibilidad. Es el caso de la ciprofloxacina, con una biodisponibilidad de entre el 50 y el 80% (Sörgel y cols., 1989), y de la norfloxacina, entre el 30 y el 40% (Lamp y cols., 1992). Estos datos sugieren la implicación de transportadores ABC en el transporte de estos fármacos (Griffiths y cols., 1994). De hecho, podemos decir que los miembros de la familia de transportadores ABC (P-gp, MRP y ABCG2) afectan significativamente a la disposición farmacocinética de las quinolonas. Además, se ha sugerido la existencia de competencias entre ellas por los sitios de unión a los transportadores (Álvarez y cols., 2008).

Los esplenocitos de pollos se consideran un modelo fiable para estudios funcionales de los transportadores de membrana (P-gp, MRPs y ABCG2) y por ello se utilizan para evaluar la distinta interacción de los transportadores con fluoroquinolonas. Los ensayos realizados reflejaron que, de todas las fluoroquinolonas ensayadas (enrofloxacina, danofloxacina, marbofloxacina y ciprofloxacina), sólo la danofloxacina y el mesilato de danofloxacina interactuaron significativamente con la P-gp de origen aviar (Haritova y cols., 2007).

Ensayos de transporte con células LLC-GA5-COL150, Caco-2 y MDCKII demostraron que tanto la grepafloxacina como la levofloxacina son sustratos de P-gp, sin embargo tal no es el caso de la ciprofloxacina (Yamaguchi y cols., 2000, 2004; Naruhashi y cols., 2002). Ensayos de nuestro grupo de investigación con células MDCKII polarizadas han reflejado que ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina y danofloxacina son transportadas por Abcg2 murina y ABCG2 humana (Pulido y cols., 2006; Merino y cols., 2006; Real y cols., 2011a). Además, tanto enrofloxacina como danofloxacina son transportadas de manera diferencial por ambas variantes de ABCG2 bovina (Real y cols., 2011b). También se ha observado que Abcg2 murina participa en la excreción biliar de ciprofloxacina, grepafloxacina, ofloxacina y en la excreción urinaria de ciprofloxacina y grepafloxacina (Ando y cols., 2007).

El papel de ABCG2 en la secreción de fluoroquinolonas en la leche fue confirmado por nuestro grupo de investigación en ratones Abcg2^{-/-}. Así, la concentración en leche y el ratio leche/plasma para la ciprofloxacina fue dos veces mayor en ratones wild-type en comparación con los ratones Abcg2^{-/-} tras inyección intravenosa (Merino y cols., 2006). En cuanto a la danofloxacina, no se observaron cambios famacocinéticos en plasma entre ambos tipos de ratones; sin embargo, la concentración en leche y el ratio leche/plasma fue dos veces mayor en ratones wild-type en comparación con los ratones Abcg2^{-/-} (Real y cols., 2011a). Además, se estudió la interacción de la ivermectina, inhibidor de ABCG2, en ovejas tras la coadministración de danofloxacina. La ivermectina no produjo cambios en la concentración de danofloxacina en plasma, pero sí una disminución del 40% en leche. También se realizaron farmacocinéticas en leche y plasma de la fluoroquinolona enrofloxacina tras su coadministración con el flavonoide genisteina o el antihelmíntico albendazol sulfóxido, ambos inhibidores de ABCG2, en ganado ovino. La administración simultánea de los inhibidores junto con la enrofloxacina no produjo cambios significativos en la disponibilidad de enrofloxacina en plasma, sin embargo se produjo un descenso de la concentración en leche (Pulido y cols., 2006).

En el caso de la difloxacina (Marín y cols., 2010), marbofloxacina (Shem-Tov y cols., 1997) y orbifloxacina (Marín y cols., 2007; Goudah y cols., 2009) se han detectado mayores niveles en leche que en plasma lo que podría indicar que son

transportados a leche mediante ABCG2. La interacción *in vitro* de estos compuestos como sustratos del transportador es objeto de la presente memoria.

2.7. LACTONAS MACROCÍCLICAS: IVERMECTINA Y DORAMECTINA

Las lactonas macrocíclicas son antiparasitarios que se obtienen a partir de microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces*. En general, se caracterizan porque son moléculas hidrofóbicas con una estructura común: el anillo de lactona macrocíclico de 16 elementos. Podemos distinguir dos grupos, avermectinas y milbemicinas. Las avermectinas son estructuralmente similares a los antibióticos macrólidos pero, a diferencia de estos, carecen de actividad antimicrobiana y antifúngica (Burg y cols., 1979; Shoop y cols., 1995). Las milbemicinas también están formadas por anillos lactona macrocíclicos, siendo la principal diferencia estructural con las avermectinas, la ausencia de disacárido en la posición 13.

Las lactonas macrocíclicas que hemos incluido en nuestro estudio pertenecen al grupo de las avermectinas (ivermectina y doramectina, Figura 17).



Figura 17. Estructura química de las lactonas macrocíclicas ivermectina (A) y doramectina (B).

2.7.1. UTILIZACIÓN CLÍNICA

Las lactonas macrocíclicas son los antihelmínticos más comercializados, ya que son ampliamente utilizados en medicina veterinaria para el tratamiento de las infecciones por nematodos gastrointestinales y ectoparásitos, en agricultura para el control de plagas de insectos y en medicina humana para el tratamiento de filarias e infecciones por nematodos (Omura y Crump, 2004). Aunque son extremadamente eficaces frente artrópodos y nematodos, las lactonas macrocíclicas no actúan frente a trematodos y cestodos. La aplicación de lactonas macrocíclicas provoca una rápida parálisis del movimiento y del bombeo faríngeo; por ello, el parásito es incapaz de alimentarse y moverse y es rápidamente eliminado del hospedador. La molécula diana sobre la que actúan las lactonas macrocíclicas son los canales de cloro regulados por glutamato (GluCl). Los nematodos contienen múltiples formas de canales GluCl, lo que provoca diferencias en la sensibilidad frente a los antihelmínticos. Estos canales se expresan en el sistema neuromuscular, lo cual explica el efecto paralizante de las lactonas macrocíclicas sobre los nematodos (Wolstenholme y Rogers, 2005).

Las lactonas macrocíclicas son, en general, antihelmínticos seguros y efectivos cuando son utilizados de acuerdo a las prescripciones establecidas. Sin embargo, un mal uso o un exceso de la dosis pueden provocar toxicidad en el animal tratado. Estudios preclínicos han demostrados que la mayor parte de signos de toxicidad están asociados con efectos neurotóxicos debidos al aumento en la entrada del fármaco en el cerebro, posiblemente causado por una deficiencia en P-gp debida a una mutación en el gen MDR1 (Woodward, 2011). Se han descrito casos de toxicidad de ivermectina en perros y gatos (Lovell, 1990), oveja (Bourke, 1995), cerdo (Sanford y cols., 1988), caballo (Karns y Luther, 1984) y otros animales domésticos, causando depresión del sistema nervioso central y, a veces, coma. Este efecto puede ser debido a una interacción de la ivermectina con los receptores de GABA presentes en el cerebro. Así, la estimulación de los receptores de GABA inducida por la ivermectina provocaría la apertura de los canales de cloruro. A continuación, los iones de cloruro entrarían en las células nerviosas e hiperpolarizarían la membrana postsináptica, causando la depresión del sistema nervioso central. Los perros de raza Collie son extremadamente sensibles a la neurotoxicidad inducida por ivermectina. En estos perros, tras la aplicación de ivermectina a dosis terapéuticas, puede producirse depresión del sistema nervioso central, aumento de salivación, temblores, ataxia, ceguera temporal y, a veces coma y la muerte. Los efectos descritos se atribuyen a una mutación en el gen de resistencia MDR1 causando un defecto funcional en P-gp (Trailovic y Nedeljkovic, 2011). También se han descrito casos de toxicidad en Collies tras tratamiento con doramectina (Yas-Natan y cols., 2003).

2.7.2. INTERACCIÓN CON TRANSPORTADORES ABC

Los transportadores ABC tienen gran importancia en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de lactonas macrocíclicas tanto en el parásito como en el hospedador.

En 1998 se demostró por primera vez que el nematodo *Haemonchus contortus* resistente a ivermectina poseía mayores niveles de expresión de P-gp A en comparación con una cepa sin seleccionar (Xu y col., 1998). Además, el uso de inhibidores de transportadores ABC como verapamil o CL347099 aumentaron la eficacia de la ivermectina y de la moxidectina frente a *H. contortus* en jerbos (Xu y col., 1998; Molento y Prichard, 1999). Posteriormente, se ha demostrado que los tratamientos con ivermectina y moxidectina inducen una sobrexpresión de cinco P-gps en nematodos adultos de *H. contortus* (P-gp A, B, C, D y E), aunque el mecanismo por el cual se produce la sobreexpresión no se conoce con exactitud. A parte de *H. contortus*, el papel de P-gp en otros parásitos resistentes es poco claro. El tratamiento con ivermectina actúa sobre varios transportadores ABC del nematodo *Onchocerca volvulus*, aunque se desconoce si está relacionado con una mayor transcripción o nivel de expresión (Prichard y Roulet, 2007).

En cuanto al hospedador, P-gp fue el primer transportador que se relacionó con el transporte de lactonas macrocíclicas, empleando ratones deficientes para P-gp que presentaron acumulación de ivermectina y abamectina en el cerebro y, en consecuencia, neurotoxicidad (Schinkel y cols., 1994; Lankas y cols., 1997). Como ha sido mencionado anteriormente, un efecto similar ha sido descrito para la ivermectina en perros de raza Collie (Mealey y cols., 2001; Roulet y cols., 2003). Ensayos en ganado vacuno han reflejado diferencias en las farmacocinéticas de eprinomectina, ivermectina y moxidectina, posiblemente debidas a la afinidad de P-gp por estos compuestos

(Lespine y cols., 2007). Incluso con la ivermectina se ha observado un aumento de su biodisponibilidad en ovejas tras coadministración con verapamilo, inhibidor de P-gp (Merino y cols., 2006). Por otra parte, Didier y Loor (1996) en estudios realizados en cultivos celulares, probaron que la ivermectina no sólo funcionaba como sustrato de la P-gp, sino también como inhibidor. También ha sido estudiada la doramectina como inhibidor de P-gp (Lespine y cols., 2007).

Además, han sido descritas diversas interacciones farmacológicas mediadas por transportadores ABC, incluida P-gp, de las lactonas macrocíclicas con otros fármacos en diversas especies (revisado por Lifschitz y cols., 2012). La ivermectina interacciona mayoritariamente con P-gp, pero también con MRP1, MRP2 y MRP3 (Lespine y cols., 2006). Jani y cols. (2011), empleando ensayos celulares y con membranas, observaron que la ivermectina muestra una interacción de alta afinidad con ABCG2 humana con valores de IC₅₀ en el rango de 1-1,5 μ M. Nuestro grupo de investigación ha demostrado la capacidad de la lactona macrocíclica ivermectina para comportarse como inhibidor de ABCG2 mediante experimentos de acumulación y utilizando células transfectadas de forma transitoria (Merino y cols., 2009) y en ensayos de excreción de danofloxacina a leche en oveja, tal y como ha sido mencionado anteriormente (Real y cols., 2011a).

El análisis de la interacción del transportador ABCG2 bovino y ovino con las lactonas macrocíclicas ivermectina y doramectina es parte del objeto de la presente memoria.

2.8. ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS: TILMICOSIN

Los antibióticos macrólidos han estado en uso desde que Brockman y Henckel (1950) aislaron picromycin partir de una cepa de *Streptomyces felleus* y han demostrado estar entre los antibióticos mejor tolerados con un bajo nivel de toxicidad.

Los antibióticos macrólidos se caracterizan por tener un anillo de lactona macrocíclica que contiene 14, 15 o 16 átomos, unido mediante puentes glicosídicos a distintos azúcares. En general, se obtienen a partir de microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces*. El antibiótico macrólido que hemos incluido en nuestro estudio es el tilmicosin debido a su amplio uso en veterinaria (Figura 18).



Figura 18. Estructura química del antibiótico macrólido tilmicosin.

2.8.1. UTILIZACIÓN CLÍNICA

Los macrólidos tienen un amplio espectro de actividad antibacteriana frente a patógenos gram-positivos (*Streptococcus pneumoniae*) y gram-negativos. Además, también tienen propiedades no antibióticas como estimulación del receptor de motilina (Peeters, 1993), actividad antitumoral (Mikasa y cols., 1997) y efectos anti angiogénicos (Yatsunami y cols., 1999). Participan en la inflamación tisular y regulan el funcionamiento de las células inmunitarias. La actividad antibacteriana de los macrólidos se debe a la inhibición de la síntesis proteica bacteriana mediante la unión al

componente 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (Gerchman y cols., 2011).

El antibiótico veterinario tilmicosin es un macrólido de 16 anillos con actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivos y gram-negativos (*Pasteurella sp., Mannheimia sp., Actinobacillus sp., y Mycoplasma sp.*). El tilmicosin se emplea de forma subcutánea para el tratamiento de infecciones respiratorias en ganado vacuno o de forma oral para controlar la pneumonía bacteriana en cerdos (Gorham y cols., 1990; Moore y cols., 1996). El tilmicosin tiene una alta afinidad de captación por parte de los neutrófilos, en cuyo espacio intracelular se han registrado niveles 40 veces mayores que en suero (Scorneaux y Shryock, 1999). Existen evidencias que sugieren que el tilmicosin produce efectos antiinflamatorios, mediante mecanismos todavía sin caracterizar (Morck y cols., 1997; Lee y cols., 2004).

La mayor parte de efectos tóxicos descritos para el tilmicosin son cardiovasculares, tras una administración intravenosa o en dosis mayores de la dosis terapéutica (Jordan y cols., 1993; Main y cols., 1996). En un estudio preliminar en pollos, la administración intravenosa de tilmicosin a una dosis de 15 mg/kg provocó efectos cardiovasculares adversos y la muerte (Abu-Basha y cols., 2007). Además, la administración del antibiótico en ratones a una dosis de 50 y 70 mg/kg modifica los niveles de enzimas cardiacas y de TSA, poniendo de manifiesto su efecto cardiotóxico y prooxidante (Yapar y cols., 2006).

2.8.2. INTERACCIÓN CON TRANSPORTADORES ABC

La interacción entre los antibióticos macrólidos y los transportadores ABC ha sido escasamente estudiada hasta el momento, sobre todo en el campo de la medicina veterinaria.

Kobayashi y cols. (2001) han descrito un transportador (MacAB) presente en bacterias gram-negativas como *E.coli* y, perteneciente al grupo de transportadores ABC, que confiere resistencia específica a macrólidos.

La inhibición del transporte de digoxina, sustrato de P-gp, por parte de varios macrólidos ha demostrado que estos compuestos podrían ser inhibidores de P-gp (Eberl

y cols., 2007). Hughes y Cowe (2010) sugieren que la interacción de varios macrólidos con felodipina, alfentanil y terfenadina está relacionada con la inhibición de P-gp (Anadon and Reeve-johnson, 1999). Algunos estudios han sugerido que la azitromicina y la eritromicina son sustratos de P-gp (Pachot y cols., 2003; Sugie y cols., 2004; Hariharan y cols., 2009), mientras que el trabajo de Pachot y cols. (2003) va más allá y sugiere que todos los antibióticos macrólidos en concentraciones micromolares muy bajas son sustratos de P-gp. Ensayos de transporte *ex vivo* en córnea de conejo han confirmado el importante papel de MRP2 en el transporte de eritromicina (Karla y cols., 2007). Sin embargo, apenas hay datos de la interacción de estos compuestos con ABCG2.

El posible papel del tilmicosin como inhibidor de ABCG2 en rumiantes será estudiado en la presente memoria.

2.9. SULFONAMIDAS: SULFAMETOXAZOL

Las sulfonamidas son un conjunto de compuestos bacteriostáticos sintéticos caracterizados por contener un grupo sulfonamida. Desde los años 40 se han sintetizado unas 150 sulfonamidas con aplicación en medicina humana y veterinaria (Baran y cols., 2011). La sulfonamida que hemos incluido en nuestro estudio es el sulfametoxazol por su utilización en medicina veterinaria (Figura 19).



Figura 19. Estructura química de la sulfonamida sulfametoxazol.

2.9.1. UTILIZACIÓN CLÍNICA

Las sulfonamidas son activas frente a un amplio espectro de bacterias grampositivas y muchas bacterias gram-negativas incluyendo especies del género Streptococcus, Staphylococcus, Escherichia, Neisseria, Shigella, Salmonella, Nocardia, Chlamydia y Clostridium. Además, se han utilizado contra protozoos (por ejemplo, *Toxoplasma gondii*), parásitos (por ejemplo, *Plasmodium malariae*), y hongos (por ejemplo, *Pneumocystis carinii*). Se emplean para control y tratamiento de enfermedades tales como pleuroneumonía, rinitis, pasteurelosis, colibacilosis y salmonelosis en ganado bovino, ovino, caprino, equino, porcino, perros, gatos y aves de corral.

Los antibióticos del grupo de las sulfonamidas actúan mediante inhibición competitiva de la enzima dihidropteroata sintasa (DHPS), encargada de catalizar la conversión de paraaminobenzoato (PABA) en dihidropteroato (AHHMD), precursor en la síntesis de folato. El ácido tetrahidrofólico (THF) participa en la síntesis de ácidos nucleicos esenciales para la formación de ADN y ARN. Las sulfonamidas también inhiben la permeabilidad de la pared bacteriana al ácido glutámico, componente esencial en la síntesis de ácido fólico. Sin embargo, estos compuestos no son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos que utilizan ácido fólico del medio ambiente, tienen altas concentraciones de PABA o presentan mecanismos de resistencia (revisado por Baran y cols., 2011).

Los efectos adversos asociados con una dosis elevada de sulfonamidas en seres humanos incluyen reacciones de hipersensibilidad cutánea y náuseas. Otros efectos adversos descritos como estomatitis, hemólisis, metahemoglobinemia, hepatotoxicidad y toxicidad renal, son poco frecuentes (Bhaiya y cols., 2006).

La administración prolongada de sulfonamidas pueden causar queratoconjuntivitis en perros, y los preparados que contienen sulfadiazina puede provocar una poliartritis inmune reversible en perros (Lavergne y cols., 2006). Las sulfonamidas pueden inhibir la síntesis de hormona tiroidea y, en algunos perros pueden causar hipotiroidismo subclínico con niveles bajos de T_4 y altas concentraciones de TSH en plasma (Frank y cols., 2005).

El sulfametoxazol se metaboliza no sólo a los metabolitos estables, tales como el N-acetato y glucurónido, sino también a una hidroxilamina potencialmente tóxica, que puede sufrir una oxidación adicional generando un metabolito nitroso. Se piensa que este metabolito nitroso es responsable de lesiones en los tejidos mediadas por un mecanismo inmune (Naisbitt y cols., 1999).

2.9.2. INTERACCIÓN CON TRANSPORTADORES ABC

La disponibilidad de bibliografía que nos permita relacionar los antibióticos del grupo de las sulfonamidas con los transportadores ABC es escasa.

El sulfametoxazol se ha descrito como un compuesto no sustrato de P-gp (Susanto y Benet, 2002). Su relación con otros transportadores como MRPs o ABCG2 se desconoce.

En la presente memoria analizaremos el sulfametoxazol como posible compuesto inhibidor del transporte mediado por ABCG2 en rumiantes.
3. OBJETIVOS

Con estos antecedentes establecidos, la presente memoria tiene como objetivo principal la caracterización *in vitro* de las diferencias interespecíficas y polimórficas en el transportador ABCG2. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1º- Estudios funcionales comparativos entre Abcg2 murina y ABCG2 humana

-Identificación *in vitro* de diversas fluoroquinolonas como sustratos del transportador ABCG2 utilizando Abcg2 murina y ABCG2 humana como modelos en estudios de transporte transepitelial.

-Caracterización de las diferencias interespecíficas en la potencia inhibitoria sobre ABCG2 de la fumitremorgina C mediante experimentos de acumulación de mitoxantrona y clorina e6, ensayos de citotoxicidad con mitoxantrona y topotecan y estudios de transporte transepitelial empleando nitrofurantoína y mitoxantrona.

2º- Caracterización *in vitro* de las diferencias funcionales entre ABCG2 ovina y ambas variantes de ABCG2 bovina.

- Establecimiento de modelos celulares para poder caracterizar y comparar los transportadores ABCG2 de origen ovino y bovino. Este estudio contempla la clonación del transportador ABCG2 ovino y la inclusión de las dos variantes del transportador bovino.

-Análisis de las diferencias funcionales interespecíficas y polimórficas utilizando los modelos celulares MEF3.8 y HEK293 generados en cuanto a capacidad de inhibición frente a compuestos de distinta naturaleza, tales como lactonas macrocíclicas (ivermectina y doramectina), flavonoides (equol) y antibióticos (tilmicosin y sulfametoxazol).

-Análisis de las diferencias entre ambas variantes del transportador ABCG2 bovino y su homólogo ovino utilizando células MDCKII para el transporte vectorial de compuestos de distinta naturaleza caracterizados por su presencia en leche, tales como antibióticos (nitrofurantoína), fluoroquinolonas (marbofloxacina, difloxacina, orbifloxacina, sarafloxacina y danofloxacina) y vitaminas (riboflavina).

63

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. COMPUESTOS ENSAYADOS

La nitrofurantoína, la marbofloxacina, la difloxacina, la danofloxacina, la ivermectina, la riboflavina, el sulfametoxazol, el tilmicosin y la mitoxantrona proceden de Sigma-Aldrich. El Ko143 (3-(6-isobutil-9-metoxi-1,4-dioxo-1,2,3,4,6,7,12,12a-octahidropirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indol-3-yl)-ácido propiónico éster ter-buril) fue adquirido a Tocris, la fumitremorgina C a Bioaustralis, la doramectina a Pfizer, la orbifloxacina y la sarafloxacina a Sequoia Research Products, el equol a LC Laboratories, la chlorina e6 a Frontier Scientific y el topotecan a Enzo.

4.2. LÍNEAS CELULARES

4.2.1. CÉLULAS MDCKII

Las células MDCKII (<u>Madin-Darby Canine Kidney Cells</u>) son células polarizadas de epitelio renal canino ampliamente utilizadas en experimentos de transporte transepitelial. Los subclones MDCKII-Abcg2 y MDCKII-ABCG2, previamente descritos por Pavek y cols. (2005), fueron suministrados por el Dr. Alfred H. Schinkel del *Netherlands Cancer Institute* de Holanda y se caracterizan por expresar, de manera estable, el transportador ABCG2 al estar transducidos con el cDNA del gen *Abcg2* de ratón y con el cDNA de *ABCG2* humano respectivamente. Los clones MDCKII-Y581 y MDCKII-S581 han sido recientemente generados en nuestro grupo de investigación mediante transducción con el cDNA de ambas variantes de *ABCG2* bovino (Real y cols., 2011b). En el transcurso de este trabajo de tesis doctoral también se generó el subclon MDCKII-oABCG2 transducido con *ABCG2* ovino (apartado 5.2).

Las células parentales y los subclones transducidos crecieron en las condiciones descritas por Merino y cols. (2005a). Así, se cultivaron a 37°C, en presencia de CO₂ al 5%, y empleando medio DMEM con GlutaMAXTM (*Life Technologies*), suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (*MP Biomedicals*), penicilina (50 U/ml) y estreptomicina (50 μ g/ml). Las células se subcultivaron mediante tripsinización cada tres o cuatro días.

4.2.2. CÉLULAS MEF3.8

Las células MEF3.8 son fibroblastos embrionarios inmortalizados obtenidos a partir de ratones triple knockout Mdr1a/b^{-/-}, Mrp1^{-/-} ampliamente utilizados en ensayos para el estudio de inhibición específica de ABCG2 (Pavek y cols., 2005). Tanto las células parentales como los subclones MEF3.8-Abcg2 y MEF3.8-ABCG2 fueron suministrados por el Dr. Alfred H. Schinkel del *Netherlands Cancer Institute* de Holanda. En el transcurso del presente trabajo de tesis doctoral también se generaron los subclones MEF3.8-S581 y MEF3.8-Y581 transducidos con dos variantes de *ABCG2* bovino y el subclon MEF3.8- oABCG2 transducido con *ABCG2* ovino (apartado 5.2).

Las células parentales y los subclones transducidos crecieron según las condiciones descritas por Jonker y cols. (2000). Así, se cultivaron a 37°C, en presencia de CO₂ al 5%, y empleando medio DMEM con GlutaMAXTM (*Life Technologies*), suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (*MP Biomedicals*), penicilina (50 U/ml) y estreptomicina (50 μ g/ml). Las células se subcultivaron mediante tripsinización cada tres o cuatro días.

4.2.3. CÉLULAS HEK293

Las células HEK293 son fibroblastos embrionarios humanos de riñón obtenidos mediante transformación y cultivo de células HEK con adenovirus 5. La transformación ocasiona la incorporación de aproximadamente 4,5 kilobases del genoma viral en el cromosoma humano número 19 de las células HEK. Estas células se utilizan para estudios de interacciones con transportadores ABC (Shukla y cols., 2009). Las células HEK293 parentales fueron suministradas por el Dr. Suresh Ambudkar del *National Cancer Institute* (NIH) de Estados Unidos. En el transcurso del presente trabajo de tesis doctoral también se generaron los subclones HEK293-S581 y HEK293-Y581 transducidos con las dos variantes de *ABCG2* bovino y el subclon HEK293- oABCG2 transducido con *ABCG2* ovino (apartado 5.2).

Las células parentales y los subclones transducidos crecieron según las condiciones descritas por Polgar y cols. (2004). Así, se cultivaron a 37°C, en presencia de CO_2 al 5%, y empleando medio EMEM (ATCC), suplementado con un 10% (v/v) de

suero fetal bovino (*MP Biomedicals*), penicilina (50 U/ml) y estreptomicina (50 μg/ml). Los subclones transducidos se mantuvieron en cultivo mediante selección con 2mg/ml de G418. Las células se subcultivaron mediante tripsinización cada tres o cuatro días.

4.2.4. CÉLULAS SBFF1

Los fibroblastos fetales ovinos (SBFF1) se emplearon para ensayos de expresión transitoria de ABCG2 ovina. Estas células fueron obtenidas a partir de fetos de ovejas de raza *Scottish Black Face* en el día 35 de gestación, en el laboratorio del Dr. McWhir en el Instituto Roslin de Edimburgo y han sido cedidas por la Dra. Margarita Marqués del Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) de la Universidad de León. Las células se cultivaron bajo las condiciones descritas por Marqués y cols. (2006). Así, se cultivaron en medio Glasgow (Sigma Aldrich) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 1 mM de aminoácidos no esenciales. Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ y se subcultivaron mediante tripsinización cada tres o cuatro días.

4.3. VECTORES DE EXPRESIÓN

Los vectores utilizados fueron:

-pCR[®]2.1-TOPO[®]: este vector está preparado para la clonación rápida y sencilla de productos de PCR. Se comercializa linearizado con extremos 3' salientes de timina y con la enzima topoisomerasa I covalentemente unida al vector. Dado que el producto obtenido de la PCR presenta extremos 3' salientes de adenina, esto va a permitir la ligación con los extremos salientes de timina del vector. En la figura 20 se muestra el mapa del vector, en el que aparece señalado el lugar en el que se inserta el producto de PCR.



Figura 20. Mapa del vector pCR®2.1-TOPO® utilizado en la clonación del gen de ABCG2 bovina.

-**pEF-1***a*-**IRES-GFP:** este plásmido tiene como base el plásmido **pEGFP-1***a* (Clontech). Este vector se modificó clonándose en el sitio de clonación múltiple (MCS), el promotor del gen del factor de elongación 1 α humano, y una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). Esta secuencia IRES permite generar un mRNA bicistrónico con el cDNA de interés y el cDNA que codifica la proteína fluorescente verde GFP (Figura 21). Este vector fue cedido por la Dra. Margarita Marqués del Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) de la Universidad de León.

-pLZRS-IRES-GFP: la base de este vector retroviral es el vector LZRSpMN-LacZ (Kinsella y Nolan, 1996). Este vector se modificó sustituyendo el gen *Lac-Z* por un MCS, seguido de una secuencia IRES y la secuencia codificante de la proteína GFP. Además contiene varios codones *stop* en los tres marcos de lectura. Este vector fue cedido por el Dr. A. H. Schinkel del *Netherlands Cancer Institute* de Holanda. En la figura 21 aparece el mapa del vector.



Figura 21. Mapa de los vectores $pEF1\alpha$ -IRES-GFP (izquierda) y pLZRS-IRES-GFP (derecha) utilizados en la generación de modelos celulares.

4.4. ESTUDIOS *IN VITRO* DEL TRANSPORTE BIDIRECCIONAL DE FÁRMACOS

Los ensayos de transporte se llevaron a cabo basándonos en el método de Huisman y cols. (2001), con pequeñas modificaciones. Este método nos da la posibilidad de trabajar con dos compartimentos estancos a ambos lados de la monocapa celular, el apical y el basal, lo que permite añadir el fármaco objeto de estudio a cualquiera de los dos lados de la monocapa celular, y analizar el transporte apical-basal (A-B) respecto al basal-apical (B-A) (Figura 22A). Así, en las líneas celulares que sobreexpresan un transportador, si un compuesto es sustrato de dicho transportador, el transporte en la dirección B-A es mayor que en la dirección opuesta. Por lo tanto, la comparación del transporte entre la línea celular parental y las transducidas puede utilizarse para identificar sustratos del transportador. Como comprobación de la implicación específica del transporte entre las direcciones B-A y A-B (Figura 23).

Las células MDCKII parentales y los subclones transducidos se sembraron a una densidad de 1 millón de células por inserto de 24 mm², en filtros de membrana porosos (3,0 μ m) de policarbonato de 6 pocillos (*Transwell* 3414; Costar, Corning) (Figura 22B). Las células se suplementaron con medio fresco cada día y los experimentos de transporte se realizaron en el día cuarto tras la siembra. La resistencia transepitelial se midió en cada pocillo empleando un ohmímetro *Millicell* (modelo ERS, Millipore)

utilizándose las células que registraron una resistencia de 200 ohm•cm² o superior, tras sustraer la resistencia obtenida en pocillos libres de células.

Entre una y dos horas antes de comenzar los experimentos de transporte, el medio en cada compartimento fue reemplazado por 2 ml de medio libre de suero Opti-MEM[®] (Invitrogen) o, en el caso de los experimentos con riboflavina, solución de transporte (Hanks' Balanced Salt solution (Sigma-Aldrich) suplementado con HEPES, NaHCO₃ y glucosa). Posteriormente, el transporte del compuesto se determinó tras la sustitución del medio en cada compartimento por el medio libre de suero, con y sin el fármaco a la concentración de estudio. Las células fueron incubadas a 37°C y con un 5% de CO₂; tras 2 y 4 horas se tomaron alícuotas de 100 µl del compartimento opuesto a la adición del compuesto, que posteriormente fueron almacenadas a -20°C hasta el momento del análisis. La cantidad de fármaco que apareció en el compartimento contrario se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según los métodos que se comentarán más adelante.

Además se comprobó la correcta funcionalidad de los cultivos utilizando un fármaco descrito como sustrato modelo de ABCG2, la nitrofurantoína (Merino y cols., 2005b) y añadimos un inhibidor específico, el Ko143 (Allen y cols., 2002) a ambos compartimentos basal y apical, para corroborar que el transporte bidireccional se debía únicamente a este transportador.

Una vez finalizados los experimentos se comprobó de nuevo la integridad de la monocapa a través de mediciones de la resistencia transepitelial.



Figura 22. A Estructura del pocillo con los dos compartimentos. B Foto de un inserto *Transwell* empleado para los estudios de transporte con células epiteliales.



Figura 23. Esquema de los estudios de transporte utilizando nitrofurantoína como modelo de sustrato de ABCG2 en líneas celulares MDCKII y MDCKII- Abcg2 en ausencia o presencia del inhibidor específico de ABCG2 Ko143 a la concentración de 1 μ M.

Los coeficientes de permeabilidad aparente Papp (cm/s) en ambas direcciones apical-basal (AB) (Papp A-B) y basal-apical (BA) (Papp B-A) se determinaron según la ecuación:

$$Papp = \frac{\Delta Q}{\Delta t} x \frac{1}{AxC_o}$$

 $\Delta Q/\Delta t$: Velocidad de aparición del fármaco en el compartimento receptor, obtenido a partir del valor de la pendiente de la recta de regresión de transporte del fármaco a través de la monocapa y el tiempo.

C₀: Concentración inicial del fármaco en el lado donante.

A: Superficie de la monocapa $(4,67 \text{ cm}^2)$.

4.5. ENSAYOS DE ACUMULACIÓN DE FÁRMACOS

Los ensayos de acumulación *in vitro* se realizaron según lo descrito por Pavek y cols. (2005) y Merino y cols. (2006). En estos experimentos, el fármaco se acumula dentro de las células que no expresan el transportador; sin embargo, en las células que lo sobreexpresan, esta acumulación disminuye, si el compuesto es sustrato de ABCG2 (Figura 24). La inhibición de ABCG2 aumenta la acumulación del compuesto sustrato en los cultivos, aumentando por tanto la fluorescencia dentro de las células.

Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos $(3-5x10^4 \text{ células/pocillo})$, en medio completo, durante 36 horas hasta subconfluencia. Antes del experimento, se lavaron dos veces con PBS y se preincubaron durante 60 min en medio libre de suero Opti-MEM[®] (Invitrogen) adicionado con el compuesto inhibidor a estudiar. Posteriormente se añadió la mitoxantrona (10 μ M) o la clorina e6 (50 μ M) como sustrato y, tras 1 hora de incubación, la acumulación del sustrato se detuvo lavando las células con PBS frío. Las células se tripsinizaron, se resuspendieron en una mezcla de PBS y suero fetal bovino al 2,5%, se centrifugaron y, finalmente, se resuspendieron en PBS con suero fetal bovino al 2,5%. La acumulación relativa de mitoxantrona o chlorina e6 se determinó en un citómetro Cyan ADP cuantificándose los valores de fluorescencia de 5000 células y representando dichos valores mediante histogramas. Las longitudes de onda utilizadas tanto para la mitoxantrona como para la clorina e6 fueron

635 nm (excitación) y 650 nm (emisión). Experimentos previos demostraron la ausencia de fluorescencia para los inhibidores. Los datos obtenidos por citometría se procesaron y analizaron con un software WinMDI versión 2.8.

Para comparar y cuantificar la inhibición producida sobre ABCG2 por los compuestos ensayados se calculó la potencia inhibitoria comparando la mediana de las unidades de fluorescencia (MF) obtenida para cada fármaco en las células que expresaban ABCG2 con la obtenida en las que se incubaron con el inhibidor Ko143, de acuerdo con la siguiente ecuación:

Potencia inhibitoria (%) = $\frac{\text{MF con inhibidor} - \text{MF sin inhibidor}}{\text{MF con Ko143} - \text{MF sin inhibidor}} \times 100$

A partir de los datos obtenidos en el ensayo de acumulación se calculó el valor de IC_{50} , es decir, la concentración necesaria de fármaco para inhibir el transporte de mitoxantrona al 50%. Para ello se empleó el software Simfit versión 5.7 edición 2. Se introdujeron los datos correspondientes al porcentaje de actividad (100 – porcentaje de inhibición) y se realizó el ajuste suponiendo una cinética de Michaelis-Menten.



Figura 24. Esquema de los estudios de acumulación de fármacos para la identificación de sustratos e inhibidores de ABCG2. La acumulación del fármaco fluorescente se cuantifica mediante citometría de flujo (Calcagno y cols., 2007).

4.6. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se realizaron según lo descrito por Chearwae y cols. (2004). Así, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos $(6-10x10^3 \text{ células/pocillo})$ en medio completo durante 24 horas. Posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones del compuesto (mitoxantrona 0,1-500 µM o topotecan 0,01-250 µM) distribuidas a lo largo del eje de la placa y se incubaron durante 24 horas para las células MDCKII y MEF3.8 y 72 horas para las células MDCKII y HEK293. A continuación, se cuantificó la proliferación celular mediante MTT para las células MDCKII y HEK293 o CyQuant (Invitrogen) para las células MEF3.8.

El ensayo de MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) es uno de los ensayos más comúnmente utilizados para la cuantificación de viabilidad celular y está basado en la actividad mitocondrial. Este compuesto será únicamente reducido en forma de cristales azules oscuros en las células vivas. Este método fue inicialmente descrito y validado en varios tipos celulares por Mosmann (1983) y ha sido, posteriormente, utilizado en ensayos de citotoxicidad con células que sobreexpresan ABCG2 (Rivers y cols., 2008; Zheng y cols., 2009). Para cuantificar la proliferación celular, se preparó una solución de MTT en PBS a 5 mg/ml, realizando posteriormente una dilución 1:10 en Opti-MEM (Invitrogen). A continuación, se añadieron 200 µl/pocillo de esta última solución y se incubó durante 3 horas, tiempo durante el que el MTT es reducido por las células vivas a formazán. Se eliminó el medio y se añadieron 200 µl de DMSO/pocillo para disolver los complejos MTT-formazán. Después de homogeneizar, se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de microplaca (BioTek, Sinergy HT) utilizando el software KC4. Esta medida es directamente proporcional a la reducción del MTT, y por tanto resulta una medida indirecta de la viabilidad celular.

El ensayo con CyQuant (Invitrogen) también ha sido descrito con anterioridad (Allen y cols., 2000; Allen y cols., 2002) y está basado en la cuantificación del ADN celular mediante la unión de un compuesto fluorescente, siendo dicha unión proporcional al nivel de proliferación celular. Para cuantificar la proliferación celular se preparó 1X *Dye Binding solution* según las instrucciones del fabricante, se añadieron 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora. A continuación, se midió la fluorescencia a

485nm (excitación) y 530nm (emisión) en un lector de microplaca (BioTek, Sinergy HT) utilizando el software KC4.

El valor de IC_{50} representa la concentración de fármaco capaz de reducir la viabilidad celular en un 50% y se determinó a partir de la curva sigmoidea resultante de representar el porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración del fármaco utilizando el programa GraphPad Prism (versión 4.00, GraphPad Software, San Diego, CA).

En el caso de los estudios de inhibición con fumitremorgina C, se incluyó el cálculo del valor de EC_{90} . Este representa la concentración de inhibidor capaz de reducir en un 90% la resistencia a un fármaco y, por lo tanto, implica que las células sean diez veces más sensibles a un fármaco sustrato de ABCG2. Para el cálculo de EC_{90} se realizó un ensayo de citotoxicidad modificado según el procedimiento descrito por Allen y cols. (2002). Así, las células se incubaron con una serie de concentraciones del inhibidor fumitremorgina C (0,1-20 μ M) en presencia de un sustrato de ABCG2 (topotecan o mitoxantrona) a una concentración equivalente al 10% de su valor de IC₅₀, habiendo calculado previamente dicho índice. Posteriormente, se representó el porcentaje de viabilidad celular en función de las distintas concentraciones empleadas del inhibidor utilizando el programa GraphPad Prism (versión 4.00, GraphPad Software, San Diego, CA). La concentración de inhibidor que produzca una reducción del 50% en la viabilidad celular, en las condiciones descritas, se corresponderá con el valor de EC₉₀, ya que representa una reducción del 90% del valor inicial de IC₅₀ calculado para el sustrato de ABCG2.

4.7. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

4.7.1. INSTRUMENTACIÓN

Se utilizó un cromatógrafo líquido-líquido *Waters*, formado por los siguientes módulos:

-Bomba de doble pistón con velocidad de flujo, temperatura y gradiente programables *Waters*TM (modelo 600E).

-Desgasificador *Waters*TM (modelo DG2).

-Inyector automático *WatersTM* (modelo 717plus).

-Detector de longitud de onda variable ultravioleta-visible modelo *WatersTM* 2487.

-Detector de fluorescencia WatersTM 474.

-Registrador-integrador Pentium III. La integración se realizó mediante el programa de software *Waters Empower*® en todos los casos.

4.7.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Para el análisis de las muestras de los ensayos de transporte, éstas no se procesaron previamente y se inyectaron 100 μ l de medio de cultivo directamente en el sistema cromatográfico.

Las condiciones para el análisis por HPLC de las **fluoroquinolonas** se basaron en métodos previamente publicados (Idowu y Peggins., 2004; Marazuela y Moreno-Bondi., 2004). La fase móvil estuvo compuesta por ácido ortofosfórico 25 mM (pH 3,0)/acetonitrilo (77:23). El flujo de la fase móvil fue de 1,5 ml/min para la marbofloxacina y la difloxacina y de 1,0 ml/min para la orbifloxacina, la sarafloxacina y la danofloxacina. La detección se realizó a una longitud de onda de 278 nm y a una temperatura de análisis de 25°C. Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa Synergi Hydro-RP 80A (Phenomenex) (tamaño de partícula de 4 μ m y 250 x 4,6 mm). Las áreas de los picos se compararon con rectas patrones cuyos rangos fueron de 0,16 μ g/ml a 10 μ g/ml para las muestras de la danofloxacina y de 0,16 μ g/ml a 5 μ g/ml para el resto de las fluoroquinolonas. Los tiempos de retención fueron 7 minutos para la marbofloxacina, 4,5 minutos para la difloxacina, 6 minutos para la orbifloxacina y 8 minutos para la sarafloxacina y la danofloxacina.

Las condiciones para el análisis por HPLC de la **riboflavina** se basaron en métodos previamente publicados (van Herwaarden y cols., 2007). La fase móvil estuvo compuesta por acetato amónico 50mM (pH 5,0)/metanol (60:40) y el flujo de la fase móvil fue de 1,0 ml/min. La detección se realizó por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 372 nm y 520 nm de emisión y a una temperatura de análisis de 25 °C. Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa Synergi Hydro-RP 80A (Phenomenex) (tamaño de partícula de 4 µm y 250 x 4,6 mm). Las áreas de los

picos se compararon con rectas patrones cuyos rangos fueron de 0,0006 μ g/ml a 0,3 μ g/ml. El tiempo de retención para la riboflavina fue de 5 minutos.

Las condiciones para el análisis por HPLC de la **mitoxantrona** se basaron en métodos previamente publicados (Johnson y cols., 2004). La fase móvil estuvo compuesta por acetato amónico 0,5M (pH 3,0)/metanol (50:50) y el flujo de la fase móvil fue de 1,0 ml/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 245 nm y a una temperatura de análisis de 25°C. Como fase estacionaria se utilizó una columna Nucleosil 120 C18 (Scharlau) (tamaño de partícula de 10 μ m y 25 x 0.46 mm). Las áreas de los picos se compararon con rectas patrones cuyos rangos fueron de 0,25 μ g/ml a 10 μ g/ml. El tiempo de retención para la mitoxantrona fue de 3,7 minutos.

Las condiciones para el análisis por HPLC de la **nitrofurantoína** se basaron en el método de Gerk y cols. (2001), previamente publicado. La fase móvil estuvo compuesta por buffer fosfato potásico 25 mM (pH 3,0)/metanol (78:22). El flujo de la fase móvil fue de 1,5 ml/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 366 nm y a una temperatura de análisis de 25°C. Como fase estacionaria se utilizó una columna Nucleosil 120 C18 (Scharlau) (tamaño de partícula de 10 μ m y 25 x 0.46 mm). Las áreas de los picos se compararon con la recta patrón cuyo rango fue de 0,04 μ g/ml a 5 μ g/ml. El tiempo de retención para la nitrofurantoína fue de 9 minutos.

4.7.3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS

La valoración de los fármacos se realizó en cada medio de cultivo, sobre soluciones patrones de concentraciones crecientes. Mediante una regresión lineal de la representación gráfica de las concentraciones (μ g/ml) en el eje de las ordenadas, frente a las áreas de los picos cromatográficos correspondientes, en el eje de las abscisas, se obtuvieron las rectas de calibración para cada uno de los fármacos estudiados y los coeficientes de correlación r² representativos de la linealidad del análisis.

Los intervalos de concentraciones, las rectas de calibración de cada fármaco y sus coeficientes de correlación se indican en las Tabla 2.

	Concentración	Recta de calibración	Coeficiente
MARBOFLOXACINA	0,16µg/ml-5µg/ml	$y = 10,44 \cdot 10^{-6} x + 0,122401$	$r^2 = 0,99$
DIFLOXACINA	0,16µg/ml-5µg/ml	$y = 4,49 \cdot 10^{-6} x + 0,139516$	$r^2 = 0,99$
ORBIFLOXACINA	0,16µg/ml-5µg/ml	$y = 7,46 \cdot 10^{-6} x + 0,094600$	$r^2 = 0,99$
SARAFLOXACINA	0,16µg/ml-5µg/ml	$y = 6,70^{-1}0^{-6} x + 0,140965$	$r^2 = 0,99$
DANOFLOXACINA	0,16µg/ml-10µg/ml	$y = 4,10^{-1}0^{-6} x + 0,098835$	$r^2 = 0,99$
RIBOFLAVINA	0,0006µg/ml-0,3µg/ml	$y = 0,13 \cdot 10^{-6} x - 0,000144$	$r^2 = 0,99$
MITOXANTRONA	0,25µg/ml-10µg/ml	$y = 7,50^{\circ}10^{-6} x + 0,233433$	$r^2 = 0,99$
NITROFURANTOÍNA	0,04µg/ml-5µg/ml	$y = 7,47 \cdot 10^{-6} x + 0,044921$	$r^2 = 0,99$

 Tabla 2. Rectas de calibración en los intervalos de concentración estudiados para cada fármaco en medio de cultivo junto con los coeficientes de correlación.

4.8. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA CLONACIÓN DE DNA

4.8.1. AISLAMIENTO DE RNA A PARTIR DE TEJIDO

Para la extracción de RNA se utilizó el reactivo TRI *Reagent* (Ambion). Este reactivo es una combinación de inhibidores de RNAsas y agentes desnaturalizantes que permiten separar en un solo paso RNA, DNA y proteínas. Este método está basado en una modificación del método de Chomczynski (1993).

El procedimiento se realizó según las instrucciones del fabricante:

-Se tomaron muestras de hígado de ovejas de matadero *in situ* y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, para conseguir una congelación rápida y homogénea de todo el tejido. En el momento de la extracción se descongelaron en hielo y se homogeneizaron en 10-20 volúmenes del reactivo TRI *Reagent*.

-Añadimos 200 µl de cloroformo por cada ml de TRI *Reagent* y agitamos con suavidad durante 15 segundos (el cloroformo facilita la disrupción de las proteínas).

-Incubamos 10 minutos a temperatura ambiente.

-Centrifugamos a 12.000g durante 10 minutos a 4°C; tras la centrifugación transferimos la fase acuosa a un tubo *eppendorf* limpio. Esta centrifugación permite separar tres fases: las proteínas, que quedan retenidas en la fase orgánica; el DNA, que queda atrapado en la interfase y el RNA que ocupa la fase acuosa.

-Añadimos 500 µl de isopropanol por cada ml de TRI *Reagent* y agitamos 15 segundos con suavidad (el isopropanol se utiliza para precipitar el RNA de la fase acuosa).

-Incubamos 10 minutos a temperatura ambiente.

-Centrifugamos a 12.000g durante 10 minutos a 4°C; tras la centrifugación descartamos la fase acuosa y nos quedamos con el *pellet*.

-Lavamos el pellet con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de TRI Reagent.

-Centrifugamos a 7.500g durante 5 minutos. Tras la centrifugación, eliminamos bien el sobrenadante y dejamos que se secara el pellet.

-Resuspendemos el RNA en 100 μl de agua DEPC. Las muestras se almacenan a -80°C hasta el momento del análisis.

Una vez extraídas las muestras, se comprueba la integridad del RNA mediante electroforesis en geles de agarosa.

La cuantificación de la concentración de RNA de las muestras se realizó por espectrometría en función de su absorbancia a 260 nm y teniendo en cuenta la siguiente equivalencia: *1 unidad* A_{260} equivale a 40 µg/ml de RNA. Este método permite además conocer el grado de pureza de las preparaciones a partir de la relación entre los valores de absorbancia medidos a 260 y 280 nm. Una muestra pura de RNA presenta una relación que oscila entre 1,8 y 2,2. Valores inferiores a 1,8 indican contaminación por proteínas.

4.8.2. AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DEL cDNA DE ABCG2 OVINA

Una vez extraído el RNA, se transcribió 1 µg a cDNA utilizando el sistema *ThermoscriptTM First Strand Synthesis System* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se amplificó por PCR utilizando primers específicos para el gen *ABCG2* bovino, ya que en aquel momento no se disponía de la secuencia ovina en las bases de datos, y empleando la DNA polimerasa de alta fidelidad *Platinum Pfx DNA polymerase* (Invitrogen). Los primers fueron diseñados de acuerdo con la secuencia bovina disponible en aquel momento (*GenBank accession* no. AJ871176):

5'-GAAGGCGGAAATGCTCAAAATGTCTTCC-3'; 5'-ACTGAAATTAAAGAGGA ATTTAAG-3'. La composición de la mezcla de reacción empleada por cada reacción fue: 27,6 μ l de agua MiliQ, 10 μ l 10X *Pfx Amplification Buffer*, 6 μ l 2,5 mM *dNTP mixture*, 1 μ l 50 mM MgSO₄, 1,5 μ l *Forward primer* 10 μ M, 1,5 μ l *Reverse primer* 10 μ M, 2 μ l DNA y 0,4 μ l *Platinum polymerase*. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos, cada uno con 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C y 2 minutos a 68°C; al final de los 35 ciclos se incluyó un período de extensión de 7 minutos a 68°C. Una vez obtenido el producto de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar que se obtenía un solo producto.

4.8.3. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA

Los geles se prepararon disolviendo agarosa en tampón TAE 1X y añadiendo bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml, para poder visualizar los ácidos nucleicos mediante iluminación del gel con luz ultravioleta. Para preparar las muestras, se mezclaron con tampón de carga 10X en una proporción 1:10. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories) y los geles se fotografiaron con el programa Bio-Capt V97 (Vilber Lourmat). El marcador de tamaño molecular incluido en los geles fue *1Kb plus DNA ladder* (Invitrogen).

La purificación de fragmentos de DNA, a partir del gel de agarosa, para su posterior clonación se llevó a cabo con la ayuda del sistema comercial "*QIAquick Gel Extraction Kit*" (Quiagen), siguiéndose las indicaciones del fabricante.

4.8.4. CLONACIÓN DE DNA

4.8.4.1. Clonación de productos de PCR

Se realizó por el procedimiento "*TA Cloning*" utilizando el kit *TOPO TA*[®] *Cloning kit.* La reacción de clonación en el vector $pCR^{\mathbb{R}}2.1$ -TOPO[®] se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 6 μ l conteniendo solución salina, agua, el producto de la PCR y el vector TOPO[®]. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y a continuación se transfirió a hielo. El producto de la reacción se empleó para transformar bacterias competentes.

4.8.4.2. Transformación de bacterias competentes con DNA recombinante

Se utilizaron bacterias *E. coli* competentes comerciales (*Subcloning Efficiency* $DH5a^{TM}$ Competent Cells, Invitrogen). La transformación se realizó mediante choque térmico, según las instrucciones del proveedor.

-Descongelamos una alícuota de bacterias competentes (50 µl) en hielo.

-Añadimos entre 0,1-1 µg DNA y lo mantuvimos 30 minutos en hielo.

-Sometimos a las bacterias a un choque térmico a 37°C durante 20 segundos para permitir la entrada del DNA.

-Mantuvimos las bacterias en hielo 2 minutos.

-Añadimos 950 µl de medio LB e incubamos 1 hora a 37°C con agitación (220 rpm) con el fin de que las bacterias que hubieran incorporado el plásmido expresaran el gen de resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección.

-Sembramos 50-100 µl del cultivo en placas de LB conteniendo el antibiótico utilizado para la selección de transformantes.

-Incubamos a 37°C toda la noche.

4.8.4.3. Análisis de transformantes

A. Aislamiento de plásmidos transformantes de Escherichia coli

Se realizaron minipreparaciones de DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y Russell (2001) con algunas modificaciones. El procedimiento a seguir se describe a continuación:

-Inoculamos un cultivo de 3-5 ml de medio LB (conteniendo el antibiótico para el cual confiere resistencia el plásmido), con una colonia de bacterias de *E. coli*

transformadas con el plásmido de interés. Incubamos toda la noche a 37°C con agitación (220 r.p.m.).

-Transferimos 1,5 ml del cultivo a un tubo de microcentrífuga *eppendorf*. Recogimos las bacterias por centrifugación a 5.500g durante 5 minutos.

-Eliminamos el LB y resuspendimos el *pellet* de bacterias en 100 µl de solución tampón (50 mM D-glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, preparada en agua Mili-Q).

-Añadimos 200 µl de la solución de lisis (0,2 N NaOH, 1% SDS en agua Mili-Q). Mezclamos por inversión e incubamos un máximo de 5 minutos a temperatura ambiente.

-Añadimos 150 µl de la solución de neutralización pre-enfriada. Mezclamos por inversión e incubamos 10 minutos en hielo. La solución de neutralización está compuesta por 60 ml de acetato potásico 5M pH 5,8, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua destilada para un volumen de 100 ml.

-Centrifugamos 10 minutos a 12.000g. Transferimos el sobrenadante, que contiene el DNA plasmídico, a un tubo *eppendorf* limpio.

-Precipitamos el DNA con 300 µl de isopropanol a temperatura ambiente.

-Agitamos suavemente e incubamos 2 minutos a temperatura ambiente.

-Centrifugamos 15 minutos a 12.000g. Eliminamos el isopropanol con una micropipeta.

-Lavamos el precipitado de DNA con 100 μ l de etanol al 70% y centrifugamos 5 minutos a 1.200g.

-Eliminamos cuidadosamente el etanol con una micropipeta y dejamos evaporar los restos de etanol.

-Resuspendimos el DNA plasmídico en 50 μ l de tampón TE al que previamente añadimos Ribonucleasa A a una concentración de 20 μ g/ml.

Para la obtención de preparaciones de DNA plasmídico a gran escala se utilizó el sistema *QUIAGEN Plasmid Purification Kit* (Quiagen) siguiendo las recomendaciones

del fabricante. Este sistema se basa en una modificación del método de lisis alcalina y utiliza una resina de intercambio aniónico contenida en una columna para la purificación del DNA.

B. Análisis de restricción del DNA plasmídico

Las endonucleasas de restricción fueron utilizadas siguiendo las recomendaciones del fabricante (Fermentas). Para ello, en un tubo *eppendorf* se preparó una mezcla con los siguientes componentes:

-Agua Mili-Q estéril hasta completar el volumen final de reacción.

-Tampón de digestión de la enzima a concentración 1X.

-DNA

-Enzima de restricción (2,5 UI/µg DNA, dependiendo de la enzima). El volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción, debido a que la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas podría inhibir la reacción, o bien, desencadenar la actividad *star* de la enzima.

4.8.4.4. Creación de extremos romos

Para la creación de extremos romos en el DNA, mediante relleno de extremos 3'hidroxilo recesivos generados por endonucleasas de restricción, se empleó el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*. El protocolo es el siguiente:

-Preparamos la siguiente mezcla de reacción en un tubo *eppendorf* (volumen final 50 μl): DNA plasmídico digerido, tampón de reacción 1X, 33 μM desoxinucleótidos trifosfato, enzima *Klenow* (1 UI/μg de DNA), agua Mili-Q.

-Incubamos la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente.

-Inactivamos la enzima añadiendo EDTA (concentración final 10 mM).

4.8.4.5. Desfosforilación de extremos 5'

Se utilizó la enzima fosfatasa alcalina SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*), siguiendo el protocolo que se indica a continuación:

-Preparar la siguiente mezcla de reacción en un tubo *eppendorf* (volumen final 50 μl): DNA plasmídico digerido, tampón de reacción 1x, 1 unidad de enzima SAP, agua Mili-Q.

- Incubar la reacción a 37°C durante 30 minutos. Añadir de nuevo 1 unidad de enzima.

-Incubar la reacción a 37°C durante 30 minutos más.

-Inactivar la enzima por calentamiento a 65°C durante 15 minutos.

4.8.4.6. Ligación de fragmentos de DNA

La ligación entre fragmentos de DNA es catalizada por la DNA ligasa del fago T4. Esta enzima es la responsable de las uniones fosfodiéster entre los extremos 3'hidroxilo y 5'-fosfato del DNA de doble cadena, y requiere Mg^{2+} y ATP como cofactores.

Las reacciones se llevaron a cabo con el sistema *Rapid DNA Ligation kit* (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad de DNA que puede ser ligada con este sistema, a temperatura ambiente, en 5 minutos, no debe exceder los 200 ng. El ratio molar de DNA de vector e inserto utilizado fue 1:5. Las cantidades de DNA se determinaron mediante la siguiente fórmula: ng Inserto/Kb Inserto = (ng Vector/Kb Vector) x ratio inserto: vector.

Se utilizó 1/10 del volumen de la reacción de ligación para la transformación de bacterias competentes.

4.9. TRANSFECCIÓN

El método empleado para la introducción de DNA en las células varía en función de si se quiere obtener temporalmente un alto nivel de expresión del transgén (transfección transitoria) o si queremos que el DNA de interés se integre de forma estable en el genoma de la célula (transfección estable).

4.9.1. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE FIBROBLASTOS FETALES OVINOS (SBFF1)

Para expresar en células, de forma transitoria, las dos variantes de ABCG2 bovina y ABCG2 ovina, se llevaron a cabo transfecciones mediadas por liposomas. Las células fueron transfectadas con los plásmidos pEF1 α -S581ABCG2-IRES-GFP, pEF1 α -Y581ABCG2-IRES-GFP y pEF1 α -oABCG2-IRES-GFP, en su forma circular, utilizando *LIPOFECTAMINE*TM 2000 (Invitrogen), formulación comercial a base de lípidos policatiónicos, según las instrucciones del fabricante. Las células utilizadas fueron fibroblastos fetales ovinos (SBFF1), que se sembraron 24 horas antes de la transfección en placas de 12 pocillos a una densidad de 104.000 células/pocillo, para conseguir una confluencia del 80% en el momento de la transfección.

Para cada pocillo se prepararon un par de tubos *eppendorf* con 100 µl de medio libre de suero Opti-MEM[®] (Invitrogen). En uno de ellos se diluyeron 1,6 µg de DNA y en el otro 4 µl de *LIPOFECTAMINE*TM 2000. Ambas soluciones se mezclaron y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos DNA-liposomas. Unos minutos antes de que finalizara la incubación, se retiró el medio de cultivo de las células y se sustituyó por 0,5 ml/pocillo de medio Opti-MEM[®]. Una vez transcurridos los 20 minutos, se añadió a las células el medio que contenía los complejos DNA-liposomas y se incubó durante 5 horas a 37°C. Pasado este tiempo, a cada pocillo se le añadió 1 ml de medio completo con un 20% de suero fetal bovino. El medio se reemplazó al día siguiente y a partir de las 24 horas de la transfección se realizaron los ensayos funcionales correspondientes.

4.9.2. GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES

4.9.2.1. Subclones MDCKII y MEF3.8

El método empleado se basa en el descrito por Michiels y cols. (2000) con pequeñas modificaciones y utiliza el sistema de producción retroviral *Phoenix* (Nolan y Shatzman, 1998). Estas células empaquetadoras derivan de un subclon altamente transfectable de células 293, establemente transformadas con el antígeno SV40 T y los componentes del virus de leucemia murina. Las células se cultivaron en DMEM (Sigma Aldrich) suplementado con un 10% de suero fetal bovino y 1 mM de piruvato de sodio; se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂. El proceso de transfección e infección tuvo una duración de 6 días (Figura 25) y se emplearon los vectores retrovirales pLZRS-oABCG2-IRES-GFP para las MDCKII y pLZRS-Y581ABCG2-IRES-GFP, pLZRS-S581ABCG2-IRES-GFP y pLZRS-oABCG2-IRES-GFP para las MEF3.8.

<u>Día 1:</u>

Sembramos 90.000 células Phoenix/cm² en placas p100, en medio completo, y las dejamos crecer 24 horas.

<u>**Día 2:**</u> Transfección de las células Phoenix utilizando el kit *Calphos Mammalian Transfection Kit* (Clontech), según las instrucciones del fabricante.

-Retiramos el medio de las placas y lo reemplazamos por 5 ml de medio fresco con cloroquina a una concentración de 5 μ M (la cloroquina mejora la transfección).

-Colocamos las células en el incubador.

-Preparamos la mezcla para la transfección en tubos *eppendorf*; añadimos en este orden: agua, DNA (10 μ g) y 62 μ l de solución de CaCl₂ 2M hasta completar un volumen final de 500 μ l. A continuación, añadimos 500 μ l del tampón HBS 2X gota a gota, mientras agitamos en un vórtex y lo dejamos incubar 20 minutos a temperatura ambiente, para que se formaran los complejos DNA-Ca²⁺.

-Sacamos las células del incubador y les añadimos la mezcla de transfección, gota a gota, moviendo la placa en círculos.

-Colocamos las células en el incubador e incubamos durante 8 horas con los precipitados de DNA.

-A continuación retiramos el medio, lavamos las células dos veces con el propio medio de cultivo y añadimos 5 ml de medio fresco.

Sembramos células MDCKII a una densidad de 1.300 células/cm² y células MEF3.8 a una densidad de 3.000 células/cm² en placas p100, para que a las 48 horas estuvieran entre un 50-60% confluentes.

Día 3: 24 horas post-transfección

Aspiramos el sobrenadante de los cultivos con una jeringa de 10 ml y una aguja de 18G, lo filtramos con un filtro de 0,22 µm en un tubo de polipropileno estéril de 15 ml y lo congelamos a -80°C. A continuación añadimos medio fresco a las células Phoenix para que continuara la producción de partículas retrovirales.

Día 4: 48 horas post-transfección

-Eliminamos el medio de las células MDCKII (50-60% confluentes).

-Procesamos el sobrenadante de las células Phoenix del mismo modo al descrito, pero una vez filtrado, lo añadimos directamente a la placa con las células MDCKII o MEF3.8 junto con 5 μl de polibreno (6 mg/ml) para favorecer la transducción.

-Incubamos las células durante 5 horas. Transcurrido este tiempo añadimos 5 ml más de medio de cultivo.

Día 5: 72 horas post-transfección

Infectamos de nuevo a las células MDCKII y MEF3.8 con el sobrenadante retroviral que habíamos recogido y congelado en el día 3; añadimos de nuevo polibreno, incubamos 5 horas y añadimos otros 5 ml de medio de cultivo.

Día 6: 96 horas post-transfección

Tripsinizamos las células y sembramos 10 placas p100 a densidad clonal (5 placas con 18 células/cm² y el resto con 9 células/cm²) en el caso de las células MDCKII, y 10 placas p200 a densidad clonal (3 placas con 24 células/cm² y el resto con 12 células/cm²) en el caso de las células MEF3.8, con el objetivo, en ambos casos, de permitir la formación de clones aislados. Cultivamos las células entre 7 y 10 días para que formaran clones y crecieran hasta alcanzar un tamaño suficiente como para poder ser tripsinizados, cambiando el medio cada 3 ó 4 días aproximadamente.

Día 1: preparación de las células Phoenix 90.000 células/cm²

Día 2: transfección (vectores retrovirales)



Figura 25. Representación esquemática del proceso de transducción de las células MDCKII y MEF3.8

Mediante observación al microscopio de fluorescencia seleccionamos clones aislados GFP positivos y con un tamaño adecuado; a continuación se procedió a tripsinizarlos, colocando un cilindro autoclavado de 0,5 cm de diámetro sobre cada clon marcado, y sellándolo con grasa de caballo autoclavada. Añadimos 20 µl de tripsina dentro de cada cilindro y PBS sobre la placa para que no se secara. Una vez tripsinizadas, añadimos 20 µl de medio y transferimos la suspensión celular a un pocillo de placa de 96, al que habíamos añadido previamente 100 µl de medio. A continuación quitamos los cilindros y lavamos bien la placa con PBS para eliminar los restos de grasa y añadimos medio fresco para que el resto de clones siguieran creciendo.

Al día siguiente, cambiamos el medio de la placa de 96 pocillos y dejamos crecer los clones hasta alcanzar confluencia. Posteriormente, se subcultivaron a pocillos de mayor superficie con el fin de expandir los cultivos (placa 96, 48, 24, etc.) hasta obtener un número suficiente de células para poder analizarlos y crioconservarlos.

4.9.2.2. Subclones HEK293

Para expresar en las células HEK293, de forma estable, las dos variantes de ABCG2 bovina y la ABCG2 ovina, se llevaron a cabo transfecciones mediadas por liposomas. Las células fueron transfectadas con los plásmidos pEF1 α -S581ABCG2-IRES-GFP, pEF1 α -Y581ABCG2-IRES-GFP y pEF1 α -oABCG2-IRES-GFP, en su forma circular, utilizando *LIPOFECTAMINE*TM 2000 (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron 24 horas antes de la transfección en placas p100 a una densidad de 6x10⁶ células/placa, para conseguir una confluencia del 80% en el momento de la transfección.

Para cada placa se prepararon un par de tubos *falcon* con 1,5 ml de medio libre de suero Opti-MEM[®] (Invitrogen). En uno de ellos se diluyeron 15 µg de DNA y en el otro 37,5 µl de *LIPOFECTAMINE*[™] 2000. Ambas soluciones se mezclaron y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos DNA-liposomas. Unos minutos antes de que finalizara la incubación, se retiró el medio de cultivo de las células y se sustituyó por 7 ml/pocillo de medio Opti-MEM[®]. Una vez transcurridos los 20 minutos, se añadió a las células el medio que contenía los

complejos DNA-liposomas y se incubó durante 5 horas a 37°C. Pasado este tiempo, a cada placa se le añadieron 10 ml de medio completo con un 20% de suero fetal bovino. Al día siguiente, tripsinizamos las células y sembramos 10 placas p100 a una densidad de 500 células/cm². El medio se reemplazó 24 horas después y se añadieron 2 mg/ml de G418 para seleccionar las células que habían incorporado el plásmido. Cultivamos las células entre 15 y 20 días para que formaran clones y crecieran hasta alcanzar un tamaño suficiente como para poder ser tripsinizados, cambiando el medio cada 3 ó 4 días aproximadamente.

Mediante observación al microscopio de fluorescencia seleccionamos clones aislados GFP positivos y con un tamaño adecuado y se procedió del mismo modo que en el caso de la transducción de células MDCKII y MEF3.8.

4.10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

4.10.1. INMUNOCITOQUÍMICA

Se realizaron estudios inmunocitoquímicos en las células MDCKII y MEF3.8 de acuerdo con el método de Matsushima y cols. (2005) con pequeñas modificaciones. Cuarenta y ocho horas antes de realizar el análisis sembramos las células en placas de 6 pocillos, sobre cubreobjetos estériles de 2 cm de lado, a una densidad de 2 x 10^5 células/pocillo, en medio completo, y las dejamos crecer hasta subconfluencia. A continuación retiramos el medio, lavamos dos veces con PBS y las fijamos con metanol frío (-20°C) durante 10 minutos, lavando posteriormente con PBS. Ya que el epítopo que reconoce el anticuerpo contra ABCG2 se encuentra en la parte interna de la membrana plasmática, permeabilizamos la membrana incubando con tritón-X 100 al 1% durante 10 minutos, seguido de tres lavados con PBS y un último lavado con PBS-Tween al 0,5%. Seguidamente, incubamos con el anticuerpo primario anti-Abcg2 (BXP-53, Monosan, anticuerpo frente a ratón desarrollado en rata), a una dilución 1:50, durante toda la noche a 4°C en ambiente húmedo. Tras retirar el anticuerpo, lavamos de nuevo tres veces con PBS. Realizamos un último lavado con PBS-Tween al 0,5% e incubamos con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 568 (Invitrogen) a una dilución 1:200, durante 1 hora, a temperatura ambiente y en oscuridad. De nuevo retiramos el anticuerpo y lavamos 3 veces con PBS. La tinción nuclear se realizó con DAPI (Invitrogen) a una concentración de 1 μ g/ml en PBS durante 5 minutos. Por último, montamos los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio, con medio de montaje Vectashield (Laboratorios Vector) y los sellamos con esmalte.

Observamos las preparaciones en un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-200-U y las analizamos gracias al software EZ-C1 3.30 *Free Viewer*.

4.10.2. WESTERN-BLOT

Realizamos análisis de western-blot en células MDCKII, MEF3.8 y HEK293 transducidas de forma estable, con ambas variantes de ABCG2 bovina, partiendo de placas p100. Las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se homogeneizaron en buffer RIPA (Sigma Aldrich) frío, conteniendo inhibidores de proteasas (Roche). Se eliminaron los restos celulares tras una centrifugación a 8.000g, durante 10 minutos y a 4°C. Se tomó el sobrenadante, descartando el pellet y se congeló a -80°C hasta el momento de la valoración de la concentración de proteína.

La concentración de proteínas se determinó empleando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay*, basado en el método de Bradford y se cuantificó por espectrofotometría a 595 nm, utilizando patrones de BSA de concentraciones conocidas se obtuvieron las rectas de calibración.

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta *Mini-PROTEAN® 3 cell* (Bio-Rad *Laboratories*) y las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 8%, a un voltaje de 100 V durante aproximadamente 3 horas. Se utilizó un marcador de proteínas comercial (Kalleidoscope; Bio-Rad. 161-0324). La transferencia húmeda se realizó utilizando la cubeta *Mini Trans-Blot Cell* a un voltaje de 150V, durante 2 horas y a 4°C. Para comprobar la correcta carga de proteína, se tiñó la membrana con una solución de Rojo Ponceau al 0,4% y se destiñó mediante sucesivos lavados en PBS + Tween 20 al 0,05%. El bloqueo de las uniones inespecíficas se realizó con una solución de tampón fosfato salino con Tween 20 al 0,05%, BSA al 4% y leche en polvo desnatada al 4%, durante al menos 1 hora.

Una vez bloqueadas las uniones inespecíficas, se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados en buffer de bloqueo, se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. A continuación se realizaron otros 3 lavados en buffer de bloqueo y 1 en PBS, antes del revelado.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron BXP-53 (Monosan) para ABCG2, a una dilución 1:500, y anti-β-actina (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:5000. Se emplearon los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa a diluciones 1:1000 para ABCG2 y 1:4000 para la β-actina.

La detección se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit Immobilon Western (Millipore), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, en un cuarto oscuro y dentro de un casette de autorradiografía, se pusieron en contacto la membrana y la película fotográfica (Amersham Hyperfilm[™] ECL) con exposiciones que fueron desde los 10 segundos hasta los 3 minutos y se revelaron las películas con líquidos reveladores y fijadores comerciales.

Cuando fue necesario el stripping de las membranas se realizó incubándolas durante 20 minutos con buffer de *stripping* (*Restore*TM *PLUS Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific*), seguido de tres lavados en PBS-Tween 0,5%.

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas correspondientes al peso molecular de ABCG2 (72 kDa) y la β -actina (42 kDa) se realizó mediante el software *Quantity One*[®] (Bio-Rad). Al final del proceso se realizó otro control de carga con las tinciones rojo ponceau y tinta china.

4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de las diferencias existentes entre los diferentes parámetros estudiados se realizó mediante el test *t de Student* de dos colas, considerándose el valor p<0,05 como estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS
5.1. ESTUDIO FUNCIONAL COMPARATIVO *IN VITRO* DE Abcg2 MURINA Y ABCG2 HUMANA

5.1.1. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE FLUOROQUINOLONAS

Como parte del primer objetivo de esta Tesis, relativo a los estudios funcionales comparativos entre Abcg2 murina y ABCG2 humana, nos propusimos estudiar la interacción *in vitro* de diversas fluoroquinolonas (marbofloxacina, difloxacina, orbifloxacina y sarafloxacina), con el transportador ABCG2. Se decidió comenzar el estudio con Abcg2 murina, por ser el ratón uno de los modelos más ampliamente utilizados para ensayos farmacológicos preclínicos. Además, realizamos simultáneamente estudios comparativos con ABCG2 humana.

Para analizar la posibilidad de que alguna de estas fluoroquinolonas sea sustrato de ABCG2 humana y Abcg2 murina *in vitro*, se utilizó el modelo de cultivo en Transwell. Este modelo descrito por Huisman y cols. (2001) se emplea de forma rutinaria para este tipo de ensayos, ya que al trabajar con dos compartimentos estancos a ambos lados de una monocapa celular, permite estudiar el transporte apical-basal (A-B) respecto al basal-apical (B-A).

Los experimentos se realizaron añadiendo, por una parte, el fármaco en el compartimento basal y midiendo el porcentaje de compuesto transportado al compartimento apical (B-A) y, por otra, añadiendo el fármaco en el compartimento apical y determinando el porcentaje de transporte al lado basal (A-B). La concentración de fármaco en cada compartimento se midió mediante análisis por HPLC específico para cada compuesto como se ha detallado en el capítulo correspondiente de Material y Métodos. En líneas celulares que sobreexpresan el transportador, cuando un fármaco es sustrato, el transporte en la dirección B-A es mayor que en la dirección opuesta. En estos experimentos se utilizaron células MDCKII transducidas con el transportador ABCG2.

Los resultados obtenidos para marbofloxacina (Figura 26), difloxacina (Figura 27), orbifloxacina (Figura 28) y sarafloxacina (Figura 29) indicaron que, a la concentración estudiada (10 μ M), en el caso de las líneas transducidas con Abcg2 murina el transporte en dirección B-A era mayor que en dirección A-B, mientras que en

las células parentales no se observaba esta direccionalidad en el transporte. En el caso de las células que sobreexpresan el transportador humano, el transporte en dirección B-A seguía siendo superior al de la dirección A-B, aunque la diferencia era mucho menor (en algunos casos mínima) comparada con la del transportador murino. En ambos casos, al añadir el inhibidor específico de ABCG2 Ko143 (Allen y cols., 2002), el transporte vectorial mediado por Abcg2/ABCG2 desapareció, y los resultados obtenidos fueron muy similares a los de la línea parental, en la que los porcentajes de transporte B-A y A-B fueron muy parecidos. Los valores de los coeficientes de permeabilidad aparente (Papp) a ambos lados de la monocapa de células, junto con su ratio B-A/A-B, se muestran en las tablas 3, 4, 5 y 6. Como podemos observar, en todos los casos, existieron diferencias significativas en el ratio B-A/A-B en las células transducidas con Abcg2 de ratón respecto a la línea parental, diferencia que desapareció al añadir el inhibidor Ko143. Sin embargo, en el caso de las células transducidas con ABCG2 humana sólo existieron diferencias significativas respecto a la línea parental para marbofloxacina y orbifloxacina. Además, en todos los casos hubo diferencias significativas entre Abcg2 murina y ABCG2 humana.

Las diferencias observadas entre el transportador humano y murino pueden ser debidas a un menor nivel en la expresión de la proteína humana en la línea celular utilizada o, alternativamente, a que ABCG2 humana posea una menor eficiencia en el transporte de las fluoroquinolonas ensayadas, como ha sido sugerido por otros autores para otros sustratos (Merino y cols., 2006).

Estos estudios demostraron que las cuatro fluoroquinolonas estudiadas son sustrato del transportador murino, siendo el transporte por parte del transportador humano muy limitado, en nuestras condiciones experimentales.

98



Figura 26. Transporte transepitelial de **marbofloxacina** (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 (Abcg2 murina) y MDCKII-ABCG2 (ABCG2 humana) en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal \circ . Las barras de error indican la desviación típica (n=3) (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).



Figura 27. Transporte transepitelial de **difloxacina** (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 (Abcg2 murina) y MDCKII-ABCG2 (ABCG2 humana) en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal \circ . Las barras de error indican la desviación típica (n=3) (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).



Figura 28. Transporte transepitelial de **orbifloxacina** (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 (Abcg2 murina) y MDCKII-ABCG2 (ABCG2 humana) en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal \circ . Las barras de error indican la desviación típica (n=3) (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).



Figura 29. Transporte transepitelial de **sarafloxacina** (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 (Abcg2 murina) y MDCKII-ABCG2 (ABCG2 humana) en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal \circ . Las barras de error indican la desviación típica (n=3) (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
	Parental	$24,83 \pm 1,54$	$25,93 \pm 1,39$	0,96 ± 0,01
Marbofloxacina	Abcg2	$45,11 \pm 1,29$	$11,55 \pm 0,10$	$3,90 \pm 0,08^{*}$
	ABCG2	24,01 ± 1,66	$19,02 \pm 0,82$	$1,26 \pm 0,07^{*\dagger}$
Marhaflayacina	Parental	$21,79 \pm 4,61$	$24,72 \pm 4,89$	0,93 ± 0,34
+ Ko143	Abcg2	$22,\!45\pm2,\!76$	$27,72 \pm 0,81$	$0,81 \pm 0,09$
	ABCG2	$21,02 \pm 1,76$	$24,\!19\pm0,\!82$	$0,87 \pm 0,10$

Tabla 3. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **marbofloxacina** (10 μ M) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a Abcg2 murina.

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
	Parental	$47,01 \pm 1,73$	$39,29 \pm 2,41$	$1,20 \pm 0,03$
Difloxacina	Abcg2	$71,54 \pm 3,70$	$19,38 \pm 2,38$	$3,73 \pm 0,52^{*}$
	ABCG2	$50,88 \pm 0,98$	$38,37 \pm 2,35$	$1,\!33\pm0,\!08^\dagger$
Difloyacina	Parental	$47,05 \pm 0,81$	$37,93 \pm 4,44$	$1,25 \pm 0,14$
+ Ko143	Abcg2	$45,10 \pm 1,77$	$39,81 \pm 3,15$	$1,13 \pm 0,05$
	ABCG2	$48,39 \pm 0,66$	$42,04 \pm 3,46$	$1,16 \pm 0,10$

Tabla 4. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **difloxacina** (10 μ M) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a Abcg2 murina.

SubclonesB-A, x10-6 cm/sA-B, x10-6 cm/sRatio B-A/A-BOrbifloxacinaParental $5,81 \pm 0,38$ $6,88 \pm 0,90$ $0,85 \pm 0,09$ Abcg2 $13,44 \pm 0,95$ $3,41 \pm 0,58$ $4,04 \pm 0,94^*$ ABCG2 $8,06 \pm 0,36$ $5,61 \pm 0,28$ $1,44 \pm 0,11^{*\dagger}$ OrbifloxacinaParental $5,56 \pm 0,56$ $6,02 \pm 0,34$ $0,92 \pm 0,04$ Abcg2 $4,90 \pm 0,64$ $5,43 \pm 0,36$ $0,90 \pm 0,06$					
Parental $5,81 \pm 0,38$ $6,88 \pm 0,90$ $0,85 \pm 0,09$ OrbifloxacinaAbcg2 $13,44 \pm 0,95$ $3,41 \pm 0,58$ $4,04 \pm 0,94^*$ ABCG2 $8,06 \pm 0,36$ $5,61 \pm 0,28$ $1,44 \pm 0,11^{*\dagger}$ OrbifloxacinaParental $5,56 \pm 0,56$ $6,02 \pm 0,34$ $0,92 \pm 0,04$ Abcg2 $4,90 \pm 0,64$ $5,43 \pm 0,36$ $0,90 \pm 0,06$		Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
OrbifloxacinaAbcg2 $13,44 \pm 0,95$ $3,41 \pm 0,58$ $4,04 \pm 0,94^*$ ABCG2 $8,06 \pm 0,36$ $5,61 \pm 0,28$ $1,44 \pm 0,11^{*\dagger}$ OrbifloxacinaParental $5,56 \pm 0,56$ $6,02 \pm 0,34$ $0,92 \pm 0,04$ Abcg2 $4,90 \pm 0,64$ $5,43 \pm 0,36$ $0,90 \pm 0,06$		Parental	5,81 ± 0,38	$6{,}88 \pm 0{,}90$	$0,85 \pm 0,09$
ABCG2 $8,06 \pm 0,36$ $5,61 \pm 0,28$ $1,44 \pm 0,11^{*\dagger}$ OrbifloxacinaParental $5,56 \pm 0,56$ $6,02 \pm 0,34$ $0,92 \pm 0,04$ Abcg2 $4,90 \pm 0,64$ $5,43 \pm 0,36$ $0,90 \pm 0,06$	Orbifloxacina	Abcg2	$13,\!44 \pm 0,\!95$	$3,\!41 \pm 0,\!58$	$4,04 \pm 0,94^{*}$
OrbifloxacinaParental $5,56 \pm 0,56$ $6,02 \pm 0,34$ $0,92 \pm 0,04$ Abcg2 $4,90 \pm 0,64$ $5,43 \pm 0,36$ $0,90 \pm 0,06$		ABCG2	$8,06 \pm 0,36$	$5,\!61 \pm 0,\!28$	$1,44 \pm 0,11^{*\dagger}$
Abcg2 $4,90 \pm 0,64$ $5,43 \pm 0,36$ $0,90 \pm 0,06$	Orbiflovacina	Parental	$5,56 \pm 0,56$	$6,02 \pm 0,34$	$0,92 \pm 0,04$
	+ Ko143	Abcg2	$4,90 \pm 0,64$	$5,43 \pm 0,36$	$0,90 \pm 0,06$
ABCG2 $5,37 \pm 0,61$ $5,51 \pm 0,24$ $0,97 \pm 0,07$		ABCG2	$5,37 \pm 0,61$	$5,51 \pm 0,24$	$0,\!97\pm0,\!07$

Tabla 5. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **orbifloxacina** (**10** μ **M**) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a Abcg2 murina.

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
	Parental	$2,\!37\pm0,\!39$	$2,24 \pm 0,18$	$1,05 \pm 0,09$
Sarafloxacina	Abcg2	$7,97 \pm 0,13$	$1,\!70\pm0,\!05$	$4,68 \pm 0,22^{*}$
	ABCG2	$3,\!28 \pm 0,\!49$	$2,66 \pm 0,18$	$1,\!24\pm0,\!22^\dagger$
Saraflovacina	Parental	$2,30 \pm 0,14$	$2,26 \pm 0,10$	$1,02 \pm 0,02$
+ Ko143	Abcg2	$2,\!04\pm0,\!09$	$2,06 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,06$
	ABCG2	$2,66 \pm 0,04$	$2,18 \pm 0,11$	$1,22 \pm 0,08$

Tabla 6. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **sarafloxacina** (**10** μ **M**) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a Abcg2 murina.

5.1.2. ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON FUMITREMORGINA C

Debido a que las diferencias interespecíficas en el transportador ABCG2 podrían no sólo tener relación con su capacidad de transportar compuestos si no también con su capacidad de ser inhibido, nos propusimos el estudio de las diferencias entre Abcg2 murina y ABCG2 humana en cuanto a la capacidad inhibitoria de la fumitremorgina C, inhibidor modelo del transportador.

Para ello, utilizando células transfectadas con Abcg2 murina y ABCG2 humana, realizamos diferentes ensayos comparativos de la capacidad inhibitoria de la fumitremorgina C:

- Experimentos de acumulación con mitoxantrona y clorina e6 en presencia de fumitremorgina C.

- Determinación de la capacidad de la fumitremorgina C para revertir la resistencia a fármacos (mitoxantrona y topotecan) mediante estudios de citotoxicidad.

- Modulación del transporte vectorial mediado por ABCG2 de los sustratos nitrofurantoína y mitoxantrona mediante la fumitremorgina C.

5.1.2.1. Ensayos de acumulación de mitoxantrona y clorina e6

Se emplearon células MDCKII y MEF3.8 y sus subclones transfectados de forma estable con Abcg2 murina o ABCG2 humana.

Los ensayos de citometría se realizaron siguiendo el procedimiento anteriormente descrito en el apartado 4.5 de Material y Métodos. Así, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos durante 36 horas hasta la subconfluencia. A continuación, se incubaron con mitoxantrona (10 μ M) y clorina e6 (50 μ M) y fumitremorgina C (10 μ M) (Figura 30). La acumulación relativa de los fármacos se calculó a partir de la fluorescencia medida por citometría de flujo. Como era de esperar, la acumulación de mitoxantrona y de clorina e6 fue significativamente menor en las células transducidas con el transportador murino y humano, pero a diferencia de lo esperado, fumitremorgina C a 10 μ M no revirtió por completo este efecto sobre la acumulación de mitoxantrona en las células MDCKII transducidas con Abcg2 murina.

Para caracterizar más en profundidad este fenómeno, se realizó el ensayo empleando varias concentraciones de fumitremorgina C (0,1 - 20 μ M) (Figura 31) y se calcularon los valores de IC₅₀ (Tabla 7).

Los experimentos de acumulación realizados calculando la potencia inhibitoria reflejaron que la fumitremorgina C inhibe tanto Abcg2 de ratón como ABCG2 humana, observándose en todos los casos una mayor inhibición del transporte en ABCG2 humana y obteniéndose, por tanto, valores inferiores de IC_{50} . El cociente entre los valores de IC_{50} de Abcg2 murina y ABCG2 humana (R) refleja numéricamente el incremento de concentración necesario para la inhibición de FTC entre los homólogos. Los resultados obtenidos (Figura 31 y tabla 7) demuestran que es necesario un rango de concentración, entre 2 y 8 veces mayor en el caso del transportador murino, lo que significa una mayor inhibición del transporte para ABCG2 humana. Por otra parte, también se podría indicar que los resultados de inhibición mediante FTC de los dos sustratos obtenidos con las células MEF3.8, son más homogéneos, considerando que en este caso se excluye la posible influencia de Mdr1 y Mrp1.



Figura 30. Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) y clorina e6 50 μ M (Ce6) en células MDCKII (A-C) y MEF3.8 (B-D) parentales y transducidas con Abcg2 murina y ABCG2 humana en presencia o ausencia de fumitremorgina C 10 μ M (FTC). Las barras de error indican la desviación típica (n=3).



Figura 31. Potencia inhibitoria de la fumitremorgina C sobre el efecto mediado por el transportador en la acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) y clorina e6 50 μ M (Ce6) en células MDCKII (A-C) y MEF3.8 (B-D) transducidas con Abcg2 murina • y ABCG2 humana •. Las barras de error indican la desviación típica (n=3) (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).

	MDCK II			MEF3.8		
	Abcg2	ABCG2	R	Abcg2	ABCG2	R
Mitoxantrona	9,84 ± 1,50	2,54 ± 0,70*	3,87	$6,33 \pm 0,48$	0,80 ± 0,07*	7,91
Clorina e6	$7,\!49 \pm 0,\!49$	3,91 ± 0,10*	1,91	2,41 ± 0,21	1,11 ± 0,19*	2,17

Tabla 7. Valores de IC₅₀ para la fumitremorgina C, en el ensayo de inhibición del efecto mediado por el transportador sobre la acumulación de mitoxantrona (10µM) y clorina e6 (50µM) en células MDCKII y MEF3.8 transducidas con Abcg2 murina y ABCG2 humana. Los resultados están expresados como la media de al menos tres experimentos \pm desviación típica (n=3). R = ratio Abcg2 / ABCG2. *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a Abcg2 murina.

5.1.2.2. Ensayos de citotoxicidad con mitoxantrona y topotecan y potencia inhibitoria de FTC

Para los estudios de citotoxicidad se emplearon los dos tipos celulares mencionados en el apartado anterior y sus subclones transducidos con Abcg2 de ratón y ABCG2 humana. Los ensayos se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.6 de Material y Métodos. La proliferación celular relativa se cuantificó con MTT en las células MDCKII y con CyQuant en las células MEF3.8.

Inicialmente se calculó el valor de IC_{50} para mitoxantrona y topotecan, como era esperable, las células que sobreexpresan el transportador tanto murino como humano, mostraron valores superiores (mayor resistencia) que las parentales. Además, los valores de IC_{50} fueron significativamente superiores para Abcg2 murino en comparación con el transportador humano, excepto para las células MDCKII empleando mitoxantrona que fueron 3,75 ± 0,68 y 2,50 ± 0,20 respectivamente (Figura 32).

Con el fin de cuantificar la potencia inhibitoria de la fumitremorgina C, la EC_{90} se definió como la concentración efectiva de inhibidor que reduce la resistencia a los fármacos en un 90%, lo que es equivalente a la concentración de inhibidor que hace a las células 10 veces más sensibles. Las células fueron incubadas con una serie de concentraciones de fumitremorgina C en presencia de mitoxantrona o topotecan al 10% de su IC₅₀. La concentración de fumitremorgina C, que produce una reducción del 50% de la viabilidad celular en estas condiciones habrá reducido la IC₅₀ un 90%. Los valores de EC₉₀ oscilaron entre 11 y 20 µM en células transducidas con Abcg2 de ratón y entre 5 y 12 µM en el caso de las células transducidas con ABCG2 humana, dependiendo del fármaco que se empleó como sustrato y la línea celular (Figura 33). En todos los casos, los valores de EC₉₀ fueron significativamente menores para ABCG2 humana en comparación con Abcg2 murina, indicando una mayor sensibilidad a fumitremorgina C por parte de ABCG2 humana. Como era de esperar, en la tabla 8 podemos observar que al realizar los ensayos de citotoxicidad añadiendo la fumitremorgina C a la concentración de su EC₉₀ los nuevos valores de IC₅₀ son 10 veces inferiores a los obtenidos inicialmente con mitoxantrona y topotecan sin inhibidor.

Estos resultados están en concordancia con los experimentos de acumulación en los que también se observó que ABCG2 humana es más sensible a la inhibición por fumitremorgina C que el transportador murino.



Figura 32. Efecto de la mitoxantrona (MXR) (A-B) o topotecan (TPT) (C-D) sobre la viabilidad de células MDCKII (A-C) y MEF3.8 (B-D), ambas transducidas de forma estable con Abcg2 murina y ABCG2 humana. Las barras de error indican la desviación típica (n=4). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. † Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a Abcg2 murina.



Figura 33. Efecto de la fumitremorgina C sobre la viabilidad de MDCKII (A-C) y MEF3.8 (B-D), ambas transducidas de forma estable con Abcg2 murina • y ABCG2 humana \circ , empleando una concentración de mitoxantrona (MXR) (A-B) o topotecan (TPT) (C-D) diez veces inferior a su IC₅₀. Las barras de error indican la desviación típica (n=4). * Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a Abcg2 murina.

		Mitoxantrona	Mitoxantrona + FTC*	Topotecan	Topotecan + FTC*
MCDKII	Abcg2 ABCG2	$3,75 \pm 0,68$ $2,50 \pm 0,20$	$0,40 \pm 0,03$ $0,27 \pm 0,05$	$43,22 \pm 1,44 \\ 13,82 \pm 0,91$	$\begin{array}{c} 4,15 \pm 0,37 \\ 1,53 \pm 0,10 \end{array}$
MEF3.8	Abcg2 ABCG2	$2,74 \pm 0,60$ $1,12 \pm 0,41$	$\begin{array}{c} 0,34 \pm 0,02 \\ 0,09 \pm 0,02 \end{array}$	$\begin{array}{c} 30,76 \pm 1,05 \\ 10,37 \pm 1,09 \end{array}$	$2,33 \pm 0,34$ $1,16 \pm 0,77$

Tabla 8. Capacidad de la fumitremorgina C para revertir la resistencia a la mitoxantrona y al topotecan, mediada por el transportador ABCG2. Valores de IC_{50} para la mitoxantrona y el topotecan en células MDCKII y MEF3.8 transducidas con Abcg2 murina y ABCG2 humana. Los resultados están expresados como la media de al menos cuatro experimentos \pm desviación típica (n=4). * La concentración utilizada de fumitremorgina C fue el valor de EC_{90} obtenido para cada caso.

5.1.2.2. Ensayos de inhibición del transporte de nitrofurantoína y mitoxantrona

Para confirmar las diferencias observadas entre Abcg2 murina y ABCG2 humana en los experimentos de citometría y de citotoxicidad utilizando otro tipo de ensayo, se estudió la capacidad inhibitoria de la fumitremorgina C en experimentos de transporte con dos sustratos conocidos de ABCG2: nitrofurantoína (Merino y cols., 2005b) y mitoxantrona (Doyle y Ross, 2003).

Los experimentos de transporte se llevaron a cabo utilizando células MDCKII y sus subclones transducidos con Abcg2 de ratón y ABCG2 humana. Los ensayos se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.4 de Material y Métodos. En líneas celulares que sobreexpresan el transportador, cuando un fármaco es sustrato, el transporte en la dirección B-A es mayor que en la dirección opuesta y, si añadimos un inhibidor, dicho transporte disminuye en mayor o menor medida, dependiendo de la potencia inhibitoria del compuesto, incluso alcanzando los valores observados en las células parentales si la inhibición es completa.

Los resultados obtenidos (Figuras 34 y 35, Tablas 9 y 10) indicaron que, a la concentración estudiada (10 μ M para la nitrofurantoína y 20 μ M para la mitoxantrona), en el caso de las células transducidas con el transportador, se producía una direccionalidad en el transporte, siendo éste mayor en dirección B-A y aumentando los ratios Papp respecto a las células parentales con ambos fármacos. Al añadir la fumitremorgina C a la concentración de 5 μ M el transporte de nitrofurantoína mediado tanto por Abcg2 murina como ABCG2 humana desapareció por completo, y los resultados obtenidos incluyendo los ratios Papp fueron muy similares a los de la línea parental, en la que los porcentajes de transporte B-A y A-B fueron muy parecidos. Sin embargo, al añadir la fumitremorgina C a 1 μ M se produjo una inhibición diferencial del transporte tanto de nitrofurantoína como de mitoxantrona de estos homólogos. Así, la inhibición del transporte mediado por Abcg2 murina como Abcg2 murina de nitrofurantoína no fue completa. Incluso, en el caso de la mitoxantrona, no se apreció ninguna inhibición en el transporte mediado por Abcg2 murina. Los ratios Papp con fumitremorgina C (Tablas 9 y 10) mostraron diferencias significativas comparando con las células parentales sólo

para las células transfectadas con Abcg2 murina, mostrando la ausencia de inhibición completa del transportador murino.

Al igual que en los resultados obtenidos en los ensayos de acumulación y de citotoxicidad la fumitremorgina C parece inhibir de manera más eficiente ABCG2 humana que la variante de ratón.



Figura 34. Transporte transepitelial de **nitrofurantoína** (10 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 (Abcg2 murina) y MDCKII-ABCG2 (ABCG2 humana) en ausencia y en presencia de fumitremorgina C (1 y 5 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal \circ . Las barras de error indican la desviación típica (n=3) (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).



Figura 35. Transporte transepitelial de **mitoxantrona** (20 μ M) en células MDCKII (parental), MDCKII-Abcg2 (Abcg2 murina) y MDCKII-ABCG2 (ABCG2 humana) en ausencia y en presencia de fumitremorgina C (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal \circ . Las barras de error indican la desviación típica (n=3) (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
	Parental	$3,20 \pm 0,13$	$4,61 \pm 0,08$	$0,69 \pm 0,02$
Nitrofurantoína	Abcg2	$7,82 \pm 0,10$	$2,12 \pm 0,12$	$3,70 \pm 0,19^{*}$
	ABCG2	$7,77\pm0,32$	$2,\!89\pm0,\!08$	$2,69 \pm 0,07^{*}$
Nitrofurantoína	Parental	$4,18 \pm 0,37$	$5,51 \pm 0,17$	$0,76 \pm 0,06$
+ ETC 1 μ M	Abcg2	$5,63 \pm 0,58$	$4,\!07\pm0,\!29$	$1,38 \pm 0,08^{*}$
	ABCG2	$3,63 \pm 0,15$	$4,76 \pm 0,56$	$0,77 \pm 0,11$
	Parental	$3,51 \pm 0,48$	$4,60 \pm 0,74$	$0,77 \pm 0,04$
Nitrofurantoina + FTC 5 μM	Abcg2	$3,25 \pm 0,58$	$4,\!54\pm0,\!85$	$0,72 \pm 0,04$
	ABCG2	$3,\!49 \pm 0,\!28$	$4,37 \pm 0,36$	$0,81 \pm 0,13$

Tabla 9. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **nitrofurantoína** (10 μ M) en presencia y ausencia de fumitremorgina C (1 y 5 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental.

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
	Parental	$2,64 \pm 0,17$	$1,05 \pm 0,03$	$2,53 \pm 0,12$
Mitoxantrona	Abcg2	$6,05 \pm 0,11$	$1,16 \pm 0,06$	$5,22 \pm 0,24^{*}$
	ABCG2	$6,\!28 \pm 0,\!31$	$1,\!10\pm0,\!02$	$5,72 \pm 0,38^{*}$
Mitavantrana	Parental	3,61 ± 0,06	$1,27 \pm 0,05$	$2,85 \pm 0,16$
+ FTC 1 μM	Abcg2	$7,22 \pm 0,27$	$1,31 \pm 0,12$	$5,54 \pm 0,28^{*}$
	ABCG2	$4,25 \pm 0,47$	$1,44 \pm 0,13$	$2,\!97\pm0,\!50$

Tabla 10. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **mitoxantrona** (20 μ M) en presencia y ausencia de fumitremorgina C (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental.

5.2. ESTUDIO FUNCIONAL COMPARATIVO *IN VITRO* DE ABCG2 BOVINA (CON SUS DOS VARIANTES S581, Y581) Y ABCG2 OVINA

El segundo objetivo principal de esta tesis fue el estudio *in vitro* de las diferencias funcionales entre ABCG2 ovina y ambas variantes de ABCG2 bovina. Para ello y teniendo en cuenta que nuestro grupo de investigación ya ha clonado ambas variantes de ABCG2 bovina (Merino y cols., 2009), realizamos la clonación de ABCG2 ovina y generamos varios modelos celulares para la expresión de ABCG2 tanto ovina como bovina, lo que nos permitió la caracterización funcional de las diferencias interespecíficas y polimórficas.

5.2.1. CLONACIÓN DE ABCG2 OVINA

La estrategia elegida para clonar el cDNA de la ABCG2 ovina fue realizar una RT-PCR en dos pasos, seguida de clonación del producto de PCR mediante el sistema *TOPO TA[®] Cloning* (Invitrogen). Posteriormente el cDNA se subclonó en los vectores de expresión correspondientes.

En primer lugar, se aisló RNA total de hígado de oveja, según las condiciones que se describen en el apartado 4.10.1 de Material y Métodos. El análisis de la integridad del RNA obtenido se muestra en el gel de agarosa de la figura 36A, donde se observan los RNAr 28S y 18S. A continuación, un microgramo del RNA total se retrotranscribió a cDNA, y se amplificó mediante PCR la secuencia de interés (ABCG2) para su clonación. La figura 36B muestra la electroforesis del producto de la PCR (2 kb).

Tras la clonación del producto de PCR empleando el sistema *TOPO TA*[®] *Cloning* (Invitrogen), se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α competentes con el producto de la reacción de ligación y entre las colonias obtenidas, se seleccionó una muestra aleatoria para su análisis. Se obtuvo el DNA plasmídico y se analizaron los transformantes por mapeo de restricción; los transformantes positivos se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación de Ácidos Nucleicos de la Universidad de León, utilizando un equipo Megabace (*Amersham Biosciences*), siguiendo el protocolo de secuenciación cíclica. Aunque según hemos indicado en epígrafes anteriores para la

amplificación por RT-PCR del cDNA de ABCG2 ovina se utilizaron los primers diseñados según la secuencia bovina, en el transcurso del desarrollo de la presente memoria, se publicó la secuencia del cDNA de ABCG2 ovina (*GenBank accession* no. DQ886530.1). Así, pudimos comprobar que esta secuencia publicada coincidía en su totalidad con nuestra secuencia clonada.



Figura 36. A Análisis de la integridad del RNA de la muestra extraída de hígado ovino. Gel de agarosa al 1% en el que se observan dos bandas correspondientes a las subunidades de RNAr 28S y 18S. **B** Amplificación la secuencia de interés (ABCG2) por PCR. Gel de agarosa al 1% en el que se observa el producto de 2 kb obtenido; el marcador de tamaño molecular se sitúa a la izquierda.

El siguiente paso fue subclonar el cDNA de ABCG2 ovina en los vectores de expresión. En las figuras 37 y 38 se muestra una representación esquemática del procedimiento seguido para la obtención de estas construcciones.

El cDNA de interés se aisló del vector pTOPO-ABCG2 mediante digestión con la enzima *EcoRI* y se clonó como un fragmento de extremos romos en el plásmido pEF1 α -IRES-GFP (Figura 35). Las nuevas construcciones recombinantes de 8,6 Kb, que contienen el gen de *ABCG2* ovina se denominaron pEF1 α - oABCG2-IRES-GFP.

Además de los vectores plasmídicos descritos, también se clonó el cDNA de interés en el vector retroviral pLZRS-IRES-GFP (Figura 36). En este caso se realizó una clonación con extremos cohesivos *EcoRI-EcoRI*. La nueva construcción recombinante de 15,5 Kb, que contiene el gen de *ABCG2* ovina se denominó pLZRS-oABCG2-IRES-GFP.



Figura 37. Estrategia de clonación del cDNA de ABCG2 ovina en pEF1α-IRES-GFP.



Figura 38. Estrategia de clonación del cDNA de la ABCG2 ovina en pLZRS-IRES-GFP.

5.2.2. EXPRESIÓN TRANSITORIA DE ABCG2 OVINA Y AMBAS VARIANTES DE LA BOVINA EN FIBROBLASTOS FETALES OVINOS (SBFF1)

Con el fin de comprobar el resultado funcional de la construcción pEF1 α oABCG2-IRES-GFP y realizar un estudio inicial de las posibles diferencias de funcionalidad entre ambas variantes de ABCG2 bovina y ABCG2 ovina, lipofectamos células SBFF1 con el vector vacío, el plásmido pEF1 α -oABCG2-IRES-GFP, descrito en el apartado anterior, y los plásmidos pEF1 α -S581-IRES-GFP y pEF1 α -Y581-IRES-GFP que contienen ambas variantes del transportador bovino, generados anteriormente por nuestro grupo de investigación (Merino y cols., 2009).

Las células que incorporaron los plásmidos se caracterizaron por expresar el gen marcador *GFP* (proteína verde fluorescente). Mediante citometría de flujo observamos que el porcentaje de células GFP positivas era muy similar con las diferentes construcciones transfectadas (oABCG2, S581, Y581). Así, obtuvimos un porcentaje promedio de células GFP positivas de 17,9% para el vector vacío, 10,1% para la oveja y 10,8 y 12,3% para las variantes Y581 y S581, respectivamente.

Además, se comprobó la expresión y funcionalidad del transportador ovino mediante ensayos de acumulación de mitoxantrona (10 μ M). Gracias a las representaciones de *dot-plot* (Figura 39A) obtenidas por citometría de flujo tras analizar 15.000 células, pudimos separar la población de células GFP positivas y valorar la acumulación de mitoxantrona en esta fracción de la población, que es la que expresaba el transportador ABCG2. La figura 39B muestra los histogramas correspondientes a la acumulación de mitoxantrona de la población GFP positiva. En las células transfectadas con el cDNA de ABCG2 ovina (derecha) se produce una menor acumulación de mitoxantrona que en el caso de las células transfectadas con el vector vacío (izquierda). Esta menor acumulación del fármaco se revierte en presencia de Ko143.

Al representar la fluorescencia correspondiente a la acumulación de mitoxantrona en cada tipo celular (Figura 40), pudimos observar que ABCG2 ovina es un transportador eficiente de mitoxantrona, como ocurre con ABCG2 bovina. La acumulación de mitoxantrona a la concentración de 10 μ M fue entre un 55 y un 72% inferior en conjunto, en las células que expresaban ABCG2, que en las transfectadas con el vector vacío, siendo la del transportador ovino inferior en un 62%. En cuanto a la comparación interespecífica de la funcionalidad de ABCG2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de mitoxantrona entre el transportador bovino y ovino. Sin embargo, en cuanto a la comparación de la funcionalidad de ambas variantes de ABCG2 bovina, confirmamos las diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de mitoxantrona que ya se habían descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación (Merino y cols., 2009). La variante S581 presentó una acumulación significativamente menor respecto a la variante Y581. Los resultados obtenidos demostraron que la acumulación de S581 fue 4 veces menor respecto al vector vacío $(21,02 \pm 5,28 versus 76,27 \pm 0,01$ unidades de fluorescencia, respectivamente), mientras que en la Y581 la acumulación fue sólo 2 veces menor (34,06 \pm 1,44 *versus* 76,27 \pm 0,01, respectivamente). Estos resultados corroboran una mayor actividad de la variante bovina S581 en cuanto al transporte de mitoxantrona.



Figura 39. Análisis de la funcionalidad del transportador ABCG2 ovino transfectado de forma transitoria en células SBFF1. A Representación dot-plot de la fluorescencia para GFP (FL1) frente al tamaño (SS) en células no transfectadas y transfectadas. **B** Histogramas que representan la acumulación de mitoxantrona (10 μ M) en células transfectadas con el vector vacío y con ABCG2 ovina en ausencia o presencia de Ko143 (1 μ M).



Figura 40. Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) en fibroblastos fetales ovinos (SBFF1) a las 24 horas de la transfección transitoria. Las células fueron preincubadas con o sin Ko143. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos (mediana de las unidades de fluorescencia); las barras de error indican la desviación típica. *Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) respecto a bABCG2 Y581.

5.2.3. EXPRESIÓN ESTABLE DE ABCG2 OVINA Y ABCG2 BOVINA (Y581, S581) EN CÉLULAS MEF3.8

Tras comprobar la funcionalidad del transportador ovino, nos propusimos obtener modelos de expresión estable para realizar experimentos de inhibición comparada entre el transportador ovino y ambas variantes del bovino. El tipo celular elegido para estos experimentos fueron las células MEF3.8 que carecen de expresión endógena de otros transportadores ABC, como la P-gp o Mrp1. El método utilizado para generar las líneas estables fue la infección con retrovirus, según se describe en el apartado 4.9.2 de Material y Métodos.

5.2.3.1. Establecimiento de las líneas celulares

A. Análisis y selección inicial de los clones

A las 72 horas de la transducción con cada una de las variantes del transportador (oABCG2, bABCG2-Y581, bABCG2-S581 y vector vacío) se valoró la eficiencia de la misma mediante el porcentaje de la población GFP positivo en cada caso. Los resultados observados al microscopio oscilaron entre el 30 y el 50% de células GFP positivas, independientemente de la variante transducida.

Pasados 7-10 días tras la transducción, se procedió a seleccionar y tripsinizar los clones GFP positivos que presentaban un tamaño adecuado, utilizando cilindros de clonación. En total se tripsinizaron 116 clones, 39 de los cuales correspondieron al vector vacío, 38 a ABCG2 ovina, 16 a la variante bABCG2-S581 y 23 a la variante bABCG2-Y581. Las imágenes de la figura 41 son un ejemplo de las células pertenecientes a un clon de cada tipo. A medida que las células fueron proliferando y conseguimos un número suficiente de cada clon, se valoraron por citometría, comprobando el nivel de expresión de GFP, la homogeneidad de la expresión en las células de un clon (porcentaje de células GFP positivas), así como su funcionalidad en cuanto a la acumulación de mitoxantrona.

Nuestros criterios para la evaluación y selección inicial de los clones fueron los siguientes:

- Elevada expresión de GFP y homogeneidad en la expresión de GFP dentro de las células de un mismo clon (porcentaje de células GFP positivas superior al 80%).

-Disminución en la acumulación de mitoxantrona respecto al vector vacío en el caso de los clones transducidos con ABCG2. Se seleccionaron los clones cuya acumulación de mitoxantrona fue similar o inferior a la de las células transducidas con Abcg2 de ratón, tomadas como referencia.

-En el caso de las células transducidas con el vector vacío, consideramos acumulaciones de mitoxantrona similares a las de las células de la línea parental. En este caso, de los 26 clones obtenidos, los clones 2, 3, 4 y 10 presentaron valores de acumulación de mitoxantrona similares a los de las células parentales y porcentajes de transducción superiores al 80%. Utilizamos el clon 4 como referencia y le llamamos LZRS 4 (Figura 42).

122



Figura 41. Transducción de células MEF3.8 con los plásmidos que expresan oABCG2, bABCG2-Y581, bABCG2-S581 y Vector vacío. A Fotografías con microscopía de contraste de fases. **B** Fotografías con microscopía de fluorescencia.



Figura 42. Análisis de los clones MEF3.8 transducidos con el vector vacío. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP. Los distintos números en el eje de abscisas se refieren a los diferentes clones obtenidos. Los números de la parte superior de las barras hacen referencia al porcentaje de células GFP positivas de cada clon. P, células parentales.

En la figura 43 se muestran los resultados de funcionalidad del transportador correspondientes a todos los clones de la variante bovina S581. En lo que se refiere a la acumulación de mitoxantrona, la mayoría de los clones presentaron valores inferiores a 15 unidades arbitrarias de fluorescencia. En el caso de la expresión de GFP, el 82% de los clones, se caracterizaron por presentar porcentajes de células GFP positivos superiores al 80%, lo que indicaría una alta eficacia de la transfección.

En la figura 44 observamos los resultados correspondientes a los clones de la variante bovina Y581. En general, en este caso, los clones presentaron una mayor acumulación de mitoxantrona que los de la variante S581 y también se observó un menor número de clones con porcentajes de células GFP positivas superior al 80%, aunque presentaron mayor fluorescencia de GFP.

En la figura 45 están representados los resultados observados para los clones de ABCG2 ovina. De modo similar al caso anterior, la tendencia fue a que en general los clones presentaron una mayor acumulación de mitoxantrona que los de la variante bovina S581; en cambio, sólo se observó un clon con porcentajes de células GFP positivas inferior al 80%.

Como resumen de los datos expuestos, en las figuras 46, 47 y 48 se relacionan los valores correspondientes a la fluorescencia de GFP (eje de ordenadas) respecto a los de la acumulación de mitoxantrona (eje de abscisas), para los clones transducidos con las dos variantes de ABCG2 bovina y ABCG2 ovina. Es de destacar que en las tres figuras, de los clones situados en la parte superior, la mayoría se sitúa además en el cuadrante izquierdo, es decir, la mayor parte de los clones caracterizados por valores elevados de fluorescencia para GFP, presentaron también una buena funcionalidad del transportador.

Los clones situados en el cuadrante superior izquierdo, que cumplen dos de los criterios indicados en párrafos anteriores (elevada fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona) son los que aparecen señalados con un círculo en la leyenda y los que fueron seleccionados inicialmente. En el caso de la variante bABCG2-S581, obtuvimos 11 clones con características adecuadas, pero de ellos descartamos 2, el clon 4 y el clon 10 porque presentaron porcentajes de células GFP positivas inferiores al 80%. Para la variante bABCG2-Y581 obtuvimos 17 clones situados en el cuadrante superior izquierdo, pero de ellos descartamos 10, los clones 4,

5, 14, 17, 20, 22, 23, 29, 32 y 33 porque presentaron porcentajes de células GFP positivas inferiores al 80%. Para oABCG2 obtuvimos 19 clones situados en el cuadrante superior izquierdo, pero de ellos descartamos el clon 36 por presentar un porcentaje de células GFP positivas inferior al 80%. Después de esta primera selección, decidimos descartar otros 10 clones con la variante oABCG2, los clones 5, 6, 12, 17, 20, 22, 25, 27 y 38 porque presentaban los menores niveles de fluorescencia para GFP y el clon 7 porque presentaba unos niveles de fluorescencia para GFP muy elevados.



Figura 43. Funcionalidad de la variante bABCG2-S581 en los clones MEF3.8. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP. Los distintos números en el eje de abscisas se refieren a los diferentes clones obtenidos. Los números de la parte superior de las barras hacen referencia al porcentaje de células GFP positivas de cada clon. R, células transducidas con el cDNA de Abcg2 de ratón. L4, vector vacío.



Figura 44. Funcionalidad de la variante bABCG2-Y581 en los clones MEF3.8. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP. Los distintos números en el eje de abscisas se refieren a los diferentes clones obtenidos. Los números de la parte superior de las barras hacen referencia al porcentaje de células GFP positivas de cada clon. R, células transducidas con el cDNA de Abcg2 de ratón. L4, vector vacío.



Figura 45. Funcionalidad de la variante oABCG2 en los clones MEF3.8. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP. Los distintos números en el eje de abscisas se refieren a los diferentes clones obtenidos. Los números de la parte superior de las barras hacen referencia al porcentaje de células GFP positivas de cada clon. R, células transducidas con el cDNA de Abcg2 de ratón. L4, vector vacío.



Figura 46. Clasificación de los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2-S581 en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona. Los clones señalados en la leyenda con un círculo son los que presentaron alta fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona (similar a Abcg2 de ratón).



Figura 47. Clasificación de los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2-Y581 en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona. Los clones señalados en la leyenda con un círculo son los que presentaron alta fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona (similar a Abcg2 de ratón).



Figura 48. Clasificación de los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2-Y581 en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona. Los clones señalados en la leyenda con un círculo son los que presentaron alta fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona (similar a Abcg2 de ratón).

B. Caracterización de los clones seleccionados

Con el fin de comprobar la estabilidad de la expresión de ABCG2 en los clones seleccionados, estos se mantuvieron en cultivo durante 8 semanas, subcultivándolos cada 3 ó 4 días y repitiendo los ensayos de citometría a las 4 y las 8 semanas. Los clones que, a las 4 semanas, presentaron un aumento en la acumulación de mitoxantrona o una disminución de la intensidad de fluorescencia para GFP fueron descartados. Tal fue el caso de los clones 2, 3, 9, 14, 17 y 19 para bABCG2-S581; 2, 7, 8 y 13 para bABCG2-Y581 y los clones 14, 15 y 30 para oABCG2.

En las figuras 49, 50 y 51 podemos observar los resultados a las 8 semanas de cultivo para los clones seleccionados. En cuanto a la acumulación de mitoxantrona para los clones de ABCG2 bovina tanto los que expresan la variante S581 como los de la variante Y581, no se produjeron cambios en la acumulación de mitoxantrona con el tiempo en ninguno de los casos (Figura 49A y 50A). Los clones de ABCG2 ovina mostraron un leve aumento de la acumulación de mitoxantrona con el tiempo en todos

los casos, siendo esas diferencias significativas en el caso de los clones 16 y 37 (Figura 51A).

En cuanto a la expresión de GFP, cabe destacar que no se observaron cambios significativos con el tiempo para ninguno de los clones de la variante bovina Y581 (Figura 50B). En cambio en la variante S581 el clon 18 mostró un porcentaje de células GFP positivas inferior al 40% a las 8 semanas. Respecto a oABCG2, el clon 37 sufrió una pérdida significativa de fluorescencia y, por otro lado, se produjo un aumento significativo en el caso del clon 16 (Figura 51B), coincidiendo estos clones con los que presentaban cambios en la acumulación de mitoxantrona (Figura 51A). Además, parte de la población celular del clon 2 perdió expresión, ya que el porcentaje de células GFP positivas fue inferior al 50% a las 8 semanas. En el resto de los clones no se observó disminución significativa en el porcentaje de células GFP positivas.

Además de ensayos de citometría para comprobar la funcionalidad del transportador, estudiamos también la estabilidad de la expresión a nivel de proteína. Para ello, con los clones candidatos de los ensayos de acumulación que presentaban las mejores características (clones 15 y 16 de la variante S581, clones 12 y 15 de la variante Y581 y clones 13 y 16 de oABCG2) realizamos análisis de western-blot para evaluar los niveles de proteína a las 0 y 8 semanas (Figura 52). Los resultados obtenidos no reflejaron pérdida en la expresión de proteína a lo largo del tiempo en ninguno de los clones seleccionados. Además, mostraron unos niveles de expresión de proteína similares entre ABCG2 ovina y ambas variantes del transportador bovino.



Figura 49. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones MEF3.8 transducidos con la variante **bABCG2-S581**. A Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 8 semanas de la transducción. B Expresión de GFP a las 0 y 8 semanas de la transducción. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos (mediana de las unidades de fluorescencia); las barras de error indican la desviación típica. R, células transducidas con el cDNA de Abcg2 de ratón. L4, vector vacío.


Figura 50. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones MEF3.8 transducidos con la variante **bABCG2-Y581**. A Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 8 semanas de la transducción. B Expresión de GFP a las 0 y 8 semanas de la transducción. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos (mediana de las unidades de fluorescencia); las barras de error indican la desviación típica. R, células transducidas con el cDNA de Abcg2 de ratón. L4, vector vacío.



Figura 51. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones MEF3.8 que expresan oABCG2. A Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 8 semanas de la transducción. **B** Expresión de GFP a las 0 y 8 semanas de la transducción. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos (mediana de las unidades de fluorescencia); las barras de error indican la desviación típica. R, células transducidas con el cDNA de Abcg2 de ratón. L4, vector vacío. *Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre las 0 y 8 semanas para un mismo clon.



Figura 52. Estabilidad de la expresión de clones MEF3.8 candidatos transducidos con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 mediante análisis por western-blot. La ß-actina se emplea como control de carga. (T=0, 0 semanas; T=8, 8 semanas).

Para completar la evaluación de los clones seleccionados y determinar la correcta localización del transportador en la membrana apical, a diferencia de lo que ocurre en el SNP S441N del transportador ABCG2 humano que afecta a la localización de la proteína, pasando a ocupar una localización intracelular (Kondo y cols., 2004), se llevaron a cabo estudios de inmunocitoquímica. La expresión de ABCG2 fue analizada mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo primario BXP-53 y a continuación, un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 568 (marcaje rojo), contrastando los núcleos con DAPI.

Como podemos observar en la figura 53, no se detectó fluorescencia específica en la membrana apical ni en el citoplasma tras la transducción con el cDNA del vector vacío. Sin embargo, los clones analizados transducidos con el transportador ABCG2 bovino y ovino presentaron marcaje específico en la membrana plasmática, no apreciándose diferencias en la intensidad de la fluorescencia entre los distintos clones, ni alteraciones en la distribución subcelular. Por lo tanto, nuestros resultados indicaron que ni el SNP ni la diferencia de especie afectaron a la localización del transportador.

C, 15-bABCG2-S581 D, 16-bABCG2-S581



Figura 53. Inmunolocalización del transportador ABCG2 bovino y ovino en los clones MEF3.8. Observamos los núcleos de las células en color azul (DAPI). Las fotografías son secciones ópticas individuales x, y. Aumento 60X.

5.2.3.2. Estudios de inhibición con doramectina, ivermectina y equol

Para el estudio de las diferencias interespecíficas y polimórficas en cuanto a la inhibición del transportador se emplearon como inhibidores las lactonas macrocíclicas doramectina e ivermectina y el isoflavonoide equol en experimentos de acumulación de mitoxantrona utilizando los clones MEF3.8 generados. Estas células son fibroblastos embrionarios de ratón Mdr1a/1b^{-/-} y Mrp1^{-/-} (Allen y cols., 2000) y constituyen una excelente herramienta para el estudio de inhibidores específicos de ABCG2. Se empleó Ko143 como control positivo de inhibición. Ante la ausencia de diferencias entre los clones seleccionados dentro de la misma variante y para simplificar los ensayos, se decidió proseguir con un clon de cada tipo para los siguientes ensayos (el clon 15 para bABCG2-S581, el clon 12 para bABCG2-Y581 y el clon 13 para oABCG2).

Al añadir la doramectina, la acumulación de mitoxantrona (Figura 54) aumentó en las células que sobreexpresan ABCG2, lo que nos indica que este compuesto es un inhibidor efectivo de ABCG2 bovina y ovina, a las concentraciones ensayadas. El análisis estadístico reflejó diferencias significativas en la inhibición de la acumulación de mitoxantrona mediada por ABCG2 por parte de la doramectina entre las dos especies a las concentraciones de 0,5, 1, 2,5 y 10 μ M, llegando en el transportador ovino a una potencia inhibitoria del 80% a la concentración de 25 μ M (Figura 55). Los valores de IC₅₀ obtenidos fueron inferiores en el caso de las células que sobreexpresan ABCG2 ovino en comparación con el transportador bovino, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el caso de las dos variantes de ABCG2 bovina no se observaron diferencias significativas.

Al añadir la ivermectina, la acumulación de mitoxantrona (Figura 56) aumentó en las células que sobreexpresan ABCG2, lo que nos indica que este compuesto es un inhibidor efectivo de ABCG2 bovina como ya había sido descrito por nuestro grupo de investigación (Merino y cols., 2009) y, también, de ABCG2 ovina, a las concentraciones ensayadas. En el caso de la ivermectina, los valores de potencia inhibitoria no llegaron al 50% en ningún caso. El análisis estadístico reflejó diferencias significativas en la inhibición de la acumulación de mitoxantrona por parte de la ivermectina entre las dos variantes de ABCG2 bovina a 5, 10 y 25 µM, siendo superior dicha inhibición en la variante Y581 (Figura 57). Además, en el caso del transportador

ovino sólo se observó una inhibición significativamente superior frente a la variante bovina Y581 a la concentración de 5 μ M.

En el caso de la utilización de equol como inhibidor, también se observó que la acumulación de mitoxantrona (Figura 58) aumentaba en las células que sobreexpresan ABCG2, lo que es indicativo de que este compuesto es un inhibidor efectivo de ABCG2 bovina y ovina, a las concentraciones ensayadas. El análisis estadístico reflejó diferencias significativas en la inhibición de la acumulación de mitoxantrona por parte del equol entre las dos especies a todas las concentraciones estudiadas excepto a 25 μ M, siendo superior dicha inhibición en ABCG2 ovina, superando el 50% de inhibición a 100 μ M. Sin embargo, entre las dos variantes de ABCG2 bovina, sólo se observaron diferencias significativas en dos de las concentraciones ensayadas (25 y 100 μ M), siendo superior la inhibición en el caso de la variante S581 (Figura 59).

En general, el transportador ovino sufre una mayor inhibición que el bovino utilizando doramectina o equol, sobre todo a las concentraciones más altas. Además, existen diferencias entre ambas variantes del transportador bovino en cuanto a la capacidad de ser inhibidas que dependen del compuesto utilizado.



Figura 54. Efecto de la lactona macrocíclica **doramectina** (DORA) sobre el efecto mediado por el transportador en la acumulación de mitoxantrona (10 μ M) en células MEF3.8 (parental) y los clones transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Las células fueron preincubadas con o sin Ko143 (1 μ M) o doramectina a las concentraciones indicadas. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos; las barras de error indican la desviación típica (n=3).



Figura 55. Potencia inhibitoria de la lactona macrocíclica **doramectina** (DORA) en los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos; las barras de error indican la desviación típica (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) respecto a bABCG2 Y581.



Figura 56. Efecto de la lactona macrocíclica **ivermectina** (IVER) sobre el efecto mediado por el transportador en la acumulación de mitoxantrona (10 μ M) en células MEF3.8 (parental) y los clones transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Las células fueron preincubadas con o sin Ko143 (1 μ M) o ivermectina a las concentraciones indicadas. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos; las barras de error indican la desviación típica (n=3).



Figura 57. Potencia inhibitoria de la lactona macrocíclica **ivermectina** (IVER) en los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos; las barras de error indican la desviación típica (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) respecto a bABCG2 Y581.



Figura 58. Efecto del isoflavonoide **equol** (EQL) sobre el efecto mediado por el transportador en la acumulación de mitoxantrona (10 μ M) en células MEF3.8 (parental) y los clones transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Las células fueron preincubadas con o sin Ko 143 (1 μ M) o equol a las concentraciones indicadas. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos; las barras de error indican la desviación típica (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) respecto bABCG2 Y581.



Figura 59. Potencia inhibitoria del isoflavonoide **equol** (EQL) en los clones MEF3.8 transducidos con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos; las barras de error indican la desviación típica (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) respecto a bABCG2 Y581.

5.2.4. EXPRESIÓN ESTABLE DE ABCG2 BOVINA (Y581, S581) Y ABCG2 OVINA EN CÉLULAS HEK293

Tras observar los resultados anteriormente descritos con las células MEF3.8 donde se pone de manifiesto una respuesta diferencial interespecífica y polimórfica del transportador ABCG2 nos propusimos obtener otro modelo celular de expresión estable que nos permitiese profundizar en la caracterización de ABCG2 de rumiantes. El tipo celular elegido fueron las células HEK293. El método utilizado para generar las líneas estables se describe detalladamente en el apartado 4.9.2.2 de Material y Métodos.

5.2.4.1. Establecimiento de las líneas celulares

A. Análisis y selección inicial de los clones

A las 72 horas de la transfección con cada una de las variantes del transportador (oABCG2, bABCG2-Y581, bABCG2-S581) y el vector vacío se valoró la eficiencia de la misma mediante el porcentaje de la población GFP positivo en cada caso. Los resultados observados al microscopio oscilaron entre el 20 y el 30% de células GFP positivas, independientemente de la variante transducida.

Pasados 20 días tras la lipofección y habiendo mantenido las células bajo selección con G418, se procedió a seleccionar y tripsinizar los clones GFP positivos que presentaban un tamaño adecuado, utilizando cilindros de clonación. En total se tripsinizaron 101 clones, 37 de los cuales correspondieron al vector vacío, 10 a ABCG2 ovina, 24 a la variante bABCG2-S581 y 30 a la variante bABCG2-Y581. A medida que las células fueron proliferando y conseguimos un número suficiente de cada clon, se valoraron por citometría, comprobando el nivel de expresión de GFP, la homogeneidad de la expresión en las células de un clon (porcentaje de células GFP positivas), así como su funcionalidad en cuanto a la acumulación de mitoxantrona.

Nuestros criterios para la evaluación y selección inicial de los clones fueron similares a los utilizados en el caso de los clones MEF3.8:

- Elevada expresión de GFP y homogeneidad en la expresión de GFP dentro de las células de un mismo clon (porcentaje de células GFP positivas superior al 80%).

-Disminución en la acumulación de mitoxantrona respecto al vector vacío en el caso de los clones transfectados con ABCG2. Ya que no contamos con células HEK293 que expresen ABCG2 de forma estable para tomarlas como referencia, se emplearon células MDCKII transducidas con Abcg2 de ratón para realizar los ajustes del citómetro y se seleccionaron los clones con menor acumulación de mitoxantrona.

-En el caso de las células transfectadas con el vector vacío, consideramos acumulaciones de mitoxantrona similares a las de las células de la línea parental. En este caso, de los 26 clones obtenidos, los clones 1, 21, 22, 23 y 25 presentaron valores de acumulación de mitoxantrona similares a los de las células parentales y porcentajes de transducción superiores al 80%. Utilizamos el clon 1 como referencia y lo llamamos V (Figura 60).

En la figura 61 se muestran los resultados de funcionalidad del transportador correspondientes a todos los clones de la variante bABCG2-S581. En lo que se refiere a la acumulación de mitoxantrona, la mayoría de los clones presentaron valores inferiores a 80 unidades arbitrarias de fluorescencia. En el caso de la expresión de GFP, el 50% de los clones, se caracterizaron por presentar porcentajes de células GFP positivas superiores al 80%. Sin embargo, los valores de fluorescencia para GFP fueron considerablemente bajos si los comparamos con los clones MEF3.8 generados (Figura 43).

En la figura 62 observamos los resultados correspondientes a los clones de la variante bABCG2-Y581. En este caso, la mayoría de los clones presentaron una mayor acumulación de mitoxantrona que los de la variante S581, muchos de ellos por encima de las 80 unidades de fluorescencia, pero también se observó un menor número de clones con porcentajes de células GFP positivas superior al 80%, sólo un 20% de los clones. De nuevo, los valores de fluorescencia para GFP fueron bajos.

En la figura 63 están representados los resultados observados para los clones de ABCG2 ovina. De modo similar al caso anterior, la tendencia fue hacia clones con mayor acumulación de mitoxantrona que los de la variante S581; en cambio, se observó un 60% de clones con porcentajes de células GFP positivas superior al 80%, siendo los valores de fluorescencia para GFP también bajos.

Como resumen de los datos expuestos, en las figuras 64, 65 y 66 se relacionan los valores correspondientes a la fluorescencia de GFP (eje de ordenadas) respecto a los de la acumulación de mitoxantrona (eje de abscisas), para los clones transducidos con las dos variantes de ABCG2 bovina y ABCG2 ovina. Es de destacar que de los clones de la variante bovina S581 situados en la parte superior, la mayoría se sitúa además en el cuadrante izquierdo, es decir, la mayor parte de los clones caracterizados por valores elevados de fluorescencia para GFP, presentaron también una buena funcionalidad del transportador. No ocurre lo mismo con la otra variante bovina Y581 y el transportador ovino (Figura 65 y 66).

Los clones situados en el cuadrante superior izquierdo, que cumplen dos de los criterios indicados en párrafos anteriores (elevada fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona) son los que aparecen señalados con un círculo en la leyenda y los que fueron seleccionados inicialmente en cada caso. En el caso de la variante bABCG2-S581, obtuvimos 11 clones con características adecuadas, pero de ellos descartamos 6, los clones 6, 8, 10, 11, 20 y 21 porque presentaron porcentajes de células GFP positivas inferiores al 80% y, también, el clon 19 porque presentaba el mayor nivel de acumulación de mitoxantrona dentro del grupo de clones seleccionados. Además, decidimos añadir el clon 4 por presentar un elevado porcentaje de células GFP positivas. Para la variante bABCG2-Y581 obtuvimos 6 clones situados en el cuadrante superior izquierdo, pero de ellos descartamos 3, los clones 11, 22 y 28 porque presentaron porcentajes de células GFP positivas inferiores al 80%. En cambio, decidimos añadir los clones 7, 8 y 24 por presentar un elevado porcentaje de células GFP positivas. Para oABCG2 obtuvimos 3 clones situados en el cuadrante superior izquierdo, todos ellos presentaron un porcentaje de células GFP positivas superior al 80%. Y añadimos otros 2 clones más, el clon 6 y el clon 7, con un alto porcentaje de células GFP positivas.



Figura 60. Análisis del vector vacío en los clones HEK293. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP. Los distintos números en el eje de abscisas se refieren a los diferentes clones obtenidos. Los números de la parte superior de las barras hacen referencia al porcentaje de células GFP positivas de cada clon. P, células parentales.



Figura 61. Funcionalidad de la variante bABCG2-S581 en los clones HEK293. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP. Los distintos números en el eje de abscisas se refieren a los diferentes clones obtenidos. Los números de la parte superior de las barras hacen referencia al porcentaje de células GFP positivas de cada clon. V, vector vacío.



Figura 62. Funcionalidad de la variante bABCG2-Y581 en los clones HEK293. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP. Los distintos números en el eje de abscisas se refieren a los diferentes clones obtenidos. Los números de la parte superior de las barras hacen referencia al porcentaje de células GFP positivas de cada clon. V, vector vacío.



Figura 63. Funcionalidad de la variante oABCG2 en los clones HEK293. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP. Los distintos números en el eje de abscisas se refieren a los diferentes clones obtenidos. Los números de la parte superior de las barras hacen referencia al porcentaje de células GFP positivas de cada clon. V, vector vacío.



Figura 64. Clasificación de los clones HEK293 transducidos con bABCG2- S581 en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona. Los clones señalados en la leyenda con un círculo son los que presentaron mayor fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona.



Figura 65. Clasificación de los clones HEK293 transducidos con bABCG2- Y581 en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona. Los clones señalados en la leyenda con un círculo son los que presentaron mayor fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona.



Figura 66. Clasificación de los clones HEK293 transducidos con oABCG2 en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona. Los clones señalados en la leyenda con un círculo son los que presentaron mayor fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona.

B. Caracterización de los clones seleccionados

Con el fin de comprobar la estabilidad de la expresión de ABCG2 en los clones obtenidos, estos se mantuvieron en cultivo durante 6 semanas, subcultivándolos cada 3 ó 4 días y repitiendo los ensayos de citometría a las 3 y las 6 semanas. Ninguno de los clones presentó cambios en la acumulación de mitoxantrona ni en la intensidad de fluorescencia para GFP a las 3 semanas; por ello, se mantuvieron en cultivo hasta las 6 semanas. En las figuras 67, 68 y 69 podemos observar los resultados a las 6 semanas de cultivo para los clones seleccionados.

En cuanto a la acumulación de mitoxantrona en todos los casos, tanto para los clones de ABCG2 bovina tanto la variante S581 como la variante Y581 como para los de ABCG2 ovina, se produjo un ligero aumento de la acumulación de mitoxantrona con el tiempo pero no fue significativo en ninguno de los casos (Figura 67A, 68A y 69A). En cuanto a la expresión de GFP, cabe destacar que no se observaron cambios significativos con el tiempo para ninguno de los clones del transportador ovino ni bovino. Tampoco se observó disminución significativa en el porcentaje de células GFP positivas.

Además de ensayos de citometría para comprobar la funcionalidad del transportador, estudiamos también la estabilidad de la expresión a nivel de proteína. Para ello, realizamos un primer western-blot para evaluar el nivel de expresión de ABCG2 empleando los clones con mejores características hasta el momento (Figura 70A). Teniendo en cuenta que en el western-blot anterior no se observaron diferencias significativas en la expresión del transportador entre los distintos clones, elegimos un clon de cada grupo (el clon 9 para bABCG2-S581, el clon 1 para bABCG2-Y581 y el clon 8 para oABCG2) para evaluar la estabilidad de la expresión de ABCG2 a las 0 y 6 semanas (Figura 70B) y para proseguir con los experimentos posteriores. Los resultados obtenidos para los clones que expresan ABCG2 bovina y ovina, recogidos en la figura 70B, no reflejaron pérdida en la expresión de proteína a lo largo del tiempo.

En cuanto a los estudios de inmunocitoquímica para determinar la localización del transportador, no fue posible su realización en este modelo celular debido a la pobre adherencia de las células a la superficie de cultivo.



Figura 67. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones HEK293 que expresan bABCG2-S581. A Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 6 semanas de la transducción. B Expresión de GFP a las 0 y 6 semanas de la transducción. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos (mediana de las unidades de fluorescencia); las barras de error indican la desviación típica. V, vector vacío.



Figura 68. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones HEK293 que expresan bABCG2-Y581. A Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 6 semanas de la transducción. B Expresión de GFP a las 0 y 6 semanas de la transducción. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos (mediana de las unidades de fluorescencia); las barras de error indican la desviación típica. V, vector vacío.



Figura 69. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones HEK293 que expresan oABCG2. A Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 6 semanas de la transducción. **B** Expresión de GFP a las 0 y 6 semanas de la transducción. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos (mediana de las unidades de fluorescencia); las barras de error indican la desviación típica. V, vector vacío.

A



B



Figura 70. Estabilidad de la expresión de clones HEK293 candidatos para bABCG2- S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 mediante análisis por western-blot. La ß-actina se emplea como control de carga. (T=0, 0 semanas; T=6, 6 semanas) **A** Clones preseleccionados a las 6 semanas **B** Clones definitivos a las 0 y 6 semanas.

5.2.4.2. Estudios de inhibición con sulfametoxazol y tilmicosin

Tras observar las diferencias interespecíficas y polimórficas obtenidas con los clones MEF3.8 y una vez validado el modelo celular de expresión estable en HEK293 para ABCG2, nos pareció interesante analizar el efecto inhibidor sobre el transportador de los antibióticos bacterióstaticos sulfametoxazol y tilmicosin, de amplio uso en medicina veterinaria, en ensayos de acumulación de mitoxantrona utilizando las células HEK293 generadas. En este caso, se empleó fumitremorgina C como control positivo de inhibición.

Al añadir sulfametoxazol (Figura 71), la acumulación de mitoxantrona no aumentó en las células que sobreexpresan ABCG2, lo que nos indica que este compuesto no es un inhibidor efectivo de ABCG2 bovina ni ovina, a las concentraciones ensayadas.

De modo análogo al ensayo anterior, al añadir tilmicosin (Figura 72), la acumulación de mitoxantrona no aumentó en las células que sobreexpresan ABCG2, por lo que este compuesto tampoco es un inhibidor efectivo de ABCG2 de rumiantes, a las concentraciones ensayadas.



Figura 71. Efecto del antibiótico **sulfametoxazol** (SMX) sobre el efecto mediado por el transportador en la acumulación de mitoxantrona (5 μ M) en células HEK293 transfectadas con vector vacío (V), con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Las células fueron preincubadas con o sin fumitremorgina C (FTC) o sulfametoxazol a las concentraciones indicadas. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos; las barras de error indican la desviación típica (n=3).



Figura 72. Efecto del antibiótico **tilmicosin** (TMS) sobre el efecto mediado por el transportador en la acumulación de mitoxantrona (5 μ M) en células HEK293 transfectadas con vector vacío (V), con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Las células fueron preincubadas con o sin fumitremorgina C (FTC) o tilmicosin a las concentraciones indicadas. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos; las barras de error indican la desviación típica (n=3).

5.2.4.3. Estudios de citotoxicidad con mitoxantrona, ivermectina, sulfametoxazol y tilmicosin

Aunque la transfección de ABCG2 ovina y ambas variantes bovinas en las HEK293 no fue tan eficaz como en las MEF3.8 (Figuras 46-48 y 64-67), dado que existió una adecuada expresión y funcionalidad del transportador (Figura 67), se decidió emplearlas en estudios de citotoxidad para caracterizar con mayor detalle las diferencias interespecíficas y polimórficas. Decidimos emplear un conocido sustrato de ABCG2 como es la mitoxantrona, un inhibidor del transportador bovino como es la ivermectina (Merino y cols, 2009) y los dos antibióticos (sulfametoxazol y tilmicosin) que habíamos empleado en los ensayos previos de inhibición.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron siguiendo el procedimiento anteriormente descrito en el apartado 4.6 de Material y Métodos. Así, las células HEK293 transfectadas con vector vacío, ABCG2 bovina y ABCG2 ovina se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/pocillo durante 24 horas. Posteriormente, se aplicó una serie de concentraciones del fármaco objeto de estudio (mitoxantrona 0,0003-2µM, sulfametoxazol 7,8-2000 µM, ivermectina 0,6-150 µM y

tilmicosin 3,9-1000 μ M) a lo largo de un eje de la placa y se incubó durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. La proliferación celular relativa se cuantificó mediante el ensayo de MTT.

Los experimentos de citotoxicidad con mitoxantrona reflejaron una IC_{50} mayor en el caso de ABCG2 ovina, lo que indica una mayor resistencia y, por tanto, una mayor actividad del transportador en las células que sobreexpresan el transportador ovino (Figura 73A, Tabla 11). Además, comparando las dos variantes de ABCG2 bovina se observó una mayor resistencia a mitoxantrona en el caso de la variante S581, lo que confirma la mayor actividad de esta variante frente a la Y581. En el caso de los otros tres compuestos, podemos decir que ABCG2 no confiere resistencia frente a ellos en nuestro modelo celular ya que las curvas de viabilidad del vector vacío y del resto de variantes de ABCG2 son muy similares (Figura 73B, C y D).



Figura 73. Ensayo de citotoxicidad empleando mitoxantrona (A), ivermectina (B), sulfametoxazol (C) y tilmicosin (D) en células HEK293 transfectadas con vector vacío, con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos; las barras de error indican la desviación típica (n=3).

	$IC_{50}(x10^{-2})$	R
Vector vacío	$0,1 \pm 0,002$	
bABCG2 S581	$1,3 \pm 0,02*$	13
bABCG2 Y581	$0,7\pm0,07$	7
oABCG2	3,1 ± 0,23*	31

Tabla 11. Valores de IC₅₀ (μ M) para el ensayo de citotoxicidad empleando mitoxantrona y células HEK293 transfectadas con vector vacío, con bABCG2 (S581, Y581) y oABCG2. Los resultados están expresados como la media de al menos tres experimentos ± desviación típica (n=3). R= factor de resistencia (IC₅₀ ABCG2/ IC₅₀ vector vacío). *Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) respecto bABCG2 Y581.

5.2.5. EXPRESIÓN ESTABLE DE ABCG2 OVINA EN CÉLULAS MDCKII

Tras observar la gran utilidad de los modelos celulares anteriormente descritos en el presente trabajo a la hora de caracterizar las diferencias funcionales entre las dos variantes de ABCG2 bovina y su comparación con el transportador ovino, nos propusimos obtener un modelo de expresión estable que nos permitiera llevar a cabo otro tipo de ensayos, como los de transporte transepitelial de fármacos. Este tipo de ensayos es, a menudo, más sensible que los experimentos de acumulación celular para detectar sustratos de ABCG2 (Tang y cols., 2012). Además, teniendo en cuenta que ya contamos con la expresión estable de las dos variantes de ABCG2 bovina en células MDCKII (Real y cols., 2011b) y que estas células son un modelo celular ampliamente utilizado para ensayos de transporte, decidimos expresar de forma estable ABCG2 ovina en este modelo celular para poder realizar estudios comparativos entre especies. El método utilizado para generar las líneas estables fue la infección con retrovirus, según se describe en el apartado 4.9.2 de Material y Métodos.

5.2.5.1. Establecimiento de la línea celular

A. Análisis y selección inicial de los clones

A las 72 horas de la transducción con oABCG2, se valoró la eficiencia de la misma mediante el porcentaje de la población GFP positivo. Los resultados observados al microscopio oscilaron entre el 30 y el 50% de células GFP positivas.

Pasados 4 días tras la transducción, se procedió a seleccionar y a tripsinizar los clones GFP positivos que presentaban un tamaño adecuado utilizando cilindros de clonación. Se seleccionaron 35 clones en total. A medida que las células fueron proliferando y conseguimos un número suficiente de cada clon, se valoraron por citometría, comprobando el nivel de expresión de GFP, la homogeneidad de la expresión en las células de un clon (porcentaje de células GFP positivas), así como su funcionalidad en cuanto a la acumulación de mitoxantrona.

Para la evaluación y selección de los clones seguimos los mismos criterios establecidos para los modelos celulares anteriores, es decir, una elevada expresión de GFP con un porcentaje de células GFP positivas superior al 80% y una acumulación de mitoxantrona menor que en las células MDCKII parentales. Se tomaron como referencia células transducidas con la variante Y581 bovina.

En la figura 74 se muestran los resultados de funcionalidad del transportador correspondiente a ABCG2 ovina. En lo que se refiere a la acumulación de mitoxantrona, la mayoría de los clones presentaron valores inferiores a 30 unidades arbitrarias de fluorescencia (sólo 4 se situaron por encima de este nivel). En el caso de la expresión de GFP, la mitad de los clones, aproximadamente, se caracterizaron por presentar porcentajes de células GFP positivos superiores al 80% y valores de fluorescencia elevados.

Como resumen de los datos expuestos, en la figura 75 se relacionan los valores correspondientes a la fluorescencia de GFP (eje de ordenadas) respecto a los de la acumulación de mitoxantrona (eje de abscisas), para los clones transducidos con ABCG2 ovina. Es de destacar que de los clones situados en la parte superior, la mayoría se sitúa además en el cuadrante izquierdo, es decir, la mayor parte de los clones caracterizados por valores elevados de fluorescencia para GFP, presentaron también una buena funcionalidad del transportador.

Los clones situados en el cuadrante superior izquierdo, que cumplen dos de los criterios indicados en párrafos anteriores (elevada fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona) son los que aparecen señalados con un círculo en la leyenda y los que fueron seleccionados inicialmente. Concretamente, obtuvimos 26 clones con características adecuadas, pero de ellos descartamos 11, los clones 1, 2, 3, 5,

14, 18, 21, 23, 29, 32 y 35 porque presentaron porcentajes de células GFP positivas inferiores al 80%. También descartamos los clones 7, 8 y 26 porque presentaban unos valores excesivamente elevados de fluorescencia para GFP, y los clones 11 y 34 porque presentaban dos poblaciones diferenciadas de células. Como el número de clones seleccionados continuaba siendo muy numeroso, decidimos descartar los clones 31 y 33 por ser los clones que peor cumplían los criterios de selección propuestos.



Figura 74. Funcionalidad de oABCG2 en los clones MDCKII. A Acumulación de mitoxantrona tras incubar a las células durante 1 hora con el fármaco. **B** Expresión de GFP. Los distintos números en el eje de abscisas se refieren a los diferentes clones obtenidos. Los números de la parte superior de las barras hacen referencia al porcentaje de células GFP positivas de cada clon. Y, células transducidas con el cDNA de bABCG2 Y581. P, células parentales.



Figura 75. Clasificación de los clones MDCKII transducidos con oABCG2 en función de la expresión de GFP y de la acumulación de mitoxantrona. Los clones señalados en la leyenda con un círculo son los que presentaron alta fluorescencia para GFP y baja acumulación de mitoxantrona.

B. Caracterización de los clones seleccionados

Con el fin de comprobar la estabilidad de la expresión de ABCG2 en los clones obtenidos, estos se mantuvieron en cultivo durante 8 semanas, subcultivándolos cada 3 ó 4 días y repitiendo los ensayos de citometría a las 8 semanas. En la figura 76 podemos observar los resultados para los clones seleccionados.

En cuanto a la acumulación de mitoxantrona para los clones de oABCG2, no se produjo aumento de la acumulación de mitoxantrona con el tiempo en ninguno los casos (Figura 76A). En cuanto a la expresión de GFP, cabe destacar que los clones 20 y 30 sufrieron una pérdida significativa de fluorescencia. En el resto de los clones no se observó disminución significativa en la fluorescencia ni en el porcentaje de células GFP positivas. Teniendo en cuenta que, en general, no se observaron cambios funcionales a lo largo del tiempo, se decidió continuar con los clones 9, 16, 17 y 24.

Además de ensayos de citometría para comprobar la funcionalidad del transportador, evaluamos también la estabilidad de la expresión a nivel de proteína mediante western-blot en los cuatro clones seleccionados. Los resultados obtenidos para los clones pertenecientes a ABCG2 ovina no reflejaron pérdida de expresión de proteína con el tiempo (Figura 77A). Su comparación con las variantes bovinas muestran una

señal superior en el transportador ovino, aunque no podemos descartar una diferente afinidad del anticuerpo según la especie (Figura 77B).



Figura 76. Estabilidad de la funcionalidad del transportador ABCG2 y la expresión de GFP de los clones MDCKII de la variante ovina. A Acumulación de mitoxantrona 10 μ M (MXR) a las 0 y 8 semanas de la transducción. B Expresión de GFP a las 0 y 8 semanas de la transducción. Los resultados se expresan como la media de al menos tres experimentos (mediana de las unidades de fluorescencia); las barras de error indican la desviación típica. Y, células transduccidas con el cDNA de bABCG2 Y581. P, células parentales. *Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre las 0 y 8 semanas para un mismo clon.



Figura 77. Estabilidad de la expresión de clones MDCKII candidatos para ABCG2 ovina mediante análisis por western-blot. La ß-actina se emplea como control de carga. (T=0, 0 semanas; T=8, 8 semanas). A Clones preseleccionados a las 0 y 8 semanas B Clones definitivos a las 0 y 8 semanas.

Para completar la evaluación de los clones seleccionados y determinar la correcta localización del transportador en la membrana apical se llevaron a cabo estudios de inmunocitoquímica con los clones 16 y 24. La expresión de ABCG2 fue analizada mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo primario BXP-53 y a continuación, un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 568 (marcaje rojo), contrastando los núcleos con DAPI.

Como podemos observar en la figura 78 los clones analizados transducidos con el transportador ABCG2 ovino presentaron marcaje específico en la membrana plasmática, no apreciándose diferencias en la intensidad de la fluorescencia entre los dos clones, ni alteraciones en la distribución subcelular.

A, 16-0ABCG2





B, 24-0ABCG2

Figura 78. Inmunolocalización del transportador ABCG2 ovino en los clones MDCKII. Observamos los núcleos de las células en color azul (DAPI). Las fotografías son secciones ópticas individuales x, y. Aumento 60X.

5.2.5.2. Diferencias entre ambas variantes de la ABCG2 bovina y ABCG2 ovina en el transporte de compuestos

Los resultados obtenidos en apartados anteriores con otros modelos celulares han mostrado diferencias en el comportamiento de ABCG2 entre las dos variantes bovinas del transportador y, también, en comparación con ABCG2 ovina. Por ello, decidimos ampliar nuestros estudios a otro tipo de ensayos, como son los ensayos de transporte transepitelial. Para este fin, empleamos los siguientes compuestos:

- Nitrofurantoína (Merino y cols., 2005b), empleada como sustrato modelo. Nos permitirá verificar la funcionalidad del clon generado con ABCG2 ovina y, a la vez, comparar con ambas variantes de ABCG2 bovina.
- Marbofloxacina, orbifloxacina, sarafloxacina, difloxacina y danofloxacina fluoroquinolonas utilizadas en terapéutica veterinaria e identificadas por nosotros en la presente memoria como sustratos de Abcg2 murina.
- Riboflavina identificada como sustrato de Abcg2 murina (van Herwaarden y cols., 2007).

Para clarificar las figuras correspondientes al transporte vectorial de estos compuestos mediado por ambas variantes de ABCG2 bovina y ABCG2 ovina (Figuras 79-85) se han eliminado las gráficas correspondientes a las células transducidas con el

cDNA correspondiente al vector vacío, ya que no se observaron diferencias significativas entre las mismas y las células parentales, lo que descarta cualquier efecto dependiente del vector. Para todos los ensayos se utilizaron los clones transducidos con ambas variantes de ABCG2 bovina descritos por Real y cols. (2011b) y el clon 24 de ABCG2 ovina generado en el presente estudio. Los ensayos de transporte de nitrofurantoína (Figura 79), confirmaron la funcionalidad del transportador ovino, ya que existió un transporte preferencial en dirección B-A que revirtió en presencia del inhibidor Ko143 en las células transducidas. La comparación con los datos publicados de ratio BA/AB por Real y cols. (2011b) del transporte en las dos variantes bovinas parece indicar que las células transducidas con ABCG2 ovina muestran una mayor eficacia en el transporte. La figura 79 únicamente recoge el ensayo para oABCG2 pero la Tabla 12 recoge los resultados correspondientes en ovino y bovino.

Nuestros resultados con las fluoroquinolonas investigadas indican que son sustratos del transportador ABCG2 bovino y ovino, con un transporte preferencial en dirección B-A sensible a Ko143 en las células transducidas y ausente en las células parentales (Figuras 80-84). En cuanto a los ratios BA/AB (Tablas 13-17) fueron significativamente superiores en las células transducidas con ABCG2 en comparación con las parentales. Comparando las dos variantes del transportador ABCG2 bovino, podemos observar un transporte más eficiente de la variante S581, obteniéndose diferencias significativas con la variante Y581 para la marbofloxacina, la difloxacina y la danofloxacina (Tablas 13, 14 y 17). Estos resultados coinciden en señalar la mayor actividad de la variante S581 respecto a la Y581 de ABCG2 bovina.

En cuanto a la comparación de ABCG2 bovina y ovina, se observaron diferencias entre las mismas para todas las fluoroquinolonas ensayados (Tablas 13-17). En la mayoría de los casos ABCG2 ovina presentó mayores ratios BA/AB con respecto a cualquiera de las dos variantes bovinas, excepto para la marbofloxacina y la difloxacina que sólo presentaron un transporte mediado por ABCG2 ovina significativamente superior respecto a la variante Y581 bovina.

En el caso de la riboflavina (Figura 85, Tabla 18), en las células parentales se observó un transporte preferencial en dirección A-B con un transporte B-A muy bajo, reflejando un transporte activo de absorción de riboflavina. ABCG2 está localizada en

el lado apical y, por tanto, debería transportar este compuesto hacia el lado apical de la monocapa, posiblemente contrarrestando el proceso endógeno de absorción. De hecho, las células transducidas tanto con ABCG2 ovino como bovino reflejaron una disminución del transporte A-B y un aumento del transporte B-A, resultando en un transporte neto apical de riboflavina. Así, por ejemplo, el transporte B-A pasó de ser $1,39 \pm 0,64$ para las células parentales a $6,20 \pm 3,54$ para la células que sobreexpresan ABCG2 ovino y el transporte A-B disminuyó de $22,62 \pm 1,74$ en las células parentales a $7,24 \pm 0,24$ en el caso de ABCG2 ovina. Al igual que sucedía con las fluoroquinolonas, si comparamos las dos variantes del transportador ABCG2 bovino, podemos observar un transporte más eficiente de la variante S581, obteniéndose diferencias significativas entre ABCG2 ovina y bovina, presentando el transportador ovino mayores ratios BA/AB frente a ambas variantes bovinas.



Figura 79. Transporte transepitelial de **nitrofurantoína** (10 μ M) en células parentales y transducidas con oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal o.



Figura 80. Transporte transepitelial de **danofloxacina** (10 μ M) en células parentales y transducidas con oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal o.



Figura 81. Transporte transepitelial de **marbofloxacina** (10 μ M) en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal o (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).


Figura 82. Transporte transepitelial de **orbifloxacina** (10 μ M) en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal o (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).



Figura 83. Transporte transepitelial de **sarafloxacina** (10 μ M) en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal o (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).



Figura 84. Transporte transepitelial de **difloxacina** (10 μ M) en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 (1 μ M). El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal o (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B	
	Parental	5,7±0,4	8,0 ± 0,9	$0,7 \pm 0,1$	
Nitrofurantoina	bABCG2 S581	$9,7 \pm 0,5$	$4,\!4 \pm 0,\!8$	$2,3 \pm 0,3^{*_{\dagger}1}$	
	bABCG2 Y581	$10,7 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,1^{*1}$	
	oABCG2	$10,0 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,4^{*\dagger}$	
	Parental	4,1 ± 1,2	5,6 ± 1,3	$0,7 \pm 0,1$	
Nitrofurantoina + Ko143	bABCG2 S581	$6,8 \pm 0,3$	$7,6 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,1^{1}$	
	bABCG2 Y581	$6,5 \pm 0,8$	$9,1 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,1^{1}$	
	oABCG2	$3,9 \pm 1,0$	$8,7 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,1$	

Tabla 12. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **nitrofurantoína** (10 μ M) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea bABCG2 Y581. ¹ datos tomados de Real y cols., 2011b.

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
	Parental	$7,22 \pm 0,56$	$7,\!40 \pm 0,\!66$	$0,99 \pm 0,16$
Danoflovacina	bABCG2 S581	$13,96 \pm 1,92$	$3,51 \pm 0,40$	$3,97 \pm 0,16^{*\dagger_1}$
Danonoxacina	bABCG2 Y581	$14,77 \pm 0,33$	$6,71 \pm 1,38$	$2,27 \pm 0,49^{*_1}$
	oABCG2	$17,69 \pm 0,72$	$14,88 \pm 0,42$	$12,63 \pm 3,44^{*\dagger}$
	Parental	$6,81 \pm 0,42$	$6,\!89 \pm 0,\!46$	$0,99 \pm 0,01$
Danofloxacina + Ko143	bABCG2 S581	$7,14 \pm 0,97$	$7,56 \pm 0,62$	$0,95 \pm 0,21$
	bABCG2 Y581	$9,18 \pm 0,47$	$9,96 \pm 0,73$	$0,93 \pm 0,12$
	oABCG2	$7,14 \pm 0,41$	$7,66 \pm 0,78$	$0,93 \pm 0,04$

Tabla 13. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **danofloxacina** (10 μ M) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea bABCG2 Y581. ¹ datos tomados de Real y cols., 2011b.

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
	Parental	$7,64 \pm 1,35$	$7,75 \pm 0,86$	$1,04 \pm 0,10$
Marhaflayacina	bABCG2 S581	$12,23 \pm 2,05$	$3,84 \pm 0,65$	$3,22 \pm 0,65^{*\dagger}$
	bABCG2 Y581	$10,30 \pm 0,68$	$7,35 \pm 1,73$	$1,44 \pm 0,24$
	oABCG2	$12,94 \pm 0,70$	$5,68 \pm 0,55$	$2,29 \pm 0,29^{*\dagger}$
Marbofloxacina + Ko143	Parental	8,19 ± 1,63	$8,76 \pm 1,44$	$0,94 \pm 0,13$
	bABCG2 S581	$8,74 \pm 1,56$	$9,68 \pm 1,36$	$0,\!90\pm0,\!04$
	bABCG2 Y581	$9,04 \pm 1,00$	8,86 ± 1,41	$1,03 \pm 0,14$
	oABCG2	$7,56 \pm 0,31$	$9,30 \pm 0,98$	$0,82 \pm 0,05$

Tabla 14. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **marbofloxacina** (10 μ M) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea bABCG2 Y581.

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
	Parental	$5,59 \pm 1,18$	$6,95 \pm 0,22$	$0,80 \pm 0,15$
Orbifloxacina	bABCG2 S581	$11,\!08\pm0,\!79$	$5,11 \pm 0,46$	$2,18 \pm 0,11^{*}$
Orbinoxacilia	bABCG2 Y581	$10,37 \pm 1,64$	$6,11 \pm 0,45$	$1,71 \pm 0,31^{*}$
	oABCG2	$19,65 \pm 13,45$	4,03 ± 3,91	$6,66 \pm 2,37^{*\dagger}$
	Parental	5,50 ± 0,83	$7,39 \pm 0,67$	$0,75 \pm 0,17$
Orbifloxacina + Ko143	bABCG2 S581	$6,\!62 \pm 0,\!47$	$8,06 \pm 1,28$	$0,84 \pm 0,15$
	bABCG2 Y581	$6,\!49 \pm 0,\!41$	$7,\!78 \pm 1,\!09$	$0,85 \pm 0,14$
	oABCG2	$5,95 \pm 0,26$	$7,\!44 \pm 0,\!35$	0.80 ± 0.01

Tabla 15. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **orbifloxacina** (10 μ M) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea bABCG2 Y581.

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
	Parental	$3,63 \pm 0,53$	3,18 ± 0,29	$1,14 \pm 0,07$
Saraflovacina	bABCG2 S581	$6{,}09 \pm 2{,}23$	$3,\!20 \pm 0,\!96$	$1,90 \pm 0,39^{*}$
Saranoxacina	bABCG2 Y581	$7,\!20 \pm 3,\!47$	$4,63 \pm 3,79$	$1,83 \pm 0,53^{*}$
	oABCG2	$8,39 \pm 0,32$	$3,34 \pm 0,25$	$2,52 \pm 0,16^{*\dagger}$
	Parental	$4,74 \pm 1,78$	$4,33 \pm 1,43$	$1,08 \pm 0,07$
Sarafloxacina + Ko143	bABCG2 S581	$5,34 \pm 0,68$	$4,74 \pm 0,80$	$1,13 \pm 0,05$
	bABCG2 Y581	$4,78 \pm 0,15$	$4,96 \pm 1,44$	$1,01 \pm 0,25$
	oABCG2	$3,95 \pm 0,95$	$4,31 \pm 1,27$	$0,93 \pm 0,08$

Tabla 16. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **sarafloxacina** (10 μ M) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea bABCG2 Y581.

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
Difloxacina	Parental	$10,54 \pm 0,45$	$8,\!39\pm0,\!54$	$1,26 \pm 0,11$
	bABCG2 S581	$14,10 \pm 1,21$	$4,26 \pm 0,02$	$3,30 \pm 0,49^{*\dagger}$
	bABCG2 Y581	$11,88 \pm 1,11$	$7,\!43 \pm 0,\!57$	$1,\!60 \pm 0,\!08^*$
	oABCG2	$16,80 \pm 1,24$	5,63 ± 0,24	$2,98 \pm 0,16^{*\dagger}$
Difloxacina + Ko143	Parental	$10,31 \pm 0,09$	$9,18 \pm 0,49$	$1,10 \pm 0,03$
	bABCG2 S581	$10,35 \pm 0,63$	$9,79 \pm 0,11$	$1,06 \pm 0,07$
	bABCG2 Y581	$10,22 \pm 0,41$	$8,\!94\pm0,\!87$	$1,15 \pm 0,07$
	oABCG2	$11,82 \pm 0,64$	$10,39 \pm 0,71$	$1,14 \pm 0,04$

Tabla 17. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **difloxacina** (10 μ M) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea bABCG2 Y581.



Figura 85. Transporte transepitelial de **riboflavina** $(0,1 \ \mu M)$ en células parentales y transducidas con bABCG2-S581, bABCG2-Y581 y oABCG2 en ausencia y en presencia de Ko143 $(1 \ \mu M)$. El fármaco se añadió a un compartimento (basal o apical), y se midió por HPLC el fármaco que apareció en el compartimento opuesto a diferentes tiempos. Traslocación desde el compartimento basal al apical • ; traslocación desde el compartimento apical al basal o (para algunos valores el rango es más pequeño que el tamaño de los símbolos utilizados).

	Subclones	B-A, x10 ⁻⁶ cm/s	A-B, x10 ⁻⁶ cm/s	Ratio B-A/A-B
Riboflavina	Parental	$1,389 \pm 0,637$	22,618 ± 1,742	$0,060 \pm 0,024$
	bABCG2 S581	$2,327 \pm 0,182$	$10,\!443 \pm 0,\!338$	$0{,}223\pm0{,}016^{*\dagger}$
	bABCG2 Y581	$1,818 \pm 0,409$	$15,115 \pm 0,986$	$0,\!120\pm0,\!024^{*}$
	oABCG2	$6,195 \pm 3,536$	$7,235 \pm 0,242$	$0,921 \pm 0,507^{*\dagger}$
Riboflavina + Ko143	bABCG2 S581	$2,016 \pm 0,043$	$22,602 \pm 1,148$	$0,066 \pm 0,040$
	bABCG2 Y581	$1,907 \pm 0,018$	$18,368 \pm 0,321$	$0,104 \pm 0,003$
	oABCG2	$1,\!438 \pm 0,\!048$	$24,\!612\pm2,\!638$	$0,059 \pm 0,004$

Tabla 18. Coeficientes de permeabilidad (Papp) de **riboflavina** (0,1 μ M) en presencia y ausencia de Ko 143 (1 μ M), determinados a ambos lados de la monocapa de células de cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3). *Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea parental. †Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) respecto a la línea bABCG2 Y581.

6. DISCUSIÓN

6.1. ESTUDIO FUNCIONAL COMPARATIVO *IN VITRO* DE Abcg2 MURINA Y ABCG2 HUMANA

En nuestra búsqueda de sustratos del transportador ABCG2, nos propusimos el estudio de la interacción de diversas fluoroquinolonas con Abcg2 de ratón por ser esta una especie modelo en estudios preclínicos y comparamos nuestros resultados con ABCG2 humana.

El grupo de las fluoroquinolonas al que pertenecen, entre otros compuestos, la marbofloxacina, difloxacina, orbifloxacina, sarafloxacina, está considerado como un conjunto de potenciales sustratos de ABCG2. Así, la ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, danofloxacina, grepafloxacina y ulifloxacina han sido descritas como sustratos tanto de ABCG2 humana como de Abcg2 de ratón, en este último caso tanto *in vitro* como *in vivo* (Merino y cols., 2006; Ando y cols., 2007; Real y cols., 2011a). Sin embargo, no todas las fluoroquinolonas son sustrato del transportador, tal y como hemos observado recientemente en nuestro grupo de investigación con la moxifloxacina (Egido y cols., en preparación), por lo que es necesario el estudio de cada fluoroquinolona de forma individual.

Ya que la implicación en la transferencia activa de compuestos a leche es una característica de ABCG2, el hecho de que tanto difloxacina (Marín y cols., 2010) como marbofloxacina (Shem-Tov y cols., 1997) y orbifloxacina (Marín y cols., 2007; Goudah y cols., 2009) presenten mayores niveles en leche que en plasma es un claro indicativo de que pueden ser sustratos del transportador.

han Nuestros resultados demostrado que marbofloxacina, difloxacina, sarafloxacina y orbifloxacina son sustratos de ABCG2 in vitro (Figuras 26-29). Este hallazgo no garantiza su interacción in vivo con el transportador ya que hay que tener en cuenta que *in vivo* pueden participar varios transportadores en la farmacocinética de las fluoroquinolonas (Schrinkx and Fink-Gremmels, 2007; Álvarez y cols., 2008) que pueden enmascarar el efecto del transportador objeto de estudio. Así, es posible que alguno de estos compuestos descritos como sustratos de Abcg2 in vitro no se comporten como tal *in vivo*. Por ejemplo, en nuestro laboratorio observamos que la esparfloxacina es sustrato de Abcg2 in vitro, sin embargo empleando ratones knock-out para el transportador no se observaron diferencias en la biodisponibilidad ni en la aparición en

leche de la fluoroquinolona en comparación con ratones *wild-type* (datos no publicados). Estudios futuros serán necesarios para conocer la interacción *in vivo* entre estas fluoroquinolonas y el transportador.

Nuestros resultados correspondientes al transporte vectorial de las diferentes fluoroquinolonas estudiadas indicaron que son transportadas eficientemente por Abcg2 murina, pero no por ABCG2 humana (Figuras 26-29). Así, los ratios de transporte B-A/A-B obtenidos para la difloxacina y la sarafloxacina en las células que expresan ABCG2 humana no fueron significativamente diferentes de los obtenidos en las células parentales, por lo tanto, a la concentración ensayada no se produce un transporte efectivo del fármaco mediado por ABCG2 humana (Tablas 4 y 6). Estas diferencias observadas en la afinidad por el sustrato entre Abcg2 murina y ABCG2 humana han sido descritas también con otras fluoroquinolonas por nuestro grupo de investigación. Así, Merino y cols. (2006) observaron que la ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina eran transportadas con menor efectividad por ABCG2 humana en comparación con el homólogo murino, mediante ensayos de transporte in vitro con células polarizadas. Real y cols. (2011a) también han descrito un transporte menor de danofloxacina en ABCG2 humana en comparación con el homólogo murino. Este comportamiento diferencial del transportador murino y humano también se ha observado con sustratos no fluoroquinolónicos por otros grupos de investigación. Así, se ha observado un transporte más eficiente de los antitumorales axatinib y sorafenib en líneas celulares con expresión estable de Abcg2 murina frente a ABCG2 humana (Lagas y cols., 2010; Poller y cols., 2011).

En cuanto a inhibidores se refiere, también pueden existir diferencias entre el transportador murino y humano. En los estudios de inhibición de ABCG2, es esencial comparar sistemáticamente las propiedades de los inhibidores modelos como fumitremorgina C en ambos homólogos, Abcg2 murino y ABCG2 humano, con el fin de diseñar, interpretar y extrapolar correctamente los resultados entre especies. Con este propósito, llevamos a cabo un estudio comparativo del efecto inhibitorio ejercido por la micotoxina fumitremorgina C sobre la variante de ratón y humana del transportador ABCG2. La interacción entre la fumitremorgina C y el transportador humano ha sido ampliamente estudiada. Así, la fumitremorgina C ha sido descrita como un potente y específico inhibidor de ABCG2, con un efecto muy leve sobre P-gp y MRP1 a

concentraciones altas (Allen y cols., 2002; Rabindran y cols., 2000). De hecho, se utiliza ampliamente como control positivo en los estudios de inhibición de ABCG2, ya que revierte la resistencia a fármacos mediada por ABCG2 y aumenta la citotoxicidad *in vitro* frente a varios compuestos (Bram y cols., 2009; Usuda y cols., 2010). Sin embargo, nunca se ha caracterizado de forma paralela y comparada la potencia inhibitoria de la fumitremorgina C sobre las variantes murina y humana del transportador.

En cuanto a la idoneidad de los modelos celulares utilizados en la presente memoria, debido a la selectividad de la fumitremorgina C, y a pesar de que las células MDCKII expresan algunos transportadores endógenos (Taub y cols., 2005), no cabría esperar importantes efectos de interferencia de otros transportadores en nuestros experimentos. En cualquier caso, para una interpretación más clara, también incluimos en nuestro ensayo células MEF3.8 (Allen y cols., 2000), que carecen de los transportadores P-gp y MRP1. Esto nos ha permitido observar la inhibición específica sobre Abcg2/ABCG2 en los subclones transducidos.

Nuestros resultados demuestran que existen marcadas diferencias en las propiedades inhibitorias de la fumitremorgina C sobre ABCG2 humana y Abcg2 murina utilizando diversos ensayos experimentales. Así, los estudios de acumulación nos permitieron confirmar que la fumitremorgina C es un inhibidor de ambos homólogos de ABCG2 (Figura 30, Tabla 7). Además, observamos una inhibición más potente en el caso del homólogo humano en comparación con el transportador murino para ambos sustratos probados (mitoxantrona y clorina e6), alcanzándose los niveles de significación estadística en todos los casos (Tabla 7). Los estudios de transporte transcelular posteriores confirmaron la mayor sensibilidad de ABCG2 humana frente a la fumitremorgina C (Figuras 34 y 35, Tablas 9 y 10). Esta micotoxina ha sido ampliamente utilizada en experimentos de transporte, con células Caco-2 (Li y cols., 2008a) y células MDCKII (Zhang y cols., 2005) para determinar si fármacos como el topotecan, belotecan y dipiridamol son sustratos de ABCG2 humana, ya que la diferencia entre el transporte apical-basolateral y el transporte basolateral-apical se eliminó por completo con la adición de fumitremorgina C a 5 µM. Sin embargo, nuestro estudio revela que cuando se emplean concentraciones de fumitremorgina C más bajas (en nuestro caso 1 µM, una concentración muy utilizada), se debe prestar atención al

interpretar los datos, especialmente en el caso de Abcg2 murina, en el que no conseguimos la inhibición completa a diferencia de ABCG2 humana (Figura 34, Tabla 9).

Finalmente, los experimentos de citotoxicidad realizados en MDCKII y MEF3.8 nos han permitido establecer la capacidad de la fumitremorgina C para revertir la resistencia a mitoxantrona y topotecan mediada por ambos homólogos del transportador (Figura 33). Otros estudios ya han mostrado la capacidad de la fumitremorgina C para revertir la resistencia a fármacos en células humanas que sobreexpresan ABCG2. Así, Rabindran y cols. (2000) mediante estudios de citotoxicidad con 3 días de incubación en células MCF utilizando, entre otros, mitoxantrona como sustrato, obtuvo una reducción en la resistencia de casi 30 veces empleando fumitremorgina C a una concentración de 5 μM. En nuestro caso, se observó una reducción de 10 veces empleando el mismo rango de concentraciones (valores de EC_{90}) (Tabla 8). La diferencia puede ser debida al tiempo de incubación con los fármacos, en nuestro caso 24 horas, o al tipo celular, entre otros factores. Ceckova y cols. (2008) observaron una reducción en la resistencia a la mitoxantrona de aproximadamente 10 veces usando fumitremorgina C a 5 µM en estudios de citotoxicidad con MDCKII que sobreexpresaban ABCG2. En este último caso los datos son muy similares a los nuestros. Además, nuestros resultados confirman que la fumitremorgina C causa una mayor inhibición de ABCG2 humana frente al transportador murino.

Una posible explicación para las diferencias descritas entre Abcg2 murino y ABCG2 humano tanto en la inhibición como en la eficiencia de transporte de compuestos sería la existencia de diferencias en la afinidad/selectividad por sustratos/inhibidores entre ambos homólogos, tal y como ha sido sugerido previamente (Merino y cols., 2006) o un menor nivel en la expresión de la proteína humana en la línea celular utilizada. De hecho, algunos grupos de investigación han manifestado dificultades para obtener líneas celulares transducidas con una expresión adecuada y estable de ABCG2 humana (Tang y cols., 2012). Estos autores explican que la variante humana podría expresarse menos en el conjunto de la célula o en la membrana o ser menos estable. Quizás la proteína humana es mejor exportando fuera de la célula algún nutriente esencial (por ejemplo folato o riboflavina) que la variante murina, dando lugar a problemas de crecimiento en los clones con una alta expresión. Sin embargo, el transporte mediado por Abcg2/ABCG2 de nitrofurantoína y mitoxantrona es muy similar entre ambos subclones (Figuras 34 y 35, Tablas 9 y 10) lo que podría sugerir que no hay marcadas diferencias en el nivel de expresión de Abcg2 y ABCG2 en MDCKII. Desafortunadamente, no hay anticuerpos actualmente disponibles que reconozcan ABCG2 humana y Abcg2 de ratón con la misma eficiencia.

Así, las diferencias funcionales entre Abcg2 murina y ABCG2 humana, incluyendo su especificidad/afinidad por los sustratos/inhibidores, es probable que sean atribuibles a la secuencia primaria de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos de Abcg2 de ratón y ABCG2 humana comparten un 81% de similitud y un 86% homología. Este transportador cuenta con un alto nivel de conservación. Sin embargo, la ubicación de los aminoácidos cargados en la secuencia de ratón provoca pequeños cambios en las posiciones asignadas a algunos de los dominios transmembrana en comparación con la disposición de ABCG2 humana (Allen y cols., 1999). Cambios en un aminoácido pueden modificar en gran medida la afinidad por los distintos sustratos, así como el patrón de inhibición de los transportadores ABC incluyendo ABCG2 (Cusatis y Sparreboom, 2008; Merino y cols., 2009). Se ha sugerido la existencia de múltiples sitios de unión en ABCG2 (Clark y cols., 2006) y diferentes afinidades por los inhibidores (Giri y cols., 2009). La presencia de aminoácidos cargados en los sitios de unión del transportador podrían ser responsables de las diferencias entre especies, como es el caso para otros transportadores ABC (Ito, 2008). Además, también se han descrito diferencias en el comportamiento de homólogos de ABCG2 en diferentes especies, tales como ratón, perro, mono y humano (Li y cols., 2008b) y en rumiantes, tal como se demuestra en la presente memoria. Las diferencias entre transportadores humanos y de ratón se han descrito también para otros transportadores ABC. Así, se han establecido diferencias en la resistencia a fármacos y los perfiles de citotoxicidad, la sensibilidad a moduladores y la especificidad de sustrato para P-gp humano y murino y el transportador MRP2 (Katoh y cols., 2006; Zimmermann y cols., 2008; Choi y cols., 2009).

6.2. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE ABCG2 OVINA Y SUS DIFERENCIAS FUNCIONALES CON AMBAS VARIANTES DE ABCG2 BOVINA

6.2.1. MODELOS CELULARES

Entre las funciones destacadas de ABCG2 están la participación en la biodisponibilidad de fármacos y el paso de compuestos hacia la leche. Estas dos características del transportador son de gran interés en terapéutica veterinaria, ya que una alta biodisponibilidad del fármaco puede asegurar la efectividad de un tratamiento y la aparición de residuos en leche implica riesgos para la salud tras el consumo humano. Como ya hemos comentado anteriormente, a pesar de ser un transportador altamente conservado (Wu y cols., 2008), cada vez son más los estudios que describen diferencias en funcionalidad y especificidad de ABCG2 en las distintas especies. Además, la presencia de polimorfismos da lugar a comportamientos distintos según la variante frente a sustratos e inhibidores. Todo ello, justifica la necesidad de realizar estudios comparativos de ABCG2 en animales productores de leche, considerando los polimorfismos descritos.

Los modelos celulares representan una herramienta muy útil a la hora de realizar estudios comparativos *in vitro* entre especies, así como para analizar las diferencias debidas a la presencia de SNPs en los transportadores ABC. En nuestro estudio, empleamos en primer lugar células SBFF1, fibroblastos fetales ovinos, para realizar ensayos de funcionalidad mediante expresión transitoria con los vectores generados en la clonación de ABCG2 ovina. Estas células tienen la ventaja de que nos permiten trabajar con una célula de rumiante. Además, realizamos una primera aproximación al estudio comparado de funcionalidad entre ABCG2 ovina y bovina, mediante un ensayo de acumulación de mitoxantrona. Para poder realizar estudios más exhaustivos, se decidió generar modelos celulares de expresión estable para los que empleamos células MEF3.8, HEK293 y MDCKII. Tanto las células MEF3.8 como las HEK293, ambos fibroblastos embrionarios, nos permitieron realizar ensayos de acumulación e inhibición de fármacos de forma paralela con ABCG2 bovina y ovina. Además, teniendo en cuenta que ya contábamos con la expresión estable de las dos variantes de ABCG2 bovina (Y581, S581) en células polarizadas MDCKII y que son un modelo celular ampliamente

utilizado para ensayos de transporte vectorial de fármacos (Hegedus y cols., 2009a), decidimos expresar de forma estable ABCG2 ovina en estas mismas células para poder completar los estudios comparativos entre especies.

Con objeto de facilitar la comprensión de los resultados, en la discusión se comentara en primer lugar la caracterización de los modelos celulares generados a nivel de su expresión y función y posteriormente, su interacción con los fármacos estudiados.

Durante el proceso de generación de los distintos modelos celulares en el caso de las variantes bovinas y la ovina observamos algunas diferencias en cuanto a la expresión del transportador y a la eficiencia de la transfección en función del tipo celular. Así, en el caso de las células HEK293 se observó una intensidad de fluorescencia para GFP muy inferior a la registrada para los otros modelos celulares, así como una menor diferencia en la acumulación de mitoxantrona entre células parentales y que sobreexpresan el transportador (Figura 67-69). Desconocemos la causa por la que parece que la eficiencia de la expresión del transportador es menor en estas células. Puede ser que la lipofección sea un método menos eficaz que la transducción para lograr una expresión estable del transportador (Kimchi-Sarfaty y col., 2004). Por otro lado, se ha observado que los niveles de colesterol, que pueden variar de un tipo celular a otro, podrían alterar la actividad de ABCG2 (Storch y cols., 2007). En el caso de la expresión estable de la variante ovina en células polarizadas MDCKII en las figuras 76 y 77 aparecen sus niveles de función y expresión así como su correcta localización en la membrana plasmática (Figura 78), estos resultados corroboran los anteriormente obtenidos en las variantes bovinas.

En cuanto a las diferencias polimórficas en vacuno, nuestros estudios han confirmado resultados previos de nuestro grupo de investigación en cuanto a la mayor actividad de la variante S581 bovina. Esto contrasta con el hecho de que, en general se ha observado que los polimorfismos en ABCG2 humana reducen la actividad y/o la expresión del transportador. Por ejemplo, el SNP Q141K implica menores niveles de expresión de la proteína en comparación con ABCG2 *wild-type*, tanto en células transfectadas como en tejidos humanos (Kondo y cols., 2004). En general, los pacientes con polimorfismos presentan una mayor exposición a los fármacos sustratos de ABCG2 como estatinas y antitumorales, en comparación con los pacientes con ABCG2 *wild-*

type (revisado por Mealey, 2011). Sin embargo, la disminución en la expresión del transportador debida a los SNPs, no implica necesariamente una reducción del transporte de fármacos. Así, Vethanayagam y cols. (2005) analizaron la expresión y la funcionalidad de tres SNPs descritos en la especie humana (I206L, N590Y y D620N), utilizando células HEK; los resultados obtenidos indicaron que I206L presentaba niveles de expresión más bajos, aunque mostraba una mayor actividad, mientras que N590Y y D620N se caracterizaron por niveles de expresión más elevados y menor actividad en comparación con la variante *wild-type*. En nuestro caso, no hemos detectado variaciones en los niveles de expresión de ABCG2 bovina en función del polimorfismo expresado en las células MEF3.8, tal y como se había descrito anteriormente para las células MDCKII (Real y cols., 2011b), lo que valida este modelo celular para la realización de estudios comparados.

Los SNPs no sinónimos pueden alterar la actividad intrínseca del transportador al modificar la afinidad por el sustrato (K_m), la capacidad de transporte (V_{max}) (Evans y Relling, 1999) o interferir con el plegamiento de la proteína, las modificaciones posttraduccionales y el nivel de expresión en la membrana plasmática, y por lo tanto, modificarían la farmacocinética y la respuesta generada frente a un determinado fármaco (revisado por Klaassen y Aleksunes., 2010). Entre las modificaciones posttraduccionales que pueden ocurrir se incluyen fosforilación, glicosilación y ubiquitinación, que pueden tener consecuencias en la funcionalidad y localización del transportador. Así, la glicosilación y la fosforilación pueden alterar la localización y funcionalidad, mientras que la ubiquitinación puede favorecer la degradación del transportador (revisado por Klaassen y Aleksunes., 2010). También se han descrito cambios en la localización del transportador como consecuencia de los SNPs, como sucede por ejemplo con el polimorfismo S441N descrito para ABCG2 humana (Kondo y cols., 2004), en el que la localización del transportador pasa a ser intracelular. En los modelos celulares (MDCKII y MEF3.8) generados en la presente memoria se comprobó que la expresión del transportador ovino y ambas variantes bovinas de ABCG2 se localizaba en la membrana plasmática mediante inmunocitoquímica (Figuras 53 y 78). El transportador contiene una señal que es reconocida por las células epiteliales dirigiéndolo hacia la zona apical. Este patrón de expresión de ABCG2 dirigida hacia la membrana apical también ha sido descrito en células Caco-2 (Xia y cols., 2005), así como en células LLC-PK (Jonker y cols., 2000; Maliepaard y cols., 2001). Este fenómeno es de gran utilidad, ya que nos permite obtener un sistema de expresión celular del transportador análogo al observado en tejidos como el intestino donde ABCG2 se expresa en la membrana apical de las células epiteliales (Jonker y cols., 2000).

Recientemente, Desuzinges-Mandon y cols. (2010) han descrito la importancia de la región ECL3 (zona de unión entre los dominios transmembrana 5 y 6 de ABCG2 humana localizada extracelularmente) en el transporte de sustratos de ABCG2 humana que contienen los grupos hemo y hemina. Teniendo en cuenta que el SNP S581 está localizado en dicha región, podría ser una de las causas que originan diferencias en la actividad entre las dos variantes de ABCG2 bovina. Sin embargo, aún no hay disponible una estructura tridimensional del transportador que clarificaría el papel de cada componente de ABCG2 en el reconocimiento de sustratos e inhibidores.

6.2.2. TRANSPORTE DE FLUOROQUINOLONAS

Considerando la importancia de ABCG2 en el transporte de fluoroquinolonas de uso veterinario, ya comentada, y que muchas de ellas son excretadas hacia la leche, el estudio de este proceso en rumiantes cobra especial interés. Los modelos celulares con células MDCKII, de los cuales el que expresa la proteína ovina se ha desarrollado en la presente memoria, nos han permitido identificar cuatro nuevos sustratos de ABCG2 bovina y ovina pertenecientes al grupo de las fluoroquinolonas y utilizados en medicina veterinaria: marbofloxacina, orbifloxacina, sarafloxacina y difloxacina. En el estudio comparativo en rumiantes también se empleó danofloxacina, descrita previamente por nuestro grupo como sustrato de ABCG2 bovina (Real y cols., 2011b). En general, los ensayos de transporte vectorial con células MDCKII han reflejado una mayor eficiencia en el transporte por parte de las células que sobreexpresan ABCG2 ovina (Figuras 80-84, Tablas 13-17) respecto a las dos variantes bovinas. En el caso de marbofloxacina y difloxacina el transporte por parte de la proteína ovina sólo fue significativamente superior frente a la variante bovina Y581. Además, en estos estudios se confirmó que la variante S581 muestra una mayor actividad que la Y581. Estos resultados son de gran relevancia ya que además de identificar cuatro nuevas fluoroquinolonas de uso veterinario como sustratos de ABCG2 de rumiantes, reflejan el transporte diferencial en función de la especie y de los polimorfismos. Las fluoroquinolonas más estudiadas en cuanto a su interacción con transportadores ABC son norfloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina y grepafloxacina ya que tienen aplicación en medicina humana. Sin embargo, cada vez son más los estudios in vitro e in vivo aplicados a medicina veterinaria que describen las interacciones de fluoroquinolonas con transportadores ABC en rumiantes, como por ejemplo el caso de la danofloxacina y la enrofloxacina (Schrickx y Fink-Gremmels, 2007; Pulido y cols., 2006). En esta línea, nuestro grupo de investigación ha obtenido unos resultados preliminares que reflejan un mayor transporte de danofloxacina hacia la leche en estudios in vivo realizados con vacas portadoras del polimorfismo S581 frente a los animales con genotipo Y581 (Otero y cols., en preparación), lo que valida por completo nuestros estudios in vitro y nos indica la potencial relevancia de la extrapolación in vivo de nuestros resultados. Diferencias en la excreción a leche de fluoroquinolonas según el genotipo en vacuno puede tener consecuencias tanto a nivel de aparición de residuos en leche como para el tratamiento de mamitis, para el que se necesita una adecuada concentración de antibiótico en glándula mamaria (Escudero y cols., 2007). Además, la actividad fluoroquinolónica es dependiente de la concentración plasmática y si esta se encuentra por debajo del nivel terapéutico, debido a la presencia de SNPs de ABCG2, podría estar asociada con una falta de actividad antibiótica y la rápida aparición de resistencias (Revisado por Martinez y cols, 2006). Por último, cabe el riesgo de que existan mayores concentraciones de fluoroquinolonas aumentando la incidencia de reacciones adversas no sólo en los adultos sino también en las crías.

6.2.3. TRANSPORTE DE RIBOFLAVINA

Además de las fluoroquinolonas, los ensayos de transporte con células polarizadas MDCKII nos han permitido identificar a una vitamina, la riboflavina, como sustrato de ABCG2 de rumiantes (Figura 85, Tabla 18). La riboflavina ha sido descrita previamente como sustrato del transportador murino y humano en ensayos *in vitro*. Además, ensayos *in vivo* en ratones demostraron que, por un lado, Abcg2 limitaba la disponibilidad de riboflavina en tejidos y plasma y, por otro lado, transportaba activamente dicha vitamina en la leche (van Herwaarden y cols., 2007). Sin embargo, no existían hasta el momento ensayos que confirmasen el transporte de esta vitamina mediado por ABCG2 de rumiantes. Nuestros resultados reflejaron un mayor transporte de riboflavina por

parte de ABCG2 ovina (Ratio B-A/A-B 0,921 ± 0,507) en comparación con cualquiera de las variantes de ABCG2 bovina, siendo mayor dicho transporte en la variante S581 frente a Y581 (ratios B-A/A-B de $0,223 \pm 0,016$ para S581 versus $0,120 \pm 0,024$ para Y581). El transporte de la riboflavina mediado por ABCG2 postula la participación del transportador en la transferencia de nutrientes a través de la leche de la madre hacia el feto. Además, las diferencias polimórficas que hemos demostrado in vitro podrían indicar la posibilidad de modificaciones en la composición vitamínica de la leche en función del genotipo. Sin embargo, este hecho no ha sido investigado aún y las posibles consecuencias biológicas de esta modificación no están claras, ya que las crías lactantes de ratones Abcg2^{-/-} no presentan un fenotipo alterado relacionado con la deficiencia de riboflavina (van Herwaarden y cols., 2006), al menos en el ambiente protector del laboratorio y con una alimentación rica en riboflavina. Podría ocurrir que, dependiendo del genotipo del animal o en condiciones más naturales, como por ejemplo en caso de una alimentación más variada, una reducción en la ingesta de alimento o una mayor necesidad de vitaminas debido al estrés o alguna enfermedad, el transporte de riboflavina hacia la leche mediado por ABCG2 fuera esencial para que las crías se encontraran en un estado nutricional y de salud óptimo. En cualquier caso, diferencias en la composición vitamínica de la leche en función de la especie o del genotipo constituyen un aspecto de gran interés para el consumo humano.

6.2.4. INHIBICIÓN DE ABCG2 EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR BOVINO Y OVINO

Siguiendo con aspectos relativos a la composición de la leche y la presencia de determinados compuestos susceptibles de ser excretados o interferir en la función del transportador, los flavonoides forman parte de la dieta tanto humana como animal, y el equol tiene cierta importancia en el ámbito veterinario debido a su actividad estrógenica y se han detectado niveles del mismo en leche (Urpi-Sarda y cols., 2008). Por ello, creímos interesante evaluar el efecto inhibitorio del isoflavonoide equol sobre la actividad de ABCG2 en rumiantes, para lo que utilizamos las células MEF3.8 transducidas. Los resultados obtenidos han reflejado que el equol es inhibidor tanto de ABCG2 bovina como ovina, aunque la potencia inhibitoria no es muy alta ya que los

niveles máximos de inhibición se situaron en torno al 50% (Figura 59). Los porcentajes de inhibición fueron ligeramente mayores para la variante S581 de ABCG2 bovina frente a la variante Y581. Por otro lado, la inhibición mediada por ABCG2 ovina fue significativamente mayor en la mayoría de los casos. Estos resultados ponen de manifiesto que seria importante profundizar en el papel de componentes de la dieta, como los flavonoides, en el transporte de fármacos mediado por transportadores ABC, así como las diferencias generadas por los polimorfismos o las diferencias interespecíficas. Además, respecto a la extrapolación de nuestros resultados a la situación in vivo, sabemos que la ingesta de alimentos con alto contenido en flavonoides proporcionan los niveles necesarios para inhibir ABCG2 a nivel intestinal, aumentando la biodisponibilidad de los sustratos del transportador (Morris y Zhang, 2006; Merino y cols., 2010). En el campo de la terapéutica veterinaria la utilización de flavonoides sería de gran utilidad ya que permitiría modificar la efectividad y biodisponibilidad de fármacos mediante modificaciones de la dieta. En esta línea, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la excreción del antibiótico nitrofurantoína a leche en ovejas puede ser modulada mediante dietas que presentan diferentes niveles de flavonoides al actuar estos como inhibidores de ABCG2 (Pérez y cols., 2009b). Por otra parte, nuestro hallazgo de un mayor efecto inhibitorio del equol sobre ABCG2 ovina, indica la potencial dificultad de la extrapolación de resultados experimentales entre especies, manifestándose la necesidad de estudios específicos en cada caso.

Los modelos celulares MEF3.8 generados en la presente memoria también nos han permitido el estudio de las diferencias interespecíficas y polimórficas en cuanto al efecto inhibidor sobre el transportador de rumiantes de las lactonas macrocíclicas. Los resultados obtenidos en este modelo celular nos han permitido identificar a la doramectina como un nuevo inhibidor del transportador ABCG2 bovino y ovino, así como, confirmar la inhibición ejercida por otro compuesto de la misma familia como es la ivermectina. Este segundo compuesto ya había sido descrito como inhibidor de Abcg2 murina y ABCG2 humana (Jani y cols., 2011). Además, nuestro grupo de investigación en un estudio preliminar con células SBFF1, había identificado la ivermectina como un inhibidor efectivo de ABCG2 bovina, siendo mayor dicha inhibición sobre la variante Y581 (Merino y cols., 2009). Esta diferencia entre ambas variantes en cuanto a la inhibición ejercida por la ivermectina ha sido confirmada en la

presente memoria (Figura 57). Además, este es el primer estudio en relación a la inhibición *in vitro* de este compuesto sobre el transportador ovino. Así, nuestros resultados corroboran estudios previos *in vivo* de nuestro grupo de investigación en los que se observó una inhibición del 40% de la secreción en leche de danofloxacina mediada por ABCG2 tras la coadministración de ivermectina en ensayos *in vivo* en ovejas (Real y cols., 2011a).

Los resultados obtenidos con la doramectina no han reflejado diferencias significativas en la inhibición del transporte de mitoxantrona entre las dos variantes del transportador bovino. Así, parece que las diferencias polimórficas en relación a la inhibición son dependientes de sustrato, como también lo son las diferencias interespecíficas, ya que con las lactonas macrocíclicas las diferencias entre el transportador ovino y bovino fueron variables dependiendo del compuesto y la concentración utilizada (Figuras 54 y 56) mientras que en el caso del equol el transportador ovino mostró una inhibición claramente superior en comparación con el bovino a la mayoría de las concentraciones estudiadas (Figura 58). El grupo de Lespine y cols (2007) ha analizado las diferencias que existen entre las distintas lactonas macrocíclicas al interaccionar con otros transportadores ABC. Estudiando tanto avermectinas como milbemicinas, llegaron a la conclusión de que la presencia o ausencia y la integridad de la fracción disacarídica presente en la estructura de los fármacos, era determinante de la afinidad y la capacidad de unión a los transportadores ABC. La fracción de azúcar influye en la hidrofobicidad de la molécula y condiciona la interacción de la membrana con los transportadores ABC. Su trabajo demostró una IC_{50} menor para la doramectina que para la ivermectina en la interacción con P-gp indicando una mayor inhibición de P-gp por parte de la doramectina, de manera similar a nuestros resultados con ABCG2. Estas diferencias podrían deberse a una mayor hidrofobicidad de la doramectina, cuyo coeficiente de partición octanol/agua es superior al de la ivermectina, lo que le permite una mayor interacción con los transportadores de membrana.

Por tanto, en general tanto la afinidad de ABCG2 por los sustratos como por los inhibidores podría variar en función de la especie estudiada, como hemos observado en nuestros resultados obtenidos. El transportador ABCG2 bovino y ovino comparten un alto porcentaje de homología (mayor del 95%) tanto a nivel proteico como nucleotídico

(Wu y cols., 2008); sin embargo, alguna de esas pequeñas diferencias podrían determinar la especificidad frente a los distintos sustratos e inhibidores, tal y como hemos visto en el caso del transportador humano y murino. Tampoco podemos descartar en el caso de los modelos generados en rumiantes, que estos presenten distintos niveles de expresión del transportador en función de la especie tal y como también se ha comentado para ratón y humana. Sin embargo, cabe mencionar, que al carecer de anticuerpos específicos para ABCG2 en función de la especie, no podemos afirmar con seguridad que las diferencias obtenidas mediante western-blot, como parece suceder en las células MDCKII transducidas con ABCG2 ovina y bovina (Figura 77), sean debidas a diferentes niveles de expresión del transportador, ya que podría tratarse de diferencias observadas en ensayos *in vitro*, donde se emplean modelos celulares equivalentes para ambas especies, habría que tener en cuenta que en la situación *in vivo* también influirían las características fisiológicas propias de cada especie, pudiendo observarse mayores o menores diferencias en la eficiencia del transportador.

Actualmente, no se han descrito unas características estructurales que estén definitivamente asociadas con el reconocimiento y transporte de compuestos mediado por ABCG2. Por ello, los modelos celulares descritos en la presente memoria representan un conjunto de herramientas muy útiles para el análisis funcional del transportador ABCG2 y para la identificación de sustratos e inhibidores del mismo. Además, nos permiten realizar estudios comparativos para analizar los efectos desencadenados por la aparición de SNPs y, también, las diferencias entre las distintas especies. A este respecto, y a modo de ejemplo sobre la utilidad de los modelos generados, en la tabla 19 se muestran de forma recopilatoria los ratios B-A/A-B obtenidos en los ensayos de transporte transepitelial de fluoroquinolonas testadas en la presente memoria utilizando células MDCKII transducidas con el transportador murino, humano, ovino y ambas variantes bovinas. Así, observando nuestros resultados se puede establecer que, considerando globalmente el grupo de fármacos, el transportador murino es el más eficiente, y que existe un paralelismo total entre los resultados obtenidos de ABCG2 humana y de variante bovina bABCG2 Y581 en el transporte de fluoroquinolonas. Comparando los resultados entre las dos variantes bovinas el transporte es mayor siempre en la variante bABCG2 S581, excepto para sarafloxacina en el que no se aprecian diferencias. Este resultado obtenido con los modelos celulares y corroborado recientemente para danofloxacina por nuestro grupo de investigación en experimentos de excreción en leche en vacas genotipadas que presentan el polimorfismo, recalca la importancia de los modelos generados. Por último, la presencia del grupo N-ciclopropil en el anillo heterociclo en orbifloxacina y danofloxacina cobra especial interés en el caso de variante ovina ya que los mayores índices de transporte (Ratio B-A/A-B) obtenidos en la presente memoria los presentan estas fluoroquinolonas con ratios de $6,66 \pm 2,37$ (Tabla 19) y $12,63 \pm 3,44$ (Tabla 13) respectivamente.

		Ratio B-A/A-B		
Subclones	Marbofloxacina	Difloxacina	Orbifloxacina	Sarafloxacina
Abcg2	$3,\!90 \pm 0,\!08$	$3,\!73\pm0,\!52$	$4{,}04\pm0{,}94$	$4{,}68 \pm 0{,}22$
ABCG2	$1,\!26\pm0,\!07$	$1,\!33\pm0,\!08$	$1,\!44 \pm 0,\!11$	$1,\!24\pm0,\!22$
bABCG2 S581	$3{,}22\pm0{,}65$	$3,\!30\pm0,\!49$	$2,\!18\pm0,\!11$	$1,\!90\pm0,\!39$
bABCG2 Y581	$1,\!44 \pm 0,\!24$	$1{,}60\pm0{,}08$	$1,71 \pm 0,31$	$1,\!83\pm0,\!53$
oABCG2	$2,\!29\pm0,\!29$	$2,\!98\pm0,\!16$	$6,66 \pm 2,37$	$2,52 \pm 0,16$

Tabla 19. Ratios B-A/A-B de marbofloxacina, difloxacina, orbifloxacina y sarafloxacina (10 μ M), determinados a partir de los coeficientes de permeabilidad obtenidos a ambos lados de la monocapa de células que sobreexpresan Abcg2 murina (Abcg2), ABCG2 humana (ABCG2), ABCG2 bovina (bABCG2) y ABCG2 ovina (oABCG2). Los resultados son la media y las desviaciones de tres réplicas (n=3).

7. CONCLUSIONES

Primera.- Las fluoroquinolonas marbofloxacina y orbifloxacina son transportadas eficientemente por Abcg2 murina y, en menor medida, por ABCG2 humana, en modelos de células MDCKII que sobreexpresan el transportador. En este mismo modelo celular, la difloxacina y la sarafloxacina son sustrato de Abcg2 murina y, sin embargo, no lo son de ABCG2 humana, a la concentración ensayada.

Segunda.- La fumitremorgina C inhibe la acumulación de mitoxantrona y de clorina e6 mediada por ABCG2, en modelos de células MEF3.8 y MDCKII que sobreexpresan el transportador, siendo dicha inhibición mayor en ABCG2 humana frente a Abcg2 murina. Por otra parte, también se puede señalar que los resultados de inhibición por fumitremorgina C de los dos sustratos, obtenidos con las células MEF3.8 son más homogéneos, considerando que no existe la influencia de Mdr1 ni de Mrp1.

Tercera.- Los estudios de citotoxicidad con fumitremorgina C, realizados en los modelos celulares anteriores, reflejaron una mayor capacidad de FTC para revertir la toxicidad de la mitoxantrona y el topotecan en el caso de ABCG2 humana con respecto a Abcg2 murina. Los valores de EC_{90} oscilaron entre 11 y 20 μ M en células transducidas con Abcg2 de ratón y entre 5 y 12 μ M en el caso de ABCG2 humana.

Cuarta.- Los estudios de inhibición realizados con células MDCKII que sobreexpresan el transportador mostraron que la fumitremorgina C a 1 μ M inhibe por completo el transporte transepitelial de nitrofurantoína y de mitoxantrona mediado por ABCG2 humana y, en menor medida, por Abcg2 murina.

Quinta.- La generación de modelos celulares con células MDCKII polarizadas que sobreexpresan el transportador ABCG2 de rumiantes nos ha permitido identificar a la riboflavina como un sustrato del transportador. El resultado obtenido muestra que el transporte secretor de riboflavina mediado por el transportador es mayor para el homólogo ovino frente a las variantes bovinas.

Sexta.- Los ensayos de transporte vectorial han permitido identificar también cuatro nuevas fluoroquinolonas de uso veterinario como sustratos de

ABCG2 de rumiantes: marbofloxacina, difloxacina, orbifloxacina y sarafloxacina, además existe un transporte diferencial en función de la especie y de los polimorfismos confirmándose la mayor actividad de la variante S581 bovina. Por otra parte, nuestro hallazgo de un mayor efecto inhibitorio del equol sobre ABCG2 ovina, indica la dificultad de la extrapolación de resultados experimentales entre especies, manifestándose la necesidad de estudios específicos en cada caso.

Séptima.- Las diferencias polimórficas en relación a la inhibición son dependientes de sustrato, como se ha demostrado para las lactonas macrocíclicas, pero también lo son las diferencias interespecíficas, ya que la funcionalidad del transportador ovino y bovino fue variable dependiendo de la lactona macrocíclica y de la concentración utilizada.

Octava.- La presencia del grupo N-ciclopropil en el anillo heterociclo en orbifloxacina y danofloxacina tiene especial interés en el caso de variante ovina ya que los mayores índices de transporte obtenidos en la presente memoria los presentan estas fluoroquinolonas con ratios para el transporte vectorial apical de 6,66 \pm 2,37 y 12,63 \pm 3,44, respectivamente.

8. SUMMARY

8.1. INTRODUCTION

ABC transporters (ATP-binding cassette) are present in most organisms and are responsible for multidrug resistance against antitumor compounds (Noguchi et al., 2009). On the other hand, they exert a protective function by limiting the transport of various compounds across the barriers between the systemic circulation and various organs (Sarkadi et al., 2006).

Considering the therapeutic context, ABC transporters directly affect drug bioavailability (including excretion into milk), tissue distribution and efficacy of drug action. Moreover, the organism physiology can be affected when the substrates are vitamins or endogenous compounds. There is a diverse group of factors that can affect transport function, not only restricted to pharmacological agents that act as modulators, but also factors in the diet that can affect the expression and function of ABCG2.

The interest of this research is focused on the influence of variations in gender, species and individuals, mostly associated with the existence of polymorphisms. Changes in a single amino acid as well as differences between species homologues, may affect both the activity and the specificity of the transporter. Thus, the aim of the present report is to deepen in the interspecies and polymorphic differences of ABCG2 transporter using cell models generated in the course of this Doctoral Thesis. Functional comparison between murine and human ABCG2 as initial models for the study of interactions with the transporter has allowed the identification of several new fluoroquinolones as substrates as well as the analysis of the differences in the inhibitory potency of the fumitremorgin C inhibitor. The comparison study between ruminant ABCG2 and its variants has required the cloning of the ovine ABCG2 and the generation and validation of different cell models, allowing us to perform a functional comparative study and to identify different substrates and inhibitors.

8.1.1. ABC TRANSPORTERS

The term ABC transporter was first introduced by Chris Higgins (1992) and refers to the main characteristic of the ABC superfamily of transporters: the presence of the ATP binding site. The identification of this large family of proteins in all living organisms analyzed to date, from microorganisms to humans as well as the fact of having a highly conserved structure and function suggests that these transporters have an important role in cell function. Thus, many of these transporters have a protective role, since they limit the transport of drugs and toxic compounds across the barriers between the systemic circulation and various organs such as brain, gastrointestinal tract and placenta. They also have many other physiological roles such as transport of lipids, bile salts, cholesterol, hormones, steroids and metabolites (reviewed by Fukuda et al., 2012). This transport is ATP-dependent and occurs against a concentration gradient independently of both an electrochemical potential and a transmembrane proton gradient.

All ABC transporters share a basic structure that may be present in a single protein of one polypeptide chain (*full-transporters*), or in two separate proteins (*half-transporters*). Thus they comprise one or two transmembrane domains (*Transmembrane domain*, TMDs) and one or two ATP-binding domains (*Nucleotide Binding Domain*, NBDs) (**Figure 1, Page 8**). TMD regions form the transport channel and consist of folded proteins in alpha helix spanning several times the plasma membrane, showing a high structural variability depending on the type of ABC transporter. In contrast, NBD regions, responsible for contributing to the binding and hydrolysis of ATP, are highly conserved throughout the family of ABC proteins and present the characteristic *Walker A* and *B motifs* and the *signature motif* (**Figure 1B, Page 8**) (reviewed by Moussatova et al., 2008).

The first member of this superfamily was identified in 1976 by Ling et al. and was described as a 170kDa membrane glycoprotein overexpressed in colchicine resistant cells and was called P-glycoprotein (**P-gp**). It is the most extensively studied transporter and many substrates have been described including chemotherapeutic agents such as anthracyclines, vinca alkaloids and taxanes, tyrosine kinase inhibitors such as imatinib, nilotinib and dasatinib, HIV protease inhibitors and inhibitors of HMG-CoA. This transporter plays an important role in tissue protection against toxic compounds and metabolites (Glavinas et al., 2004). Several years after the initial characterization of P-gp transporter, a new member of this superfamily was identified in the labs of Cole and Deely (1991) that was named ABCC1 or **MRP1** (*Multidrug Resistence Protein 1*). MRPs can be defined as a family of several proteins having a similar structure with two

or three transmembrane domains (Figure 2, Page 10) which play a major role in the cell bioavailability of drugs and xenobiotics and have a protective role against cytotoxic compounds (Leslie et al., 2005; Borst et al., 2006; Aye et al., 2007). Regarding the *half-transporter* ABCG2 (Figure 2, Page 10), it is important to mention that it participates in defense against the accumulation of toxic compounds and metabolites in the body and it is involved in the multidrug resistance phenomenon (reviewed by Polgar et al., 2008). Its characteristics will be discussed more in detail during the following sections.

8.1.2. BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN (BCRP/ABCG2)

The human ABCG2 transporter consists of 655 amino acids and has 6 transmembrane helices (residues 397 to 655) and an ATP binding site (residues 1 to 396). As mentioned previously, ABCG2 is a *half-transporter* and requires homodimerization to be functional (Nakanishi et al., 2003).

Most authors agree on the protective role of ABCG2 against toxic compounds (reviewed by Robey et al., 2009) because ABCG2 is expressed primarily both in the apical membrane of secretory cells (such as in the reticular zone of the gland adrenal cells, Sertoli/Leydig cells or syncytiotrophoblasts in the placenta) and cells from key organs in the bioavailability of drugs such as the intestine and liver. Other tissues that express the transporter are hematopoietic tissue, blood-brain barrier, testis, and mammary gland (**Figure 5, Page 17**). Regarding all tissues where we can find ABCG2, the highest expression is found in the placenta (Doyle et al., 2003). In addition, it is also highly expressed in SP cells *side population* (Zhou et al., 2002). Furthermore, ABCG2 is overexpressed in tumors like leukemia and it is responsible for the low response to chemotherapeutic agents. In addition, ABCG2 has been postulated as a compensatory mechanism against the increase of harmful products in oxidative stress (Huls et al., 2009).

ABCG2 transports a wide range of compounds, overlapping in some cases with Pgp and MRP1 **substrates**. Essentially, they are hydrophobic molecules positively or negatively charged. Noteworthy, most of the ABCG2 overexpressing cells are resistant to chemotherapeutic agents such as mitoxantrone, topotecan, irinotecan,

indolcarbazoles, antifolates and tyrosine kinases inhibitors such as imatinib, gefitinib and erlotinib (Polgar et al., 2008). As discussed throughout this review, other transporter substrates are antibiotics (nitrofurantoin, fluoroquinolones), vitamin B2 and biotin, uric acid and bile acids. The structure of the compounds is crucial in order to be transported or not by ABCG2. It has been suggested that the presence of an amino group bound to a heterocyclic ring and the heterocyclic ring fusion are decisive for the interaction of compounds with the transporter (Giacomini et al., 2010).

Inhibition of ABCG2 is an interesting strategy for the pharmacological treatment of cancer, since in tumors there is a high expression of the transporter and its inhibition would allow the intracellular accumulation of chemotherapeutic agents. It is also an interesting strategy to modulate the bioavailability, tissue distribution and hence the effectiveness of their substrates, including antitumorals. Some of these inhibitors are natural product like curcumin (Shukla et al., 2009), the toxin isolated from *Aspergillus fumigatus* fumitremorgina C and its analog Ko143 (Rabindran et al., 2000; Allen et al., 2002), steroids compounds such as corticosterone and digoxin, antiviral drugs such as ritonavir and saquinavir, immunosuppressants such as tacrolimus and sirolimus, tyrosine kinases inhibitors such as imatinib and nilotinib, or flavonoids such as naringenin, daidzein and genistein (reviewed by Polgar et al., 2008).

In terms of **human** ABCG2, around 80 natural **variations** in the sequence have been described (reviewed by Meyer zu Schwabedissen and Kroemer, 2011), being 26 non-synonymous polymorphisms, 5 polymorphisms synonyms (c.114T> C, c.369C > T, c.474C> T, c.1098G> A and c.1425A> G), 3 nonsense mutations (Q126X, E334X and R575X) and 1 reading frame mutation (c.1515delC). Among the various polymorphisms described (**Figure 9, Page 28**), the best known substitution in cell lines is from arginine to threonine or glycine at position 482 that changes the substrate specificity of the transporter (Allen et al., 2003). Frequently, SNPs identified in the human population are located in exon 2 (G34A resulting V12M) and in exon 5 (C421A resulting Q141K). Several studies have shown that the SNP Q141K implies lower levels of protein expression compared with *wild-type* ABCG2 in both transfected cells and human tissues (Kondo et al., 2004).
Regarding to ABCG2 **polymorphisms** in **ruminants**, Cohen-Zinder et al. (2005) described the non-synonymous polymorphism Y581S, which was located in exon 14 of the gene. These authors associated the SNP with higher fat and protein percentages and lower milk yield in Holstein cattle. As for the effect of the bovine SNP Y581S on drug transport, initial studies of our research group showed significant differences in mitoxantrone accumulation between the two variants after their cloning and transient expression (Merino et al., 2009). Subsequently, generation of MDCKII cells with stable expression of both variants allowed us to show that the bovine variant S581 shows a higher *in vitro* transport of certain fluoroquinolones (Real et al., 2011b).

In terms of interspecies differences, ABCG2 gene is highly conserved (Table 1, **Page 31)** and has been found in all vertebrates sequenced to date, including birds, reptiles and fish. Phylogenetic analyzes reveal that ABCG2 from primates are grouped within the same cluster (Figure 11, Page 32). Although ABCG2 is highly conserved across species tested to date, numerous variations in transporter expression and function can be found. The mouse model has been widely used in drug bioavailability assays and specifically in preclinical studies before extrapolation to other species (Allen and Schinkel, 2002). When extrapolating to humans the results obtained in this animal model we should take in mind that human ABCG2 and murine Abcg2 share only 81% of its amino acids (Allen et al., 1999). Furthermore, interspecies differences have been shown for the expression of ABCG2. As described in previous sections of this report, in humans, ABCG2 is expressed predominantly in the placenta and to a lesser extent in brain, prostate, small intestine, testis, ovaries, colon, liver and kidney. However, murine Abcg2 is predominantly expressed in kidney and moderately in liver, colon, heart, spleen and placenta (Jonker et al., 2000). This implies that the results obtained from mouse urinary excretion would be overestimated compared to what would occur in humans; similarly, feto-maternal transfer would be underestimated.

Following with rodent models, the <u>rat</u> is also used in characterization trials of ABC transporters. Tanaka et al. (2005) have described the tissue distribution of ABCG2 transporter in rat (**Figure 13, Page 34**). Moreover, Vander Borght et al. (2006) have observed significantly lower levels of ABCG2 in rat livers compared with human samples, which could imply functional differences related to the excretion of endogenous and exogenous toxic compounds. However, ABCG2 expression in rat and

205

mouse kidney is relatively high compared with humans, suggesting an important role of the transporter in the renal excretion of drugs in rodents. In contrast to humans, with regard to differences in activity, Nozaki, et al. (2007) have observed differences in inhibitory potency of anti-inflammatory drugs on methotrexate transport comparing fragments of human and rat kidney.

While the expression of ABC transporters have been widely studied in rodents and humans, studies on poultry ABCG2 are still scarce. It has been described the transport of rhodamine 123 mediated by P-gp and ABCG2 using <u>chicken</u> splecnocytes, which contrasts with what happens in human where the mentioned compound is not transported by *wild-type* ABCG2 (Haritova et al., 2006). Subsequently, the expression of ABCG2 in different <u>turkey</u> tissues was investigated. The highest levels of ABCG2 expression were found in the intestine with no differences between small and large intestines, as occurs in humans and rodents. Similar levels of expression were found in the liver (Haritova et al., 2008).

In <u>cats</u> ABCG2 has a 90, 83 and 94% homology in comparison with human, murine and canine ABCG2 sequences respectively. Four amino acid changes have been identified in the feline ABCG2 (E159M, S279L, T644I and H283Q) that make this transporter less efficient (Ramirez et al., 2011). Phototoxicity studies with HEK293 cells expressing human and feline ABCG2 revealed that the feline transport provides minimal protection against enrofloxacin compared to human ABCG2. It should be noted that in cats several adverse reactions and increased susceptibility to drugs including fluoroquinolones, ABCG2 substrates, have been described (Ford et al., 2007; Albarellos et al., 2009).

Assays for ABCG2 characterization in small ruminants began with the cDNA cloning of <u>goat</u> ABCG2 from mammary gland tissue samples (Wu et al., 2008) and <u>ovine</u> ABCG2 from liver (Duncan et al., 2007). As expected, the highest homology of goat ABCG2 in both the nucleotide sequence and in the protein, has been observed comparing with other ruminants (99% with sheep and 96-97% with cow). As for the <u>cow</u>, our research group has shown that bovine ABCG2 undergoes less inhibition by flavonoids than human but more than the murine transporter (Merino et al., 2009).

However, to date no systematic comparison of the transporter between ruminant species has been performed, which will be subject of the present report.

8.1.3. IN VITRO ASSAYS TO STUDY ABC TRANSPORTERS

The fact that ABCG2, like other ABC transporters, is involved in the phenomenon of multidrug resistance and protection against xenobiotics, has generated increasing interest in the pharmaceutical industry, since the study of interactions between drugs and transporters allow us to predict the distribution of active compounds at cellular and systemic level. Moreover, considering that the transport functional modifications are of great importance in the final phase of drug development, it is needed to perform large scale trials to analyze drug-transporter interactions. However, *in vivo* tests, usually performed in mice, are relatively expensive and are significantly limited, as there are functional differences between murine and human ABC transporters. For all the above, *in vitro* tests conducted both in intact cells and membranes, constitutes a fast and efficient method that allows large-scale trials, reducing costs and massive slaughter of animals (reviewed by Hegedus et al., 2009b).

Among the cells used for ABCG2 expression, we can highlight **PA317** cells (Miwa et al., 2003), **Sf9** (Pozza et al., 2009), **LLC-PK1** (Kondo et al., 2004), **Caco-2** (Xia et al., 2005), **MEF3.8** (Jonker et al., 2000), **HEK293** (Polgar et al., 2004) or **MDCKII** (Pavek et al., 2005). These cells transduced with ABCG2 allow us to perform a variety of *in vitro* assays for the transporter characterization, as well as for the study of the interactions produced with different drugs.

One of the widely performed studies are **cytotoxicity assays** that allow us to evaluate the response of a cell population against various compounds (Zheng et al., 2009, Wu et al., 2005). They are also very useful to determine if an ABC transporter confers resistance to a chemotherapeutic compound by comparative testing with parental cells and cells transfected with the transporter of interest (Calcagno et al., 2007). Given that biological barriers present in the different organs have at least one cell layer with a key role in compound exchange processes, the *in vitro* **transport assays** using cell monolayers constitute a pharmacological barrier model useful for determining the bidirectional transport of compounds (Merino et al., 2005); Pavek et al., 2005, Xia

et al., 2005). Following with the *in vitro* assays using intact cells, we can highlight the **flow cytometric** assays that allow us to determine the accumulation and transport of fluorescent compounds (ABCG2 substrates such as mitoxantrone, pheophorbide a, topotecan or bodipy-prazosin) and to identify ABC transporters substrates and inhibitors in a fast manner and on a large scale (Calcagno et al., 2007).

On the other hand, another possibility to analyze ABC transporters in a large-scale and economical way is the use of isolated membranes from cells overexpressing the transporter of interest (Pavek et al., 2005; Ozvegy et al., 2001, and Volk cols., 2000). For this purpose, we should remark the extensive use of Sf9 insect cells infected with baculovirus due to their ability to express a high level of the transporter of interest. However, such a transporter is not always functional, possibly due to low levels of cholesterol present in the membranes of the insect cell or a defective protein glycosylation (reviewed by Hegedus et al., 2009b). Given that ABC transporters use the energy from the ATP to transport their substrates through the cell membrane, **ATPase** activity assays are important tools for the study of drug transport mediated by transporters in vesicles. This technique allows us to identify the transport of substrates by colorimetric detection of inorganic phosphate released during ATP hydrolysis (Valdameri et al., 2012). Another possibility to in vitro characterize the interactions between different compounds and ABC transporters are the **ATP-dependent transport** assays using membranes which allow us to detect an increased accumulation of the transported substrate in membranes expressing the transporter (Ji and Morris, 2005). Finally, **photoaffinity assays** allow the direct detection of a protein by a covalent binding between a ligand and its specific receptor. Thus, a radiolabeled substrate of an ABC transporter (yodoarilazidoprazosin (IAAP), dihydropyridines, taxanes or propaphenones) is covalently bonded to the transporter by exposure to ultraviolet light. This binding can be altered or inhibited in the presence of another compound which is substrate of the transporter (Peer et al., 2005).

With all the above, the *in vitro* assays are useful tools for the characterization of interactions between different compounds and ABC transporters. They can be performed with a relatively low cost and in a large scale allowing us to analyze a large number of compounds, prior to their *in vivo* testing.

8.1.4. FUMITREMORGIN C: ABCG2 SPECIFIC INHIBITOR

Fumitremorgin C is a mycotoxin isolated from *Aspergillus fumigatus* (Figure 14, Page 41). This compound is a potent and specific inhibitor of ABCG2 transporter (Rabindran et al., 2000, Allen et al., 2002) and it is used as a model inhibitor *in vitro*. Its use *in vivo* has been limited because, like other members of the family of alkaloids, is neurotoxic and causes tremors and convulsions in mice and other animals (Cole and Cox, 1981; Nishiyama and Kuga, 1989). Therefore, less toxic synthetic analogs have been generated with similar inhibitory properties, such as Ko132 and Ko143 (Allen et al., 2002). However, Garimella et al. (2005) have determined the plasma pharmacokinetics and tissue distribution of fumitremorgin C at a dose of 25 mg/kg in mice, without toxic effects.

Fumitremorgin C has been used in *in vitro* studies which have allowed comparison between human ABCG2 variants (with threonine or glycine at position 482) and wild-type (with arginine at position 482) by inhibiting the transport of a specific substrate, such as pheophorbide A. Other studies, use fumitremorgina C to reverse the resistance of tumor cells overexpressing the transporter (Rabindran et al., 2000), as positive control for the transporter inhibition (Gupta et al., 2007; Hauswald et al., 2009; Solazzo et al., 2009; Paturi et al., 2010), as well as to identify the SP phenotype in stem cells (Mathew et al., 2009). Almost all inhibition studies using fumitremorgina C have been performed with human ABCG2, but there are few trials that use this compound as a murine ABCG2 inhibitor (Allen et al., 2002). The possible existence of interspecific variation of the inhibitory properties of fumitremorgina C could have a major role in *in* vitro models and drug interactions. This knowledge would be useful for the design and interpretation of experimental results obtained for murine ABCG2 and its subsequent extrapolation to the human situation. Therefore, one objective of the present report will be to explore the potential differences in the activity of this inhibitor on ABCG2 in both species.

8.1.5. FLAVONOIDS: EQUOL

Isoflavones are a type of polyphenols present mainly in soybean, which have been described as potential treatments for many diseases including cardiovascular diseases, osteoporosis, age-related diseases and hormone-dependent tumors (Setchell et al., 2002). Equol (7-hydroxy-3-(49-hydroxyphenyl)-chromanol) (**Figure 15, Page 43**) is produced in the human gut by bacterial degradation of the isoflavone daidzein present in food with high soy content (Minamida et al., 2008). Some reports also indicate the presence of equol in white cabbage (Hounsome et al., 2009).

In the past 15 years, flavonoids have been widely studied as regulatory compounds of ABC transporters. Since 1993 when the isoflavone genistein was described as an inhibitor of MRP1-mediated transport by Versantvoort et al., numerous flavonoids have been identified as inhibitors of this transporter (apigenin, kaempferol, naringenin, quercetin and others) (Wu et al., 2005). Several flavonoids have also been described as inhibitors of transport mediated by P-gp (acacetina, galangin, myricetin, morin, kaempferol and biochanin A) (reviewed by Wesolowska et al., 2010) and ABCG2 (genistein, naringenin, acacetina or kaempferol) (Katayama et al., 2007). Studies by our research group have reflected interactions of various flavonoids such as genistein and daidzein with the ABCG2 transporter both *in vitro* and *in vivo* (Pulido et al., 2006, Perez et al., 2009b; Merino et al., 2010). The *in vitro* interaction of the flavonoid equol with the ABCG2 transporter in ruminants is part of the objectives of the present study.

8.1.6. FLUOROQUINOLONES: DIFLOXACIN, MARBOFLOXACIN, ORBIFLOXACIN, SARAFLOXACIN AND DANOFLOXACIN

Fluoroquinolones belong to the quinolone antibiotics group with potent antibacterial activity, widely used in human and veterinary medicine. The fluoroquinolones studied herein are difloxacin, marbofloxacin, orbifloxacin, sarafloxacin, and danofloxacin (**Figure 16, Page 46**), selected because of its widespread use. Due to its pharmacological characteristics, fluoroquinolones are used in the treatment of a wide variety of bacterial diseases in domestic animals, especially cattle

and poultry, but also in other ruminants such as sheep, dogs and cats. Some fluoroquinolones are also used in human medicine; thus, sparfloxacin is used to treat gonorrhea and ciprofloxacin in urinary tract infections (Hooper, 2000). Fluoroquinolones act causing damage to bacterial DNA supercoiling causing defective genetic material (Gellert et al., 1977).

Some fluoroquinolones such as ciprofloxacin (Sörgel et al., 1989) and norfloxacin (Lamp et al., 1992) show low bioavailability suggesting the involvement of ABC transporters in their transport (Griffiths et al., 1994). In fact, members of the family of ABC transporters (P-gp, MRP and ABCG2) significantly affect the pharmacokinetic disposition of quinolones. It has also been suggested the existence of competence between them for the binding site of the transporters (Alvarez et al., 2008). Studies with polarized cells have reflected that ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, grepafloxacin and ulifloxacin are transported by murine Abcg2 and human ABCG2 (Pulido et al., 2006, Merino et al., 2006, Ando et al., 2007, Real et al., 2011a). Both enrofloxacin and danofloxacin are differentially transported by both variants of bovine ABCG2 (Real et al., 2011b). Furthermore, it has been observed that murine Abcg2 participates in the biliary excretion of ciprofloxacin, grepafloxacin, ofloxacin and in the urinary secretion of ciprofloxacin and grepafloxacin (Ando et al., 2007). In addition, the role of Abcg2 in secretion into milk of ciprofloxacin and danofloxacin was confirmed by our research group in Abcg2^{-/-} mice (Merino et al., 2006, Real et al., 2011a). In the case of difloxacin (Marín et al., 2010), marbofloxacin (Shem-Tov et al., 1997) and orbifloxacin (Marín et al., 2007; Goudah et al., 2009) higher levels in milk comparing to plasma have been detected which could indicate that they are transported by ABCG2 into milk. The *in vitro* interaction of these compounds with the transporter is part of the objectives of the present report.

8.1.7. MACROCICLIC LACTONES: IVERMECTIN AND DORAMECTIN

Macrocyclic lactones are antiparasitic hydrophobic molecules with a common structure: macrocyclic lactone ring of 16 elements. Macrocyclic lactones that we have included in our study are ivermectin and doramectin (Figure 17, Page 51). Macrocyclic

lactones are the most commercialized anthelmintic, since they are widely used in veterinary medicine for the treatment of infections with gastrointestinal nematodes and ectoparasites, in agriculture to control insect pests and in human medicine for the treatment of filarial worms and infections of nematodes (Omura and Crump, 2004).

ABC transporters have great importance in the absorption, distribution, metabolism and elimination processes of macrocyclic lactones in both the parasite and the host. Thus, in 1998 it was first demonstrated that the nematode *Haemonchus contortus* resistant to ivermectin had higher expression levels of P-gp compared to an unselected strain (Xu et al., 1998). Treatment with ivermectin acts on several ABC transporters of the nematode *Onchocerca volvulus* (Prichard and Roulet, 2007). Regarding the host, P-gp was the first transporter to be associated with the transport of macrocyclic lactones in mice (Schinkel et al., 1994; Lankas et al., 1997) and in Collie dogs (Mealey et al., 2001, Roulet et al., 2003). Collie dogs are extremely sensitive to ivermectin-induced neurotoxicity attributed to a mutation in the MDR1 resistance gene causing a functional defect in P-gp (Trailovic and Nedeljkovic, 2011). In addition, Jani et al. (2011) observed that ivermectin shows a high affinity interaction with human ABCG2 with IC₅₀ values in the range of 1-1.5 μ M. Our research group has demonstrated an interaction of ivermectin with bovine ABCG2 in a transient expression model (Merino et al., 2009).

An analysis on the interaction of bovine and ovine ABCG2 transporters with the macrocyclic lactones ivermectin and doramectin is part of the objectives of the present report.

8.1.8. MACROLIDE ANTIBIOTICS: TILMICOSIN

Macrolide antibiotics have been in use since Brockman and Henckel (1950) isolated picromycin from a *Streptomyces felleus* strain and have proven to be one of antibiotics better tolerated with a low toxicity level. They are characterized by a macrocyclic lactone ring containing 14, 15 or 16 atoms, bound through glycosidic bridges to different sugars. The macrolide antibiotic that we have included in our study due of its wide use in veterinary is tilmicosin (**Figure 18, Page 55**).

The interaction between macrolide antibiotics and ABC transporters has been poorly studied so far, especially in veterinary medicine. Hughes and Cowe (2010) have observed that the macrolides clarithromycin, roxithromycin, azithromycin and erythromycin are inhibitors of P-gp mediated digoxin transport. Some studies have suggested that azithromycin and erythromycin are P-gp substrates (Pachot et al., 2003; Sugie et al., 2004, Hariharan et al., 2009), while Pachot et al. (2003) go further and suggests that all macrolide antibiotics at very low micromolar concentrations are P-gp substrates. Transport assays in rabbit cornea have confirmed the important role of MRP2 in the transport of erythromycin (Karla et al., 2007).

The possible role of tilmicosin as an ABCG2 inhibitor in ruminants will be studied in this report.

8.1.9. SULFONAMIDES: SULPHAMETOXAZOLE

Sulfonamides are a group of synthetic bacteriostatic compounds characterized by containing a sulfonamide group. From the 40's about 150 sulfonamides have been developed with application in human and veterinary medicine (Baran et al., 2011). The sulfonamide we have included in our study is sulfamethoxazole used in veterinary medicine (**Figure 19, Page 57**). Sulfonamide antibiotics act by competitive inhibition of the enzyme dihidropteroata synthase (DHPS) and the bacterial wall permeability to glutamic acid, an essential component in the folic acid synthesis (reviewed by Baran et al., 2011).

The literature regarding interaction of sulfonamide antibiotics with ABC transporters is scarce. Sulfamethoxazole has been described as a non P-gp substrate (Susanto and Benet, 2002). Its relationship with other carriers as MRPs and ABCG2 is unknown. In the present report we have analyzed sulfamethoxazole as a potential inhibitor of ABCG2 mediated transport in ruminants.

8.2. OBJECTIVES

The objectives of this study were:

1º- Functional studies comparing human ABCG2 and murine Abcg2

- Identification of various fluoroquinolones as *in vitro* ABCG2 substrates using murine Abcg2 and human ABCG2 as models for transpithelial transport studies.

- Characterization of the interspecific differences in inhibitory potency of fumitremorgin C through accumulation experiments with mitoxantrone and chlorine e6, cytotoxicity assays with mitoxantrone and topotecan and transepithelial transport studies using nitrofurantoin and mitoxantrone.

2°- *In vitro* characterization of the functional differences between ovine ABCG2 and both bovine ABCG2 variants

- Establishment of cell models to characterize and compare ovine and bovine ABCG2 transporters. This study considers ovine ABCG2 cloning and the inclusion of the two bovine variants.

- Analysis of the functional interspecific and polymorphic differences using the generated MEF3.8 and HEK293 cell models regarding the inhibition capacity of macrocyclic lactones (ivermectin and doramectin), flavonoids (equol) and antibiotics (tilmicosin and sulfamethoxazole).

- Analysis of the differences between the two variants of bovine ABCG2 and the ovine homologue in vectorial transport using transduced MDCKII cells, of different types of compounds characterized by their presence in milk, such as antibiotics (nitrofurantoin), fluoroquinolones (marbofloxacin, difloxacin, orbifloxacin, sarafloxacin, and danofloxacin) and vitamins (riboflavin).

214

8.3. MATERIAL AND METHODS

8.3.1. CELL LINES

MDCKII cells (Madin-Darby Canine Kidney Cells) are polarized cells of canine renal epithelium. The MDCKII-Abcg2 and MDCKII-ABCG2 subclones, previously described by Pavek et al. (2005), were provided by Dr. Alfred H. Schinkel from Netherlands Cancer Institute in and they stable express murine Abcg2 and human ABCG2 transporters respectively. MDCKII-Y581 and MDCKII-S581 subclones have been recently generated in our research group by transduction with both variants of bovine ABCG2 cDNA (Real et al., 2011b). In the course of this Doctoral Thesis, MDCKII-oABCG2 subclone transduced with ovine ABCG2 was also generated. Parental cells and transduced subclones were grown in the conditions described by Merino et al. (2005a).

MEF3.8 cells are immortalized embryonic fibroblasts derived from triple *knock-out* mice Mdr1a/b^{-/-}, Mrp1^{-/-}. Both parental cells and subclones MEF3.8-Abcg2 and MEF3.8-ABCG2 were provided by Dr. Alfred H. Schinkel from Netherlands Cancer Institute. In the course of this Doctoral Thesis, MEF3.8-S581 and MEF3.8-Y581 subclones transduced with the two variants of bovine ABCG2 and MEF3.8-oABCG2 subclone transduced with ovine ABCG2 were also generated. Parental cells and transduced subclones were grown under the conditions described by Jonker et al. (2000).

HEK293 cells are human embryonic kidney fibroblasts produced by the transformation and culture of HEK cells with adenovirus 5. The transformation results in the incorporation of approximately 4.5 kilobases of the viral genome into human chromosome number 19 in HEK cells. Parental HEK293 cells were supplied by Dr. Suresh Ambudkar from the National Cancer Institute (NIH, USA). In the course of this Doctoral Thesis, HEK293-S581 and HEK293-Y581 subclones transduced with the two variants of bovine ABCG2 and HEK293-oABCG2 subclone transduced with ovine ABCG2 were also generated. Parental cells and transduced subclones were grown under the conditions described by Polgar et al. (2004).

SBFF1 cells, sheep fetal fibroblasts, were used for transient expression assays of ovine ABCG2. These cells were obtained from fetuses of Scottish Black Face ewes on day 35 of gestation, in the laboratory of Dr. McWhir at the Roslin Institute in Edinburgh and were provided by Dr. Margarita Marqués from Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) at the University of Leon. The cells were cultured under the conditions described by Marques et al. (2006).

8.3.1. PLASMID CONSTRUCTIONS

-pCR[®]2.1-TOPO[®]: this vector is ready for fast and easy cloning of PCR products. It is sold linearized with 3' ends and thymine outbounds with the enzyme topoisomerase I covalently attached to the vector. Since the PCR product obtained presents 3' adenine extreme outbounds, this will enable ligation with the protruding thymine ends of the vector (**Figure 20, Page 70**).

-pEF-1 α -IRES-GFP: this plasmid is based on the plasmid pEGFP-1 α (Clontech). This vector was modified by cloning into the multiple cloning site (MCS) gene the promoter of human elongation factor 1 α , and a IRES sequence (*Internal Ribosome Entry Site*). The IRES sequence allows to generate a bicistronic mRNA with the cDNA of interest and the cDNA encoding the green fluorescent protein GFP (Figure 21, Page 71). This vector was provided by Dr. Margarita Marqués from Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) at the University of Leon.

-pLZRS-IRES-GFP: this retroviral vector is based on the vector LZRSpMN-LacZ (Kinsella and Nolan, 1996). This vector was modified by replacing the lac Z gene by an MCS, followed by an IRES sequence and the sequence encoding the GFP protein. It also contains several *stop* codons in all the three reading frames. This vector was provided by Dr. A. H. Schinkel from Netherlands Cancer Institute (Figure 21, Page 71).

8.3.2. TRANSCELLULAR TRANSPORT ASSAYS

Transepithelial assays using MDCKII transduced cells were carried out as described elsewhere (Huisman et al., 2001; Merino et al., 2005b) with minor

modifications. With this assay, the rate of basolaterally or apically directed translocation can be determined after adding the drug to the apical or basolateral side. ABCG2 transports its substrates in the apical direction (Figure 22, Page 72). Cells were seeded on microporous membrane filters (3.0 µm pore size, 24 mm diameter; Transwell 3414; Costar, Corning, NY) at a density of 1.0×10^6 cells/well. Cells were grown for 3 days and medium was replaced every day. Transepithelial resistance was measured in each well using a Millicell-ERS ohmmeter (Millipore, Bedford, MA) and corrected for the resistance obtained in blank control wells; wells registering a resistance of ≥ 200 ohms were used in the transport experiments. This measurement was repeated at the end of the experiment to check the tightness of the monolayer. Two hours before the start of the experiment, medium at both the apical and basolateral sides of the monolayer was replaced with 2 ml of serum-free medium Opti-MEM[®] (Life Technologies. Inc.) without serum, and either with or without the specific ABCG2 inhibitor Ko143. The experiment started when medium in either the apical or basolateral compartment was replaced with fresh Opti-MEM[®] containing the tested substrate, either with or without Ko143. Cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂ and 100 µl aliquots of culture media were taken at 2 and 4 hours and stored at -20 °C for HPLC analysis. The appearance of the compound in the opposite compartment was presented as the fraction of the total compound added at the beginning of the experiment. The apparent permeability coefficient (Papp) was calculated as follows: Papp = $(\Delta Q/\Delta t) \times [1/(A \times C_0)]$, where $\Delta Q/\Delta t$ is the rate of drug appearing in the receiver chamber, which was obtained from the slope of the regression line on the transport-time profile across MDCK cell monolayers, with C₀ being the initial concentration of drug loaded in the donor chamber, and A the cell monolayer surface area (4.71 cm^2) .

8.3.3. ACCUMULATION ASSAYS

In vitro accumulation assays were performed as described by Pavek et al. (2005) and Merino et al. (2006). In these experiments, the drug accumulates within cells not expressing the transporter, however, this accumulation is decreased in cells that overexpress the transporter if the compound is an ABCG2 substrate (**Figure 24, Page**)

75). ABCG2 inhibition increases the accumulation of the substrate compound, thereby increasing the fluorescence within the cells.

Cells were cultured in 24 well plates $(3-5x10^4 \text{cells/well})$ in complete medium for 36 hours to subconfluence. Before the experiment, cells were preincubated for 60 min in Opti-MEM® (Invitrogen) supplemented with the inhibitor compound to be tested. Mitoxantrone (10 μ M) or chlorine e6 (50 μ M) were then added as substrates and, after 1 hour of incubation, the accumulation of the substrate was stopped by washing the cells with cold PBS. The relative accumulation of mitoxantrone or chlorine e6 was determined in a cytometer Cyan ADP quantifying the fluorescence values of 5000 cells. The wavelengths used for both mitoxantrone and chlorine e6 were 635 nm (excitation) and 650 nm (emission). Previous experiments demonstrated the absence of fluorescence for the inhibitors. Cytometric data obtained were processed and analyzed with WinMDI software version 2.8.

To compare and quantify the inhibition exerted on ABCG2 by the tested compounds, inhibitory potency was calculated by comparing the median fluorescence units (MF) obtained for each drug in cells expressing ABCG2 with that obtained in cells incubated with the inhibitor Ko143, according to the following equation: Inhibitory potency (%) = (MF with inhibitor-MF without inhibitor)/(MF with Ko143-MF without inhibitor)⁻¹⁰⁰. From the data obtained in the assay we calculated IC₅₀ values, the concentration required to inhibit drug mitoxantrone transport by 50%. The software used was Simfit edition 2 version 5.7 and adjustment was made assuming Michaelis-Menten kinetics.

8.3.4. CYTOTOXICITY ASSAYS

Cytotoxicity assays were performed as previously described, with modifications (Allen et al., 2002; Chearwae et al., 2004). Briefly, cells were plated at $6-10 \times 10^3$ /well in 96-well plates 24 hours prior to the addition of drugs. A concentration series of drug (mitoxantrone or topotecan) was applied along one plate axis and incubated for 24 hours (MDCKII and MEF3.8 cells) and for 72 hours (HEK293 cells) at 37°C and 5% CO₂. Relative cell proliferation was quantified with MTT or CyQuant assays. The IC₅₀ values of mitoxantrone and topotecan (drug concentrations that reduce cell viability by 50%)

were determined from the sigmoidal curves obtained by plotting the percentage of survival cells at various drug concentrations using GraphPad Prism (version 4.00, GraphPad Software, San Diego, CA). In order to quantify fumitremorgin C inhibition potency, we included EC_{90} value that was defined as the effective concentration of inhibitor that reduces drug resistance by 90%, and thus renders a cell line 10 times as sensitive to an ABCG2 substrate drug. EC_{90} values were calculated by modified cytotoxicity assays as described by Allen et al (2002). Briefly, cells were incubated with a concentration series of fumitremorgin C in the presence of mitoxantrone or topotecan at 10% of their IC₅₀ concentration, where the IC₅₀ had been determined immediately beforehand. The percentage of survival cells were plotted against the fumitremorgin C concentrations and the concentration that results in a 50% reduction in cell viability thus reduced the IC₅₀ by 90%.

8.3.5. HPLC ANALYSIS

The conditions for HPLC analysis of the different compounds were based on previously described methods: fluoroquinolones (Idowu and Peggins., 2004; Marazuela and Moreno-Bondi., 2004), riboflavin (van Herwaarden et al., 2007), nitrofurantoin (Gerk et al., 2003) and mitoxantrone (Johnson et al., 2003). Samples were not processed and 100 µl of culture medium was directly injected into the chromatographic system. Separation was performed on a reversed-phase column (Nucleosil 120 C18, 10 µm particle size, 250 x 4 mm or Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A, 4 µm particle size, 250 x 4.6 mm). The system consisted of a Waters 616 pump, a Waters 717 plus autosampler, a UV detector (model Waters 2487) and a fluorescence detector (model Waters 474). Fluoroquinolones were analyzed using 25 mM orthophosphoric acid pH 3/acetonitrile (77:23). The flow rate was set to 1.5 ml/min and UV absorbance was determined at 278 nm. Riboflavin was analyzed using 50 mM ammonium acetate pH 5/methanol (60:40). The flow rate was set to 1 ml/min and the fluorescence was determined at 372 nm (excitation) y 520 nm (emission). The composition of the mobile phase for <u>nitrofurantoin</u> analysis was 25 mM disodium phosphate buffer pH 3/methanol (78:22). The flow rate was set to 1.5 ml/min and UV absorbance was measured at 366 nm. Mitoxantrone was analyzed using 0.5 M ammonium acetate pH 3/methanol (50:50).

The flow rate was set to 1 ml/min and UV absorbance was determined at 245 nm. Peak areas were compared with the standard curve. The integration was performed using the software Millennium32 (*Waters Empower*®).

8.3.6. DNA CLONING TECHNIQUES

Total RNA was isolated from **ovine** liver using TRI reagent (Ambion). RNA was reverse-transcribed to cDNA using the *ThermoscriptTM First Strand Synthesis System* (Invitrogen) and then *ABCG2* cDNA was amplified with Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen). Primers were designed according to the published bovine sequence, thus in that moment ovine sequence was not available in databases (GenBank accession no. AJ871176): 5'-GAAGGCGGAAATGCTCAAAATGTCTTCC-3' and 5'-CACTGAAA TTAAAGAGGAATTTAAG-3'. The 2 kb PCR product was cloned using the *TOPO TA*® *Cloning kit* (Invitrogen). The ovine gene was subcloned in pEF1α-IRES-GFP and pLZRS-IRES-GFP vectors.

SBBF1 cells were transiently transfected with pEF1 α -S581ABCG2-IRES-GFP, pEF1 α -Y581ABCG2-IRES-GFP and pEF1 α -oABCG2-IRES-GFP plasmids, containing both bovine ABCG2 variants and ovine ABCG2 respectively. Transfections were performed using *LIPOFECTAMINE*TM 2000 reagent (Invitrogen) in Opti-MEM[®] (Invitrogen) for 24 h according to manufacturer instructions.

MDCKII and **MEF3.8** cells were stably transfected according to Michiels et al. (2000) with minor modifications (**Figure 25, Page 90**). The retroviral vectors used were pLZRS-oABCG2-IRES-GFP for MDCKII cells and pLZRS-Y581ABCG2-IRES-GFP, pLZRS-s581ABCG2-IRES-GFP, pLZRS-oABCG2-IRES-GFP and empty vector for MEF3.8 cells. These constructs were transfected into the amphotropic packaging cell line Phoenix (Nolan and Shatzman, 1998) using the calcium phosphate-precipitation method (*Calphos Mammalian Transfection* Kit; Clontech). Virus-containing supernatants were harvested 24 and 48 hours after transfection, filtered, and used to transduce cultures of MDCKII and MEF3.8 cells. Fifty to sixty percent confluent cultures of either cell type were incubated with virus supernatants for 24 hours in the presence of 4 µg/ml polybrene. After 7 to 10 days, MDCKII and MEF3.8 transduced clones were selected according to GFP expression and functional ABCG2 activity on

the basis of reduced mitoxantrone accumulation. The expression of ABCG2 in selected clones was verified by immunoblot and immunofluorescence.

HEK293 cells were stably transfected pEF1 α -S581ABCG2-IRES-GFP, pEF1 α -Y581ABCG2-IRES-GFP, pEF1 α -oABCG2-IRES-GFP plasmids and empty vector. Transfections were performed using *LIPOFECTAMINE*TM 2000 reagent (Invitrogen) in Opti-MEM[®] (Invitrogen) for 24 h according to manufacturer instructions. Cells were maintained in culture medium supplemented with 2 mg/ml G418. After 15 to 20 days, HEK293 transfected clones were selected according to GFP expression and functional ABCG2 activity on the basis of reduced mitoxantrone accumulation. The expression of ABCG2 in selected clones was verified by immunoblot.

8.3.7. IMMUNOLOCALIZATION

MDCKII and MEF3.8 transduced cells growing on cover slips (90% confluency) were fixed for 10 min with ice-cold methanol and permeabilized for 10 min with 1% Triton. Incubation with anti-mouse BXP-53 monoclonal antibody (Monosan) diluted 1:50 in PBS was carried out overnight at 4°C. The cells were washed 3 times with PBS and incubated with Alexa fluor 568-conjugated secondary antibody (Invitrogen) in a 1:200 dilution in PBS for 1 h at room temperature. Nuclear counterstaining was performed with DAPI (Invitrogen) (1 μ g/ml) for 5 min. The coverslips were mounted on glass slides using Vectashield (Vector Laboratories). Images were obtained with a laser-scanning confocal microscope Nikon Eclipse TE-200-U and analysed using EZ-C1 3.30 *Free Viewer* software.

8.3.8. IMMUNOBLOT ANALYSIS

MDCKII, MEF3.8 and HEK293 transduced cells were washed with PBS, homogenized in ice-cold RIPA buffer (Sigma-Aldrich) with protease inhibitor cocktail tablets (Roche), and centrifuged at 8,000xg for 15 min at 4 °C. Protein concentrations were determined using *Biorad Protein Assay*. Protein samples were resolved in an 8% SDS-polyacrylamide gel and electrotransferred to nitrocellulose Hybond membranes (GE Healthcare). The membranes were blocked with 1% skimmed milk in Tris buffer

saline plus 0.05% Tween 20 (blocking buffer), then incubated overnight at 4°C with anti-mouse ABCG2 BXP-53 monoclonal antibody (Monosan) diluted 1:500 in blocking buffer. Secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody and Immobilon Western kit (Millipore) were used to visualize ABCG2. Equal loading was verified after stripping, by incubating the membrane with β -actin antibody (1:5000 dilution in blocking buffer; Sigma-Aldrich). Visualisation of β -actin was performed the same way as ABCG2. Ponceau S and India Ink staining was also performed as loading control.

8.3.9. STATISTICAL ANALYSIS

A two-tailed unpaired Student t test was used to assess the significance of differences (P < 0.05) between the different parameters analyzed.

8.4. RESULTS AND DISCUSSION

8.4.1. FUNCTIONAL *IN VITRO* STUDY COMPARING MURINE Abcg2 AND HUMAN ABCG2

8.4.1.1. Transcellular transport of fluoroquinolones

Fluoroquinolones that includes, among other compounds, marbofloxacin, difloxacin, orbifloxacin and sarafloxacin are considered as potential ABCG2 substrates. Thus, ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, danofloxacin, grepafloxacin and ulifloxacina have been described as substrates of both human and murine ABCG2, in the latter case both *in vitro* and *in vivo* (Merino et al., 2006; Ando et al., 2007, Real et al., 2011a). However, not all fluoroquinolones are substrates of the transporter, as we recently observed in our research group with moxifloxacin (Egido et al., in preparation), so each fluoroquinolone needs to be studied individually.

Therefore, and as part of the first objective of this Doctoral Thesis we studied the *in vitro* interaction of different fluoroquinolones (marbofloxacin, difloxacin, orbifloxacin and sarafloxacin) with the ABCG2 transporter. We decided to begin the study with murine Abcg2, as the mouse is one of the most widely used models for preclinical drug trials. In addition, we simultaneously compare these studies with human

ABCG2. We employed the Transwell culture model to analyze the possibility that some of these fluoroquinolones were *in vitro* ABCG2 substrates. This model described by Huisman et al. (2001) is used routinely for this type of testing, since working with two compartments on both sides of a cell monolayer allow us to study the apical-basal (A-B) and the basal-apical (B-A) transport.

Our results showed that marbofloxacin, difloxacin, sarafloxacin and orbifloxacin are *in vitro* ABCG2 substrates (Figures 26-29, Tables 3-6, Pages 99-102 and 103-104) since in the Abcg2/ABCG2 tranduced cells, translocation in the apical direction was significantly increased and translocation in the basolateral direction highly decreased compared to the parental cells. In the presence of the selective Abcg2/ABCG2 inhibitor Ko143 this transport was completely inhibited. This finding does not guarantee their *in vivo* interaction with the transporter since *in vivo* situation may involve several transporters in the fluoroquinolones pharmacokinetics (Fink-Gremmels and Schrinkx, 2007, Alvarez et al., 2008) that may mask the effect of the transporter of interest. Thus, it is possible that some of these compounds described as *in vitro* ABCG2 substrates do not behave like that *in vivo*. For example, in our laboratory we have observed that sparfloxacin is an *in vitro* Abcg2 substrate, however using Abcg2^{-/-} mice there were no differences in bioavailability or appearance in milk of the fluoroquinolone compared to *wild-type* (data unpublished). Future studies will be necessary to determine the *in vivo* interaction between these fluoroquinolones and the transporter.

In addition, our results for the vectorial transport of the different fluoroquinolones studied indicated that they are efficiently transported by murine Abcg2 but not by human ABCG2 (Figures 26-29, Pages 99-102). Thus, the B-A/A-B transport ratios obtained for sarafloxacin and difloxacin in cells overexpressing human ABCG2 were not significantly different from those obtained with the parental cells, therefore, at the tested concentration there is no effective fluoroquinolone transport mediated by human ABCG2 (Tables 4 and 6, Pages 103-104). These observed differences in substrate affinity between human and murine ABCG2 have also been described with other fluoroquinolones (ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin and danofloxacin) by our research group (Merino et al., 2006; Real et al., 2011a) and with non fluoroquinolone substrates by other research groups. For instance, it has been shown a more efficient

transport of the antitumorals drugs axatinib and sorafenib in cell lines with Abcg2 murine stable expression versus human ABCG2 (Lagas et al., 2010, Poller et al., 2011).

8.4.1.2. Inhibition studies with fumitremorgin C

Because the interspecific differences in the ABCG2 transporter could not only be related to its ability to transport compounds but also to its ability to be inhibited, we decided to study the differences between murine Abcg2 and human ABCG2 regarding the inhibitory potency of fumitremorgin C, a model inhibitor of the transporter.

Our results show that there are marked differences in fumitremorgin C inhibitory properties between human ABCG2 and murine Abcg2 using various experimental assays. Thus, mitoxantrone accumulation studies allowed us to confirm that fumitremorgin C is an inhibitor of both ABCG2 homologues since FTC reverts the effect of mitoxantrone accumulation in transduced cells (Figure 30, Table 7, Pages 106 and 107). In addition, we observed a stronger inhibition in the case of human ABCG2 compared with murine transporter for both substrates tested (mitoxantrone and chlorine e6), reaching levels of statistical significance in all cases when comparing IC_{50} values (Table 7, Page 107). The subsequent transcellular transport studies using nitrofurantoin and mitoxantrone as substrates have confirmed the higher sensitivity of human ABCG2 against fumitremorgin C (Figures 34 and 35, Tables 9 and 10, Pages 112-114) since a complete inhibition of human ABCG2 mediated transport was observed whereas the inhibition of murine Abcg2 mediated transport was not complete at 1µM of FTC. This mycotoxin has been widely used in transport experiments with Caco-2 (Li et al., 2008a) and MDCKII cells (Zhang et al., 2005) to determine whether drugs such as topotecan, belotecan and dipyridamole are human ABCG2 substrates, since the difference between the apical-basolateral transport and basolateral-apical transport was completely eliminated by the addition of fumitremorgin C at 5 µM. However, our study shows that when fumitremorgin C is used at lower concentrations (in our case 1 µM, a concentration widely used), attention must be paid when interpreting the data, especially in the case of murine Abcg2, in which we did not obtain a complete inhibition in contrast to human ABCG2 (Figure 34, Table 9, Page 112 and 114).

Finally, cytotoxicity experiments performed in MDCKII and MEF3.8 reflected the ability of fumitremorgin C to reverse the resistance to mitoxantrone and topotecan mediated by both transporter homologues (**Figure 33, Page 110**). As an index of FTC potency we determined the EC₉₀ that indicates the concentration of FTC which reverts 90% of drug mediated resistance, which means the concentration of inhibitor that would make cells ten times more sensitive to the drug. EC₉₀ values for FTC were calculated as previously described by Allen et al. (2002) for reversal of resistance to mitoxantrone and topotecan (**Figure 33, Page 110**). EC₉₀ values ranged from 11 to 20 μ M for murine Abcg2 transduced cells and from 5 to 12 μ M in the case of human ABCG2 transduced cells depending on the drug used as substrate and the cell line used. In all cases, the EC₉₀ was significantly lower in human ABCG2 transduced cells compared to murine Abcg2 transduced cells. The highest difference was found for topotecan in transduced MEF3.8 cells. These results agree with those obtained in the accumulation and transport assays were human ABCG2 seems more sensitive to inhibition by FTC than its murine counterpart.

A potential explanation for the differences described between murine Abcg2 and human ABCG2 both in inhibition and in transport efficiency is the existence of differences in affinity/selectivity for substrates/inhibitors between both homologues, as it has previously been suggested (Merino et al., 2006) or a lower expression level of the human protein in the cell line used. In fact, some research groups have reported that is more difficult to obtain transduced cell lines with an adequate and stable expression of human ABCG2 than of murine Abcg2 (Tang et al., 2012). These authors explain that perhaps the human protein is better at extruding some essential nutrient (e.g., folate or vitamin B2) than the mouse variant, giving growth problems for colonies with high expression, or it may be less stable or less efficiently routed in the canine MDCKII cells than the mouse protein. However, Abcg2/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin and mitoxantrone is very similar between the two subclones (Figures 34 and 35, Tables 9 and 10, Pages 112-114) which may suggest that there are no marked differences in the expression level of murine Abcg2 and human ABCG2 in MDCKII. Unfortunately, no antibodies that recognize human ABCG2 and murine Abcg2 with equal efficiency are currently available. Thus, the functional differences between murine Abcg2 and human ABCG2, including their specificity/affinity for

225

substrates/inhibitors are likely to be attributable to the primary amino acid sequence. Although this transporter has a high level of conservation, the location of charged amino acids in the mouse sequence causes small changes in the positions assigned to some of the transmembrane domains compared to the arrangement of human ABCG2 (Allen et al., 1999). Single amino acid changes can dramatically affect the substrate preference and the inhibition pattern of ABC transporters including ABCG2 (Cusatis and Sparreboom, 2008; Merino et al., 2009). Existence of multiple binding sites on BCRP (Clark et al., 2006) and different affinities for the inhibitors have been suggested (Giri et al., 2009). Charged amino acids present at the binding sites of the transporter are likely to be responsible for species differences, as is the case for other ABC transporters (Ito, 2008). In fact, differences between murine and human ABCG2 in substrate specificity/affinity have already been reported (Merino et al., 2006). In the same way, their specificity/affinity for the inhibitors may also be different, as we show for FTC. Differences in specific behavior have also been revealed in previous comparisons of ABCG2 homologues from different species, such as mouse, dog, monkey and human (Li et al., 2008b). These kinds of differences between human and murine homologues have been reported for other ABC transporters. Differences in drug resistance and cytotoxicity profiles, sensitivity to modulators and substrate specificity for human and murine Pglycoprotein and MRP2 transporter have also been established (Katoh et al., 2006; Zimmermann et al., 2008; Choi et al., 2009).

8.4.2. FUNCTIONAL *IN VITRO* STUDY COMPARING BOVINE ABCG2 (\$581, Y581) AND OVINE ABCG2

The second objective of the present Doctoral Thesis was to *in vitro* study the functional differences between ovine ABCG2 and both variants of bovine ABCG2. With this purpose, and given that our research group has already cloned both variants of bovine ABCG2 (Merino et al., 2009), we cloned ovine ABCG2 and generated several cell models for the expression of both ovine and bovine ABCG2 which allowed us to functionally characterize the interspecific and polymorphic differences.

8.4.2.1. Ovine ABCG2 cloning

The strategy chosen for cloning the ovine ABCG2 cDNA was to perform a RT-PCR in two steps, followed by cloning of the PCR product using the *TOPO TA® Cloning* system (Invitrogen). Subsequently, the cDNAs were subcloned into appropriate expression vectors. **Figures 37 and 38 (Pages 117 and 118)** shows a schematic representation of the procedure for obtaining these constructions.

8.4.2.2. Transient expression of ovine and both variants of bovine ABCG2 in SBFF1 cells

To verify the functional result of the pEF1 α -oABCG2-IRES-GFP construction and to perform an initial study of potential functional differences between the two ABCG2 homologues we lipofected SBFF1 cells with empty vector, pEF1 α -oABCG2-IRES-GFP plasmid described in the previous section, and pEF1 α -S581-IRES-GFP and pEF1 α -Y581-IRES-GFP plasmids containing both variants of the bovine transporter, previously generated by our research group (Merino et al., 2009).

Cells that incorporated the plasmids were characterized by expressing the GFP marker gene (green fluorescent protein). The expression and functionality of the ovine transported was verified by flow cytometry using mitoxantrone (10 μ M) in accumulation studies. Plotting the fluorescence corresponding to the accumulation of mitoxantrone in each cell type (**Figure 40, Page 121**), we observed that ovine ABCG2 is an efficient mitoxantrone transporter, like bovine ABCG2. Regarding the interspecies comparison of ABCG2 functionality, there were no statistically significant differences in the accumulation of mitoxantrone between the bovine and ovine transporter. However, comparing both variants of bovine ABCG2, we confirmed the statistically significant differences that were previously described by our research group (Merino et al., 2009) with a significantly lower accumulation of the S581 variant, confirming its higher activity compared to the Y581 variant.

227

8.4.2.3. MEF3.8 cell model stably expressing ovine and both variants of bovine ABCG2

After verifying the functionality of the ovine transporter, we decided to obtain models with stable expression for comparative inhibition experiments between ovine and bovine ABCG2. The cell type chosen were MEF3.8 cells lacking endogenous expression of other ABC transporters such as P-gp or MRP1. The method used to generate stable cell lines was infection with retroviruses, as described in Material and Methods.

7-10 days after transduction, we proceeded to select and tripsinize GFP positive clones with an appropriate size, using cloning cylinders. A total of 116 clones were trypsinized, 39 of which corresponded to the empty vector, 38 to ovine ABCG2, 16 to bABCG2-S581 variant and 23 to bABCG2-Y581 variant. Figure 41 (Page 123) is an example of the cells belonging to a clone of each type. As the cells were proliferating, each clone was evaluated by flow cytometry, checking GFP expression level, the homogeneity of expression in each clone (percentage of GFP positive cells) and its functionality in terms of mitoxantrone accumulation. Figures 43, 44 and 45 (Pages 126-128) shows the results for the transporter functionality corresponding to all the clones from bovine S581, bovine Y581 and ovine ABCG2 respectively. Clones with the best characteristics regarding reduced accumulation of mitoxantrone and GFP expression level and homogeneity were selected. To check the stability of ABCG2 expression as function of time in the selected clones, these were maintained in culture for 8 weeks, repeating cytometry assays at 4 and 8 weeks. Clones that showed an increased accumulation of mitoxantrone or a decrease in fluorescence intensity for GFP at 4 or 8 weeks were discarded. Figures 49, 50 and 51 (Pages 132-134) compare the results at 0 and 8 weeks of culture for the selected clones. Candidate clones from accumulation assays that showed the best characteristics (clones 15 and 16 for the S581 variant, clones 12 and 15 for the Y581 variant and clones 13 and 16 for oABCG2) were analyzed using western-blot to assess protein levels at 0 and 8 weeks (Figure 52, Page 135). The results obtained showed no lost in protein expression over time in any of the selected clones. They also showed similar ABCG2 expression levels between ovine and both variants of the bovine transporter. Finally, to complete the evaluation of the selected clones and to determine the correct location of the transporter in the plasma membrane, we performed immunolocalization studies (Figure 53, Page 136).

MEF3.8 cell models generated allowed us to study the polymorphic and interspecific differences in the inhibitory effect on the ruminant transporter of macrocyclic lactones and the flavonoid equol using mitoxantrone accumulation assays. Equol has a certain importance in the veterinary field due to its estrogenic activity and its presence in the milk (Urpi-Sarda et al., 2008). Therefore, we thought interesting to evaluate the inhibitory effect of the isoflavonoid equol on the activity of ABCG2 in ruminants, for which we use MEF3.8 transduced cells. The results have reflected that equol is an inhibitor of both bovine and ovine ABCG2, since mitoxantrone accumulation increased in the cells overexpressing the transporter (Figure 58, Page 141). Inhibitory potencies were slightly higher for the S581 bovine variant compared to Y581 variant (Figure 59, Page 141). On the other hand, ovine ABCG2 mediated inhibition was significantly higher in most cases. These results pointed out towards the role of dietary components such as flavonoids in drug transport mediated by ABC transporters, as well as the differences generated by polymorphisms or interspecific differences. In the veterinary therapeutic field the use of flavonoids would be important in order to modify the drug bioavailability by diet variations (Perez et al., 2009b). On the other hand, our findings indicate the potential handicap of extrapolating experimental results between species, thus specific studies for each case would be essential.

We have identified doramectin as a new inhibitor of ovine and bovine ABCG2 transporter (**Figure 54, Page 139**), as well as confirm the inhibition exerted by another compound of the same family as ivermectin using the generated MEF3.8 cell models. In both cases, mitoxantrone accumulation increased in the cells overexpressing the transporter. In the case of doramectin, statistically significant differences were found for the inhibition of mitoxantrone accumulation between ovine and bovine ABCG2 transduced cells. No differences were found between both variants of bovine ABCG2. Ivermectin had been described as an inhibitor of human ABCG2 and murine Abcg2 (Jani et al., 2010). In addition, our research group in a preliminary study with SBFF1 cells, identified ivermectin as an effective inhibitor of bovine ABCG2, such inhibition was greater on the Y581 variant (Merino et al., 2009). This difference between the two

229

variants in the inhibition exerted by ivermectin has been confirmed in this memory (**Figure 57, Page 140**). Moreover, this is the first study regarding the *in vitro* inhibition of this compound on the ovine transporter. Thus our results corroborate previous *in vivo* studies of our research group in which there was a 40% inhibition of milk ABCG2mediated secretion of danofloxacin after co-administration with ivermectin in sheep (Real et al., 2011a). It appears that polymorphic differences in terms of inhibition, as well as the interspecific differences, depend on the substrate, thus the reported differences for macrocyclic lactones between the bovine and ovine transporter were variable depending on the compound and the concentration used. Lespine et al. (2007) suggested that the sugar moiety affects the hydrophobicity of macrocyclic lactones and determines the interaction of the membrane with the ABC transporters. Her work showed a lower IC₅₀ for doramectin than for ivermectin in the interaction with P-gp indicating a greater P-gp inhibition by doramectin, similar to our results with ABCG2.

8.4.2.4. HEK293 cell model stably expressing ovine and both variants of bovine ABCG2

Observing the results described above with MEF3.8 cells which show a differential interspecific and polymorphic response of the ABCG2 transporter, we decided to generate another stable expression cell model that allows us to deepen into the ABCG2 characterization in ruminants. HEK293 cells were chosen for this purpose.

20 days after lipofection and having maintained the cells under G418 selection, we proceeded to select and tripsinize GFP positive clones with an appropriate size, using cloning cylinders. Then we proceeded in a similar manner to that described for MEF3.8 cells to obtain valid clones for inhibition studies. In the generation of the present cell model, a much lower GFP fluorescence intensity was observed comparing to that determined for other cell models, and a smaller difference in the accumulation of mitoxantrone between parental cells and cells overexpressing the transporter (**Figure 67-69, Page 151-153**). We do not know the reason why the efficiency of expression of the transporter appears to be lower in these cells. Lipofection may be a less effective method to achieve stable expression of the transporter than transduction (Kimchi-Sarfaty et al., 2004).

Once validated the HEK293 cell model for ABCG2 stable expression, it seemed interesting to analyze the inhibitory effect on the transporter of the antibiotics sulfamethoxazole and tilmicosin, widely used in veterinary medicine, in mitoxantrone accumulation assays using the generated HEK293 cells. By adding sulfamethoxazole (Figure 71, Page 155) or tilmicosin (Figure 72, Page 156), the accumulation of mitoxantrone was not increased in cells overexpressing ABCG2, which indicates that these compounds are not effective inhibitors of bovine and ovine ABCG2, at the concentrations tested.

The generated HEK293 cells were also used for cytotoxicity assays in order to characterize more in detail the interspecific and polymorphic differences. Cytotoxicity experiments with mitoxantrone showed higher IC_{50} in the case of ovine ABCG2, indicating a greater resistance and therefore an increased activity of the transporter in cells overexpressing the ovine transporter (**Figure 73A, Table 11, Pages 157 and 158**). Furthermore, S581 variant showed greater resistance to mitoxantrone comparing to Y581, confirming the greater activity of this variant compared to the Y581. In the case of the other three compounds tested (ivermectin, sulfamethoxazole and tilmicosin), ABCG2 did not confer resistance to them in our cell model since the cellular viability curves for the empty vector and the ABCG2 variants were very similar (**Figure 73B, C and D, Page 157**).

8.4.2.5. MDCKII cell model stably expressing ovine ABCG2

Noting the great value of the cell models previously described in this memory to characterize the functional differences between the two variants of bovine ABCG2 and the ovine transporter, we decided to generate a stable expression model that allowed us to carry out other types of experiments, such as transepithelial transport assays. These studies are often more sensitive than cell accumulation experiments to detect ABCG2 substrates (Tang et al., 2012). Furthermore, given that we have already generated stable expression models of the two variants of bovine ABCG2 in MDCKII cells (Real et al., 2011b) and that these cells are a widely used cell model for transport studies, we decided to stably express ovine ABCG2 in this cell model to perform comparative studies across species.

The method used to generate stable cell lines was infection with retroviruses, as described in Material and Methods. We proceeded in a similar manner to that described for MEF3.8 cells to obtain valid clones for transepithelial transport studies. Thus, **Figures 76, 77 and 78 (Pages 162-164)** reflect mitoxantrone accumulation and GFP expression at 0 and 8 weeks of culture, western-blot analysis and immunolocalization respectively for the selected clones transduced with ovine ABCG2.

Considering the importance of ABCG2 in the transport of fluoroquinolones for veterinary use, as mentioned, and that many of them are excreted into milk, the study of this process in ruminants is of particular interest. We have identified four new ovine and bovine ABCG2 substrates belonging to the fluoroquinolone group and used in veterinary medicine: marbofloxacin, orbifloxacin, sarafloxacin and difloxacin (Figs. 80-84, Tables 13-17, Pages 167-171 and 172-174). In the comparative study danofloxacin was also used, previously described by our group as bovine ABCG2 substrate (Real et al., 2011b). Vectorial transport assays show a preferential transport in the B-A direction sensible to Ko143 in the ABCG2 transduced cells. In general, a more efficient ABCG" mediated transport in cells overexpressing ovine ABCG2 comparing to the two bovine variants was reported. In the case of marbofloxacin and difloxacin transport by the ovine protein, it was only significantly higher compared to the Y581 bovine variant. Furthermore, these studies confirmed that the S581 variant is more active than the Y581. These results are of great importance because of the identification of four new fluoroquinolones for veterinary use as ruminant ABCG2 substrates and the differential transport depending on the species and polymorphisms. In addition, our research group has recently obtained preliminary results reflecting an increased transport of danofloxacin into the milk in studies with cows carrying the S581 polymorphism compared to animals with Y581 genotype (Otero et al., In preparation), which completely validates our in vitro studies and indicates the potential in vivo relevance of our results.

In addition to fluoroquinolones, transport assays with polarized MDCKII cells have allowed us to identify a vitamin, riboflavin, as an ABCG2 substrate in ruminants (**Figure 85, Table 18, Pages 175 and 176**). Parental MDCKII cells displayed a high basolaterally directed translocation of riboflavin, whereas apically directed translocation was very low, indicating the presence of an active transpithelial absorptive riboflavin

transport process. This is in concordance with the accumulation of riboflavin in basolateral spaces and fluid-filled "domes" of MDCKII cells and may reflect the mechanisms responsible for reabsorption of riboflavin in the kidney and possibly in the intestine (van Herwaarden et al., 2007). ABCG2 is apically located and should transport its substrates to the apical side of the monolayer, possibly counteracting the endogenous absorptive process. Indeed, in ABCG2 transduced MDCKII cells the basolaterally directed translocation was markedly decreased and the apically directed translocation was increased, resulting in net apical transport of riboflavin. The apical riboflavin transport by ABCG2 was completely inhibited by Ko143. Riboflavin has been previously described as murine and human Abcg2 substrate in vitro. Furthermore, in vivo assays in mice showed that, on one hand, Abcg2 limits bioavailability of riboflavin in plasma and tissues and, on the other hand, that this vitamin is actively transported in the milk (van Herwaarden et al., 2007). However, there were not previously available assays to confirm that ABCG2 mediated riboflavin transport in ruminants. Our results showed increased transport of riboflavin by ovine ABCG2 (BA/AB ratio 0.921 ± 0.507) compared with any of the variants of bovine ABCG2, being this transport higher in the variant S581 compared to Y581 (BA/AB ratios 0.223 \pm 0.016 for S581 versus 0.120 \pm 0.024 for Y581). Riboflavin transport mediated by ABCG2 hypothesizes its involvement in the transfer of nutrients through milk from mother to fetus. In addition, we have shown in vitro polymorphic differences which may indicate the possibility of changes in the vitamin composition of milk depending on the genotype. However, this has not yet been investigated and possible biological consequences of this change are unclear, because lactating pups of Abcg2^{-/-} mice do not show an altered phenotype associated with riboflavin deficiency (van Herwaarden et al., 2006), at least in the laboratory environment and with a diet rich in riboflavin. It could occur that, depending on the genotype of the animal or in more natural conditions, for example in case of a more varied diet, reduction in food intake or an increased need for vitamin due to stress or illness, riboflavin transport into milk mediated by ABCG2 was essential for the young animals to be in a state of optimal health and nutrition. In any case, differences in vitamin composition of milk depending on the species or genotype are a key interest for human consumption.

Therefore, in general ABCG2 affinity for both the substrates and the inhibitors could vary depending on the species tested, as observed in our results. The ovine and bovine ABCG2 transporter share a high percentage of homology (greater than 95%) both in protein and nucleotide (Wu et al., 2008), but some of these small differences could determine the specificity against different substrates and inhibitors, as we have shown in the case of murine and human transporter. In the case of the generated ruminants models we cannot discard that these present different transport levels of expression according to the species as we discussed for mouse and human transporters. However, it is worth mentioning that due to the lack of specific antibodies for ABCG2 depending on the species, we cannot claim with certainty that the differences obtained by western-blot, as seems to occur in MDCKII cells transduced with ovine and bovine ABCG2 (**Figure 77, Page 163**), are due to different expression levels of the transporter, as they might be differences in affinity for the antibody used.

So far, no structural characteristics have been described which are definitely associated with the recognition and transport of compounds mediated by ABCG2. Therefore, cell models described in this memory represent a very useful tool for functional analysis of ABCG2 and for the identification of substrates and inhibitors. In addition, comparative studies allow us to analyze the effects triggered by the presence of SNPs and also differences between species. In this regard, and as an example of the usefulness of the generated models Table 19 (Page 193) shows a compilation of the BA/AB ratios obtained in transpithelial transport assays of fluoroquinolones tested using MDCKII cells transduced with murine, human, ovine and both bovine variants of ABCG2 transporter. Thus, observing our results, the mouse transporter is the most efficient, and there is a full parallelism between the results obtained from human ABCG2 and bovine variant Y581 in the transport of fluoroquinolones. Comparing the results between the two variants, transport is always higher in the S581 variant, except for sarafloxacin in which there are no differences. Finally, the presence of the Ncyclopropyl group in the heterocyclic ring in orbifloxacin and danofloxacin is particularly interesting in the case of ovine variant as the highest transport rates were obtained at these cases with BA/AB ratios of 6.66 ± 2.37 (Table 19, Page 193) and 12.63 ± 3.44 (**Table 13, 172**) respectively.

8.5. CONCLUSIONS

First. – Marbofloxacin and orbifloxacin fluoroquinolones are efficiently transported by murine Abcg2 and, to a lesser extent, by human ABCG2, in MDCKII cell models overexpressing the transporter. In the same cell model, difloxacin and sarafloxacin are murine Abcg2 substrates; however, they are not human ABCG2 substrates, at the assayed concentrations.

Second. - Fumitremorgin C inhibits the ABCG2 mediated accumulation of mitoxantrone and chlorine e6 in MDCKII and MEF3.8 cell models overexpressing the transporter, being this inhibition higher for human ABCG2 comparing to murine Abcg2. Moreover, it should be also noted that the inhibition results by fumitremorgin C obtained in MEF3.8 cells are more homogeneous, considering that there is no influence of Mdr1 or Mrp1.

Third. - Cytotoxicity studies with fumitremorgin C, performed in the previous cell models, showed a higher capacity for FTC to reverse the mitoxantrone and topotecan toxicity in human ABCG2 with respect to murine Abcg2. EC₉₀ values ranged from 11 to 20 μ M in cells transduced with mouse Abcg2 and 5 to 12 μ M in the case of human ABCG2.

Fourth. - Inhibition studies performed with MDCKII cells overexpressing the transporter showed that fumitremorgin C at 1 μ M completely inhibited the transport of nitrofurantoin and mitoxantrone mediated by human ABCG2 and to a lesser extent by murine Abcg2.

Fifth. - The generation of polarized MDCKII cell models overexpressing the ABCG2 ruminant transporter allowed us to identify the riboflavin as a new substrate of the transporter. The result shows that the secretory transport function for riboflavin is higher for ovine versus bovine variants.

Sixth. - Vectorial transport assays have also identified four new fluoroquinolones for veterinary use as ABCG2 substrates in ruminants: marbofloxacin, difloxacin, orbifloxacin and sarafloxacin. There is also a differential transport depending on the species and polymorphisms, demonstrating the increased activity of S581 bovine variant. Moreover, our finding of a higher inhibitory effect of equol on ovine ABCG2 indicates the difficulty of extrapolation of experimental data between species, demonstrating the need of specific studies in each case.

Seventh. - Polymorphic differences in relation to inhibition are substrate dependent, as it has been shown for macrocyclic lactones, as well as the interspecific differences, since functionality of the ovine and bovine transporter was variable depending on the macrocyclic lactone and on the concentration used.

Eighth. - The presence of N-cyclopropyl group in the heterocyclic ring of orbifloxacin and danofloxacin has a special interest in the case of ovine variant as these fluoroquinolones showed the highest transport rates with apical vectorial transport ratios of 6.66 ± 2.37 and 12.63 ± 3.44 , respectively.

8.6. REFERENCES (See Chapter 9)

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Basha E.A., Idkaidek N.M. y Al-Shunnaq A.F. (2007). "Pharmacokinetics of tilmicosin (provitil powder and pulmotil liquid ac) oral formulations in chickens." *Vet Res Commun* 31(4): 477-485.
- Albarellos G.A. y Landoni M.F. (2009). "Current concepts on the use of antimicrobials in cats." Vet J 180(3): 304-316.
- Alvarez A.I., Perez M., Prieto J.G., Molina A.J., Real R. y Merino G. (2008). "Fluoroquinolone efflux mediated by abc transporters." *J Pharm Sci* 97(9): 3483-3493.
- Allen J.D., Brinkhuis R.F., Wijnholds J. y Schinkel A.H. (1999). "The mouse bcrp1/mxr/abcp gene: Amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin." *Cancer Res* 59(17): 4237-4241.
- Allen J.D., Brinkhuis R.F., van Deemter L., Wijnholds J. y Schinkel A.H. (2000). "Extensive contribution of the multidrug transporters p-glycoprotein and mrp1 to basal drug resistance." *Cancer Res* 60(20): 5761-5766.
- Allen J.D. y Schinkel A.H. (2002). "Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2)." *Mol Cancer Ther* 1(6): 427-434.
- Allen J.D., van Loevezijn A., Lakhai J.M., van der Valk M., van Tellingen O., Reid G., Schellens J.H., Koomen G.J. y Schinkel A.H. (2002). "Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin c." *Mol Cancer Ther* 1(6): 417-425.
- Allen J.D., Van Dort S.C., Buitelaar M., van Tellingen O. y Schinkel A.H. (2003). "Mouse breast cancer resistance protein (bcrp1/abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by p-glycoprotein." *Cancer Res* 63(6): 1339-1344.
- Allikmets R., Schriml L.M., Hutchinson A., Romano-Spica V. y Dean M. (1998). "A human placenta-specific atp-binding cassette gene (abcp) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance." *Cancer Res* 58(23): 5337-5339.
- Anadon A. y Reeve-johnson L. (1999). "Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: Implications for veterinary medicine." *Res Vet Sci* 66(3): 197-203.
- Ando T., Kusuhara H., Merino G., Alvarez A.I., Schinkel A.H. y Sugiyama Y. (2007). "Involvement of breast cancer resistance protein (abcg2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones." *Drug Metab Dispos* 35(10): 1873-1879.
- Annilo T., Chen Z.Q., Shulenin S., Costantino J., Thomas L., Lou H., Stefanov S. y Dean M. (2006). "Evolution of the vertebrate abc gene family: Analysis of gene birth and death." *Genomics* 88(1): 1-11.
- Appelbaum P.C. y Hunter P.A. (2000). "The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and future perspectives." *Int J Antimicrob Agents* 16(1): 5-15.

- Aust S., Obrist P., Jaeger W., Klimpfinger M., Tucek G., Wrba F., Penner E. y Thalhammer T. (2004). "Subcellular localization of the abcg2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium." *Lab Invest* 84(8): 1024-1036.
- Aye I.L., Paxton J.W., Evseenko D.A. y Keelan J.A. (2007). "Expression, localisation and activity of atp binding cassette (abc) family of drug transporters in human amnion membranes." *Placenta* 28(8-9): 868-877.
- Ball P. (2000). "Safety of the new fluoroquinolones compared with ciprofloxacin." *J Chemother* 12 Suppl 1: 8-11.
- Baran W., Adamek E., Ziemianska J. y Sobczak A. (2011). "Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health." *J Hazard Mater* 196: 1-15.
- Bart J., Hollema H., Groen H.J., de Vries E.G., Hendrikse N.H., Sleijfer D.T., Wegman T.D., Vaalburg W. y van der Graaf W.T. (2004). "The distribution of drug-efflux pumps, p-gp, bcrp, mrp1 and mrp2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours." *Eur J Cancer* 40(14): 2064-2070.
- Bataille A.M., Maffeo C.L. y Renfro J.L. (2011). "Avian renal proximal tubule urate secretion is inhibited by cellular stress-induced amp-activated protein kinase." *Am J Physiol Renal Physiol* 300(6): F1327-1338.
- Bates S.E., Medina-Perez W.Y., Kohlhagen G., Antony S., Nadjem T., Robey R.W. y Pommier Y. (2004). "Abcg2 mediates differential resistance to sn-38 (7-ethyl-10hydroxycamptothecin) and homocamptothecins." *J Pharmacol Exp Ther* **310**(2): 836-842.
- Berge K.E., Tian H., Graf G.A., Yu L., Grishin N.V., Schultz J., Kwiterovich P., Shan B., Barnes R. y Hobbs H.H. (2000). "Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent abc transporters." *Science* 290(5497): 1771-1775.
- **Bertino J., Jr. y Fish D.** (2000). "The safety profile of the fluoroquinolones." *Clin Ther* **22**(7): 798-817; discussion 797.
- Bhaiya P., Roychowdhury S., Vyas P.M., Doll M.A., Hein D.W. y Svensson C.K. (2006). "Bioactivation, protein haptenation, and toxicity of sulfamethoxazole and dapsone in normal human dermal fibroblasts." *Toxicol Appl Pharmacol* 215(2): 158-167.
- Bhattacharya S., Das A., Mallya K. y Ahmad I. (2007). "Maintenance of retinal stem cells by abcg2 is regulated by notch signaling." J Cell Sci 120(Pt 15): 2652-2662.
- Blazquez A.G., Briz O., Romero M.R., Rosales R., Monte M.J., Vaquero J., Macias R.I., Cassio D. y Marin J.J. (2012). "Characterization of the role of abcg2 as a bile acid transporter in liver and placenta." *Mol Pharmacol* 81(2): 273-283.
- Borst P., Zelcer N. y van de Wetering K. (2006). "Mrp2 and 3 in health and disease." *Cancer Lett* 234(1): 51-61.
- Borst P., de Wolf C. y van de Wetering K. (2007). "Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5." *Pflugers Arch* **453**(5): 661-673.
- **Boscia J.A., Kobasa W.D. y Kaye D.** (1988). "Comparison of difloxacin, enoxacin, and cefazolin for the treatment of experimental staphylococcus aureus endocarditis." *Antimicrob Agents Chemother* **32**(2): 262-264.
- **Bourke C.A.** (1995). "The clinical differentiation of nervous and muscular locomotor disorders of sheep in australia." *Aust Vet J* **72**(6): 228-234.
- Bram E.E., Adar Y., Mesika N., Sabisz M., Skladanowski A. y Assaraf Y.G. (2009). "Structural determinants of imidazoacridinones facilitating antitumor activity are crucial for substrate recognition by abcg2." *Mol Pharmacol* 75(5): 1149-1159.
- Breedveld P., Pluim D., Cipriani G., Wielinga P., van Tellingen O., Schinkel A.H. y Schellens J.H. (2005). "The effect of bcrp1 (abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (gleevec): Implications for the use of breast cancer resistance protein and p-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients." *Cancer Res* 65(7): 2577-2582.
- Brockman H., Henckel W. (1950). "Pickromycin, ein neues antibiotikum aus actinomycetun." *Naturwissenschaften* 37: 138–139.
- Burg R.W., Miller B.M., Baker E.E., Birnbaum J., Currie S.A., Hartman R., Kong Y.L., Monaghan R.L., Olson G., Putter I., Tunac J.B., Wallick H., Stapley E.O., Oiwa R. y Omura S. (1979). "Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation." *Antimicrob Agents Chemother* 15(3): 361-367.
- Burkhardt J.E., Hill M.A., Turek J.J. y Carlton W.W. (1992). "Ultrastructural changes in articular cartilages of immature beagle dogs dosed with difloxacin, a fluoroquinolone." *Vet Pathol* 29(3): 230-238.
- Calatozzolo C., Gelati M., Ciusani E., Sciacca F.L., Pollo B., Cajola L., Marras C., Silvani A., Vitellaro-Zuccarello L., Croci D., Boiardi A. y Salmaggi A. (2005). "Expression of drug resistance proteins pgp, mrp1, mrp3, mrp5 and gst-pi in human glioma." *J Neurooncol* 74(2): 113-121.
- **Calcagno A.M., Kim I.W., Wu C.P., Shukla S. y Ambudkar S.V.** (2007). "Abc drug transporters as molecular targets for the prevention of multidrug resistance and drug-drug interactions." *Curr Drug Deliv* **4**(4): 324-333.
- **Cascorbi I.** (2006). "Role of pharmacogenetics of atp-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs." *Pharmacol Ther* **112**(2): 457-473.
- Ceckova M., Libra A., Pavek P., Nachtigal P., Brabec M., Fuchs R. y Staud F. (2006). "Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (bcrp, abcg2) transporter in the human choriocarcinoma cell line bewo." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(1-2): 58-65.

- Chearwae W., Anuchapreeda S., Nandigama K., Ambudkar S.V. y Limtrakul P. (2004). "Biochemical mechanism of modulation of human p-glycoprotein (abcb1) by curcumin i, ii, and iii purified from turmeric powder." *Biochem Pharmacol* **68**(10): 2043-2052.
- Chen Z., Liu F., Ren Q., Zhao Q., Ren H., Lu S., Zhang L. y Han Z. (2010). "Suppression of abcg2 inhibits cancer cell proliferation." *Int J Cancer* 126(4): 841-851.
- Chen Z.S. y Tiwari A.K. (2011). "Multidrug resistance proteins (mrps/abccs) in cancer chemotherapy and genetic diseases." *FEBS J* 278(18): 3226-3245.
- Chieli E., Romiti N., Cervelli F. y Tongiani R. (1995). "Effects of flavonols on p-glycoprotein activity in cultured rat hepatocytes." *Life Sci* 57(19): 1741-1751.
- Choi M.K., Kim H., Han Y.H., Song I.S. y Shim C.K. (2009). "Involvement of mrp2/mrp2 in the species different excretion route of benzylpenicillin between rat and human." *Xenobiotica* 39(2): 171-181.
- Chomczynski P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of rna, DNA and proteins from cell and tissue samples." *Biotechniques* **15**(3): 532-534, 536-537.
- Clark R., Kerr I.D. y Callaghan R. (2006). "Multiple drugbinding sites on the r482g isoform of the abcg2 transporter." *Br J Pharmacol* **149**(5): 506-515.
- Cohen-Zinder M., Seroussi E., Larkin D.M., Loor J.J., Everts-van der Wind A., Lee J.H., Drackley J.K., Band M.R., Hernandez A.G., Shani M., Lewin H.A., Weller J.I. y Ron M. (2005). "Identification of a missense mutation in the bovine abcg2 gene with a major effect on the qtl on chromosome 6 affecting milk yield and composition in holstein cattle." *Genome Res* 15(7): 936-944.
- **Cole R.J., Dorner J.W., Cox R.H., Cunfer B.M., Cutler H.G. y Stuart B.P.** (1981). "The isolation and identification of several trichothecene mycotoxins from fusarium heterosporum." *J Nat Prod* **44**(3): 324-330.
- Cole S.P., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M. y Deeley R.G. (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." *Science* 258(5088): 1650-1654.
- **Cooray H.C., Blackmore C.G., Maskell L. y Barrand M.A.** (2002). "Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain." *Neuroreport* **13**(16): 2059-2063.
- Cui Y.J., Cheng X., Weaver Y.M. y Klaassen C.D. (2009). "Tissue distribution, genderdivergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (mdr1a, mdr1b, mdr2) in mice." *Drug Metab Dispos* 37(1): 203-210.
- **Cusatis G. y Sparreboom A.** (2008). "Pharmacogenomic importance of abcg2." *Pharmacogenomics* **9**(8): 1005-1009.

- Dano K. (1973). "Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells." *Biochim Biophys Acta* 323(3): 466-483.
- **Davis J.L., Papich M.G. y Weingarten A.** (2006). "The pharmacokinetics of orbifloxacin in the horse following oral and intravenous administration." *J Vet Pharmacol Ther* **29**(3): 191-197.
- Desuzinges-Mandon E., Arnaud O., Martinez L., Huche F., Di Pietro A. y Falson P. (2010). "Abcg2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop." *J Biol Chem* 285(43): 33123-33133.
- **Didier A. y Loor F.** (1996). "The abamectin derivative ivermectin is a potent p-glycoprotein inhibitor." *Anticancer Drugs* **7**(7): 745-751.
- Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K. y Ross D.D. (1998). "A multidrug resistance transporter from human mcf-7 breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15665-15670.
- **Doyle L.A. y Ross D.D.** (2003). "Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein bcrp (abcg2)." *Oncogene* **22**(47): 7340-7358.
- Duncan E.J., Dodds K.G., Henry H.M., Thompson M.P. y Phua S.H. (2007). "Cloning, mapping and association studies of the ovine abcg2 gene with facial eczema disease in sheep." Anim Genet 38(2): 126-131.
- Eberl S., Renner B., Neubert A., Reisig M., Bachmakov I., Konig J., Dorje F., Murdter T.E., Ackermann A., Dormann H., Gassmann K.G., Hahn E.G., Zierhut S., Brune K. y Fromm M.F. (2007). "Role of p-glycoprotein inhibition for drug interactions: Evidence from in vitro and pharmacoepidemiological studies." *Clin Pharmacokinet* 46(12): 1039-1049.
- Eisenblatter T. y Galla H.J. (2002). "A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier." *Biochem Biophys Res Commun* 293(4): 1273-1278.
- Enokizono J., Kusuhara H. y Sugiyama Y. (2007). "Effect of breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) on the disposition of phytoestrogens." *Mol Pharmacol* 72(4): 967-975.
- Enokizono J., Kusuhara H., Ose A., Schinkel A.H. y Sugiyama Y. (2008). "Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds." *Drug Metab Dispos* **36**(6): 995-1002.
- Escudero E., Carceles C.M., Fernandez-varon E., Marin P. y Benchaoui H. (2007). "Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats." *J Vet Pharmacol Ther* **30**(6): 572-577.
- **Escudero E., Marin P., Carceles C.M., Ramirez M.J. y Fernandez-Varon E.** (2011). "Pharmacokinetic and milk penetration of a difloxacin long-acting poloxamer gel formulation with carboxy-methylcellulose in lactating goats." *Vet J* **188**(1): 92-95.

- **Evans W.E. y Relling M.V.** (1999). "Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics." *Science* **286**(5439): 487-491.
- Evseenko D.A., Paxton J.W. y Keelan J.A. (2006). "Abc drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290(5): R1357-1365.
- Fatima S., Zhou S. y Sorrentino B.P. (2012). "Abcg2 expression marks tissue-specific stem cells in multiple organs in a mouse progeny tracking model." *Stem Cells* **30**(2): 210-221.
- Fetsch P.A., Abati A., Litman T., Morisaki K., Honjo Y., Mittal K. y Bates S.E. (2006). "Localization of the abcg2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues." *Cancer Lett* 235(1): 84-92.
- Ford J., Khoo S.H. y Back D.J. (2004). "The intracellular pharmacology of antiretroviral protease inhibitors." *J Antimicrob Chemother* **54**(6): 982-990.
- Ford M.M., Dubielzig R.R., Giuliano E.A., Moore C.P. y Narfstrom K.L. (2007). "Ocular and systemic manifestations after oral administration of a high dose of enrofloxacin in cats." *Am J Vet Res* 68(2): 190-202.
- Frank L.A., Hnilica K.A., May E.R., Sargent S.J. y Davis J.A. (2005). "Effects of sulfamethoxazole-trimethoprim on thyroid function in dogs." *Am J Vet Res* **66**(2): 256-259.
- **Fukuda Y. y Schuetz J.D.** (2012). "Abc transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance." *Biochem Pharmacol*.
- Furukawa T., Wakabayashi K., Tamura A., Nakagawa H., Morishima Y., Osawa Y. y Ishikawa T. (2009). "Major snp (q141k) variant of human abc transporter abcg2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations." *Pharm Res* 26(2): 469-479.
- Garcia-Fernandez M., Gutierrez-Gil B., Sanchez J.P., Moran J.A., Garcia-Gamez E., Alvarez L. y Arranz J.J. (2011). "The role of bovine causal genes underlying dairy traits in spanish churra sheep." *Anim Genet* 42(4): 415-420.
- Garimella T.S., Ross D.D., Eiseman J.L., Mondick J.T., Joseph E., Nakanishi T., Bates S.E. y Bauer K.S. (2005). "Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of the breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) inhibitor fumitremorgin c in scid mice bearing t8 tumors." *Cancer Chemother Pharmacol* 55(2): 101-109.
- Gedeon C., Anger G., Piquette-Miller M. y Koren G. (2008). "Breast cancer resistance protein: Mediating the trans-placental transfer of glyburide across the human placenta." *Placenta* 29(1): 39-43.
- Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea M.H., Itoh T. y Tomizawa J.I. (1977). "Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity." *Proc Natl Acad Sci* U S A 74(11): 4772-4776.

- Gerchman I., Levisohn S., Mikula I., Manso-Silvan L. y Lysnyansky I. (2011). "Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of mycoplasma gallisepticum strains isolated from poultry." *Vet Res* **42**(1): 90.
- Gerk P.M., Kuhn R.J., Desai N.S. y McNamara P.J. (2001). "Active transport of nitrofurantoin into human milk." *Pharmacotherapy* **21**(6): 669-675.
- Giacomini K.M., Huang S.M., Tweedie D.J., Benet L.Z., Brouwer K.L., Chu X., Dahlin A., Evers R., Fischer V., Hillgren K.M., Hoffmaster K.A., Ishikawa T., Keppler D., Kim R.B., Lee C.A., Niemi M., Polli J.W., Sugiyama Y., Swaan P.W., Ware J.A., Wright S.H., Yee S.W., Zamek-Gliszczynski M.J. y Zhang L. (2010). "Membrane transporters in drug development." *Nat Rev Drug Discov* 9(3): 215-236.
- Giles C.J., Magonigle R.A., Grimshaw W.T., Tanner A.C., Risk J.E., Lynch M.J. y Rice J.R. (1991). "Clinical pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin in cattle." *J Vet Pharmacol Ther* 14(4): 400-410.
- Giri N., Agarwal S., Shaik N., Pan G., Chen Y. y Elmquist W.F. (2009). "Substratedependent breast cancer resistance protein (bcrp1/abcg2)-mediated interactions: Consideration of multiple binding sites in in vitro assay design." *Drug Metab Dispos* 37(3): 560-570.
- Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J. y Sarkadi B. (2004). "The role of abc transporters in drug resistance, metabolism and toxicity." *Curr Drug Deliv* 1(1): 27-42.
- Gorham P.E., Carroll L.H., McAskill J.W., Watkins L.E., Ose E.E., Tonkinson L.V. y Merrill J.K. (1990). "Tilmicosin as a single injection treatment for respiratory disease of feedlot cattle." *Can Vet J* 31(12): 826-829.
- Goudah A., Cho H.J., Shin H.C., Shim J.H., Regmi N.L., Shimoda M. y Abd El-Aty A.M. (2009). "Pharmacokinetics and milk distribution characteristics of orbifloxacin following intravenous and intramuscular injection in lactating ewes." J Vet Pharmacol Ther 32(4): 338-344.
- Graf G.A., Yu L., Li W.P., Gerard R., Tuma P.L., Cohen J.C. y Hobbs H.H. (2003). "Abcg5 and abcg8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion." *J Biol Chem* 278(48): 48275-48282.
- Griffiths N.M., Hirst B.H. y Simmons N.L. (1994). "Active intestinal secretion of the fluoroquinolone antibacterials ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin; a common secretory pathway?" *J Pharmacol Exp Ther* **269**(2): 496-502.
- Grube M., Reuther S., Meyer Zu Schwabedissen H., Kock K., Draber K., Ritter C.A., Fusch C., Jedlitschky G. y Kroemer H.K. (2007). "Organic anion transporting polypeptide 2b1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta." *Drug Metab Dispos* 35(1): 30-35.

- Guminski A.D., Balleine R.L., Chiew Y.E., Webster L.R., Tapner M., Farrell G.C., Harnett P.R. y Defazio A. (2006). "Mrp2 (abcc2) and cisplatin sensitivity in hepatocytes and human ovarian carcinoma." *Gynecol Oncol* 100(2): 239-246.
- **Gupta A., Unadkat J.D. y Mao Q.** (2007). "Interactions of azole antifungal agents with the human breast cancer resistance protein (bcrp)." *J Pharm Sci* **96**(12): 3226-3235.
- Gutmann H., Hruz P., Zimmermann C., Beglinger C. y Drewe J. (2005). "Distribution of breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) mrna expression along the human gi tract." *Biochem Pharmacol* 70(5): 695-699.
- Hannan P.C., O'Hanlon P.J. y Rogers N.H. (1989). "In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens." *Res Vet Sci* 46(2): 202-211.
- Hariharan S., Gunda S., Mishra G.P., Pal D. y Mitra A.K. (2009). "Enhanced corneal absorption of erythromycin by modulating p-glycoprotein and mrp mediated efflux with corticosteroids." *Pharm Res* 26(5): 1270-1282.
- Haritova A.M., Rusenova N.V., Parvanov P.R., Lashev L.D. y Fink-Gremmels J. (2006). "Integration of pharmacokinetic and pharmacodynamic indices of marbofloxacin in turkeys." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(11): 3779-3785.
- Haritova A.M., Schrickx J.A. y Fink-Gremmels J. (2007). "Functional studies on the activity of efflux transporters in an ex vivo model with chicken splenocytes and evaluation of selected fluoroquinolones in this model." *Biochem Pharmacol* **73**(6): 752-759.
- Haritova A.M., Schrickx J., Lashev L.D. y Fink-Gremmels J. (2008). "Expression of mdr1, mrp2 and bcrp mrna in tissues of turkeys." *J Vet Pharmacol Ther* **31**(4): 378-385.
- Hauswald S., Duque-Afonso J., Wagner M.M., Schertl F.M., Lubbert M., Peschel C., Keller U. y Licht T. (2009). "Histone deacetylase inhibitors induce a very broad, pleiotropic anticancer drug resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by modulation of multiple abc transporter genes." *Clin Cancer Res* 15(11): 3705-3715.
- Hegedus C., Ozvegy-Laczka C., Szakacs G. y Sarkadi B. (2009a). "Interaction of abc multidrug transporters with anticancer protein kinase inhibitors: Substrates and/or inhibitors?" *Curr Cancer Drug Targets* 9(3): 252-272.
- Hegedus C., Szakacs G., Homolya L., Orban T.I., Telbisz A., Jani M. y Sarkadi B. (2009b). "Ins and outs of the abcg2 multidrug transporter: An update on in vitro functional assays." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(1): 47-56.
- **Higgins C.F.** (1992). "Abc transporters: From microorganisms to man." *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113.
- Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmoller J., Johne A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M. y Brinkmann U. (2000). "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and

correlation of one allele with p-glycoprotein expression and activity in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3473-3478.

- Honjo Y., Hrycyna C.A., Yan Q.W., Medina-Perez W.Y., Robey R.W., van de Laar A., Litman T., Dean M. y Bates S.E. (2001). "Acquired mutations in the mxr/bcrp/abcp gene alter substrate specificity in mxr/bcrp/abcp-overexpressing cells." *Cancer Res* 61(18): 6635-6639.
- **Hooper D.C.** (2000). "New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance." *Clin Infect Dis* **30**(2): 243-254.
- Hori S., Ohtsuki S., Tachikawa M., Kimura N., Kondo T., Watanabe M., Nakashima E. y Terasaki T. (2004). "Functional expression of rat abcg2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s)." J Neurochem 90(3): 526-536.
- Hounsome N., Hounsome B., Tomos D. y Edwards-Jones G. (2009). "Changes in antioxidant compounds in white cabbage during winter storage." *Postharvest Biology and Technology* 52(2): 173-179.
- Hughes J. y Crowe A. (2010). "Inhibition of p-glycoprotein-mediated efflux of digoxin and its metabolites by macrolide antibiotics." *J Pharmacol Sci* 113(4): 315-324.
- Huisman M.T., Smit J.W., Wiltshire H.R., Hoetelmans R.M., Beijnen J.H. y Schinkel A.H. (2001). "P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir." *Mol Pharmacol* **59**(4): 806-813.
- Huls M., Brown C.D., Windass A.S., Sayer R., van den Heuvel J.J., Heemskerk S., Russel F.G. y Masereeuw R. (2008). "The breast cancer resistance protein transporter abcg2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane." *Kidney Int* 73(2): 220-225.
- Huls M., Russel F.G. y Masereeuw R. (2009). "The role of atp binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration." *J Pharmacol Exp Ther* **328**(1): 3-9.
- **Idowu O.R. y Peggins J.O.** (2004). "Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection." *J Pharm Biomed Anal* **35**(1): 143-153.
- Ieiri I., Higuchi S. y Sugiyama Y. (2009). "Genetic polymorphisms of uptake (oatp1b1, 1b3) and efflux (mrp2, bcrp) transporters: Implications for inter-individual differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins and other clinically relevant drugs." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5(7): 703-729.
- Ijzer J., Schotanus B.A., Vander Borght S., Roskams T.A., Kisjes R., Penning L.C., Rothuizen J. y van den Ingh T.S. (2010). "Characterisation of the hepatic progenitor cell compartment in normal liver and in hepatitis: An immunohistochemical comparison between dog and man." Vet J 184(3): 308-314.

- Imai Y., Nakane M., Kage K., Tsukahara S., Ishikawa E., Tsuruo T., Miki Y. y Sugimoto Y. (2002). "C421a polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of q141k protein and low-level drug resistance." *Mol Cancer Ther* 1(8): 611-616.
- Ishikawa T., Nakagawa H., Hagiya Y., Nonoguchi N., Miyatake S. y Kuroiwa T. (2010). "Key role of human abc transporter abcg2 in photodynamic therapy and photodynamic diagnosis." *Adv Pharmacol Sci* **2010**: 587306.
- Ito A., Hirai K., Inoue M., Koga H., Suzue S., Irikura T. y Mitsuhashi S. (1980). "In vitro antibacterial activity of am-715, a new nalidixic acid analog." *Antimicrob Agents Chemother* 17(2): 103-108.
- Ito K. (2008). "Abcc2/abcc2 transport property in different species and its modulation by heterogeneous factors." *Drug Metab Pharmacokinet* **23**(6): 394-405.
- Itoda M., Saito Y., Shirao K., Minami H., Ohtsu A., Yoshida T., Saijo N., Suzuki H., Sugiyama Y., Ozawa S. y Sawada J. (2003). "Eight novel single nucleotide polymorphisms in abcg2/bcrp in japanese cancer patients administered irinotacan." *Drug Metab Pharmacokinet* 18(3): 212-217.
- Jani M., Makai I., Kis E., Szabo P., Nagy T., Krajcsi P. y Lespine A. (2011). "Ivermectin interacts with human abcg2." *J Pharm Sci* 100(1): 94-97.
- Ji Y. y Morris M.E. (2005). "Membrane transport of dietary phenethyl isothiocyanate by abcg2 (breast cancer resistance protein)." *Mol Pharm* **2**(5): 414-419.
- Johnson J.L., Ahmad A., Khan S., Wang Y.F., Abu-Qare A.W., Ayoub J.E., Zhang A. y Ahmad I. (2004). "Improved liquid chromatographic method for mitoxantrone quantification in mouse plasma and tissues to study the pharmacokinetics of a liposome entrapped mitoxantrone formulation." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 799(1): 149-155.
- Jones R.N. y Erwin M.E. (1998). "In vitro susceptibility testing and quality control parameters for sarafloxacin (a-56620): A fluoroquinolone used for treatment and control of colibacillosis in poultry. Quality control study group." *Diagn Microbiol Infect Dis* **32**(1): 55-64.
- Jonker J.W., Smit J.W., Brinkhuis R.F., Maliepaard M., Beijnen J.H., Schellens J.H. y Schinkel A.H. (2000). "Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan." *J Natl Cancer Inst* 92(20): 1651-1656.
- Jonker J.W., Merino G., Musters S., van Herwaarden A.E., Bolscher E., Wagenaar E., Mesman E., Dale T.C. y Schinkel A.H. (2005). "The breast cancer resistance protein bcrp (abcg2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk." *Nat Med* 11(2): 127-129.
- Jordan W.H., Byrd R.A., Cochrane R.L., Hanasono G.K., Hoyt J.A., Main B.W., Meyerhoff R.D. y Sarazan R.D. (1993). "A review of the toxicology of the antibiotic micotil 300." Vet Hum Toxicol 35(2): 151-158.

- Kage K., Fujita T. y Sugimoto Y. (2005). "Role of cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein bcrp/abcg2." *Cancer Sci* 96(12): 866-872.
- Kalabis G.M., Petropoulos S., Gibb W. y Matthews S.G. (2007). "Breast cancer resistance protein (bcrp1/abcg2) in mouse placenta and yolk sac: Ontogeny and its regulation by progesterone." *Placenta* 28(10): 1073-1081.
- Karla P.K., Pal D., Quinn T. y Mitra A.K. (2007). "Molecular evidence and functional expression of a novel drug efflux pump (abcc2) in human corneal epithelium and rabbit cornea and its role in ocular drug efflux." *Int J Pharm* 336(1): 12-21.
- Karns P.A. y Luther D.G. (1984). "A survey of adverse effects associated with ivermectin use in louisiana horses." J Am Vet Med Assoc 185(7): 782-783.
- Katayama K., Masuyama K., Yoshioka S., Hasegawa H., Mitsuhashi J. y Sugimoto Y. (2007). "Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: Transporter specificity and structure-activity relationship." *Cancer Chemother Pharmacol* 60(6): 789-797.
- Katoh M., Suzuyama N., Takeuchi T., Yoshitomi S., Asahi S. y Yokoi T. (2006). "Kinetic analyses for species differences in p-glycoprotein-mediated drug transport." *J Pharm Sci* 95(12): 2673-2683.
- Kawase A., Matsumoto Y., Hadano M., Ishii Y. y Iwaki M. (2009). "Differential effects of chrysin on nitrofurantoin pharmacokinetics mediated by intestinal breast cancer resistance protein in rats and mice." J Pharm Pharm Sci 12(2): 150-163.
- Kim Chiaw P., Eckford P.D. y Bear C.E. (2011). "Insights into the mechanisms underlying cftr channel activity, the molecular basis for cystic fibrosis and strategies for therapy." *Essays Biochem* **50**(1): 233-248.
- Kimchi-Sarfaty C., Alexander N.S., Brittain S., Ali S. y Gottesman M.M. (2004). "Transduction of multiple cell types using improved conditions for gene delivery and expression of sv40 pseudovirions packaged in vitro." *Biotechniques* 37(2): 270-275.
- **Kinsella T.M. y Nolan G.P.** (1996). "Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus." *Hum Gene Ther* **7**(12): 1405-1413.
- Kitagawa S., Nabekura T., Takahashi T., Nakamura Y., Sakamoto H., Tano H., Hirai M. y Tsukahara G. (2005). "Structure-activity relationships of the inhibitory effects of flavonoids on p-glycoprotein-mediated transport in kb-c2 cells." *Biol Pharm Bull* 28(12): 2274-2278.
- Klaassen C.D. y Aleksunes L.M. (2010). "Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: Function and regulation." *Pharmacol Rev* **62**(1): 1-96.
- Klett E.L., Lee M.H., Adams D.B., Chavin K.D. y Patel S.B. (2004). "Localization of abcg5 and abcg8 proteins in human liver, gall bladder and intestine." *BMC Gastroenterol* 4: 21.
- Kobayashi N., Nishino K. y Yamaguchi A. (2001). "Novel macrolide-specific abc-type efflux transporter in escherichia coli." *J Bacteriol* **183**(19): 5639-5644.

- Kolwankar D., Glover D.D., Ware J.A. y Tracy T.S. (2005). "Expression and function of abcb1 and abcg2 in human placental tissue." *Drug Metab Dispos* 33(4): 524-529.
- Kondo C., Suzuki H., Itoda M., Ozawa S., Sawada J., Kobayashi D., Ieiri I., Mine K., Ohtsubo K. y Sugiyama Y. (2004). "Functional analysis of snps variants of bcrp/abcg2." *Pharm Res* 21(10): 1895-1903.
- Krishnamurthy P., Ross D.D., Nakanishi T., Bailey-Dell K., Zhou S., Mercer K.E., Sarkadi B., Sorrentino B.P. y Schuetz J.D. (2004). "The stem cell marker bcrp/abcg2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme." J Biol Chem 279(23): 24218-24225.
- Krishnamurthy P. y Schuetz J.D. (2006). "Role of abcg2/bcrp in biology and medicine." Annu Rev Pharmacol Toxicol 46: 381-410.
- Kroemer S., Galland D., Guerin-Faublee V., Giboin H. y Woehrle-Fontaine F. (2012). "Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in europe." *Vet Rec* **170**(2): 53.
- **Kuo M.T.** (2009). "Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* **11**(1): 99-133.
- Lagas J.S., van Waterschoot R.A., Sparidans R.W., Wagenaar E., Beijnen J.H. y Schinkel A.H. (2010). "Breast cancer resistance protein and p-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation." *Mol Cancer Ther* 9(2): 319-326.
- Lamp K.C., Bailey E.M. y Rybak M.J. (1992). "Ofloxacin clinical pharmacokinetics." *Clin Pharmacokinet* 22(1): 32-46.
- Lankas G.R., Cartwright M.E. y Umbenhauer D. (1997). "P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of cf-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity." *Toxicol Appl Pharmacol* 143(2): 357-365.
- Lascelles B.D., Court M.H., Hardie E.M. y Robertson S.A. (2007). "Nonsteroidal antiinflammatory drugs in cats: A review." *Vet Anaesth Analg* 34(4): 228-250.
- Lavergne S.N., Danhof R.S., Volkman E.M. y Trepanier L.A. (2006). "Association of drugserum protein adducts and anti-drug antibodies in dogs with sulphonamide hypersensitivity: A naturally occurring model of idiosyncratic drug toxicity." *Clin Exp Allergy* 36(7): 907-915.
- Lee W.D., Flynn A.N., LeBlanc J.M., Merrill J.K., Dick P., Morck D.W. y Buret A.G. (2004). "Tilmicosin-induced bovine neutrophil apoptosis is cell-specific and downregulates spontaneous ltb4 synthesis without increasing fas expression." *Vet Res* **35**(2): 213-224.
- Leslie E.M., Ito K., Upadhyaya P., Hecht S.S., Deeley R.G. y Cole S.P. (2001). "Transport of the beta -o-glucuronide conjugate of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (nnal) by the multidrug resistance protein 1 (mrp1). Requirement for glutathione or a non-sulfur-containing analog." *J Biol Chem* **276**(30): 27846-27854.

- Leslie E.M., Deeley R.G. y Cole S.P. (2005). "Multidrug resistance proteins: Role of pglycoprotein, mrp1, mrp2, and bcrp (abcg2) in tissue defense." *Toxicol Appl Pharmacol* 204(3): 216-237.
- Lespine A., Dupuy J., Orlowski S., Nagy T., Glavinas H., Krajcsi P. y Alvinerie M. (2006). "Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (mrp1, 2 and 3)." *Chem Biol Interact* 159(3): 169-179.
- Lespine A., Martin S., Dupuy J., Roulet A., Pineau T., Orlowski S. y Alvinerie M. (2007). "Interaction of macrocyclic lactones with p-glycoprotein: Structure-affinity relationship." *Eur J Pharm Sci* **30**(1): 84-94.
- Li J., Cusatis G., Brahmer J., Sparreboom A., Robey R.W., Bates S.E., Hidalgo M. y Baker S.D. (2007). "Association of variant abcg2 and the pharmacokinetics of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer patients." *Cancer Biol Ther* **6**(3): 432-438.
- Li H., Jin H.E., Kim W., Han Y.H., Kim D.D., Chung S.J. y Shim C.K. (2008a). "Involvement of p-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in caco-2 and mdckii cells." *Pharm Res* 25(11): 2601-2612.
- Li M., Yuan H., Li N., Song G., Zheng Y., Baratta M., Hua F., Thurston A., Wang J. y Lai Y. (2008b). "Identification of interspecies difference in efflux transporters of hepatocytes from dog, rat, monkey and human." *Eur J Pharm Sci* **35**(1-2): 114-126.
- Lifschitz A., Ballent M. y Lanusse C. (2012). "Macrocyclic lactones and cellular transportrelated drug interactions: A perspective from in vitro assays to nematode control in the field." *Curr Pharm Biotechnol* **13**(6): 912-923.
- Lovell R.A. (1990). "Ivermectin and piperazine toxicoses in dogs and cats." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **20**(2): 453-468.
- Main B.W., Means J.R., Rinkema L.E., Smith W.C. y Sarazan R.D. (1996). "Cardiovascular effects of the macrolide antibiotic tilmicosin, administered alone and in combination with propranolol or dobutamine, in conscious unrestrained dogs." *J Vet Pharmacol Ther* **19**(3): 225-232.
- Maliepaard M., Scheffer G.L., Faneyte I.F., van Gastelen M.A., Pijnenborg A.C., Schinkel A.H., van De Vijver M.J., Scheper R.J. y Schellens J.H. (2001). "Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues." *Cancer Res* 61(8): 3458-3464.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A. y Remesy C. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." Am J Clin Nutr 81(1 Suppl): 230S-242S.

- Manautou J.E., de Waart D.R., Kunne C., Zelcer N., Goedken M., Borst P. y Elferink R.O. (2005). "Altered disposition of acetaminophen in mice with a disruption of the mrp3 gene." *Hepatology* 42(5): 1091-1098.
- Mao Q., Conseil G., Gupta A., Cole S.P. y Unadkat J.D. (2004). "Functional expression of the human breast cancer resistance protein in pichia pastoris." *Biochem Biophys Res Commun* 320(3): 730-737.
- Marazuela M.D. y Moreno-Bondi M.C. (2004). "Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection." *J Chromatogr A* **1034**(1-2): 25-32.
- Marin P., Escudero E., Fernandez-Varon E. y Carceles C.M. (2007). "Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administration to lactating goats." *J Dairy Sci* **90**(9): 4219-4225.
- Marin P., Escudero E., Fernandez-Varon E., Ramirez M.J. y Carceles C.M. (2010). "Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after a long-acting formulation for subcutaneous administration to lactating goats." J Dairy Sci 93(7): 3056-3064.
- Marques M.M., Thomson A.J., McCreath K.J. y McWhir J. (2006). "Conventional gene targeting protocols lead to loss of targeted cells when applied to a silent gene locus in primary fibroblasts." *J Biotechnol* **125**(2): 185-193.
- Martinez M., McDermott P. y Walker R. (2006). "Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals." *Vet J* **172**(1): 10-28.
- Materna V., Stege A., Surowiak P., Priebsch A. y Lage H. (2006). "Rna interferencetriggered reversal of abcc2-dependent cisplatin resistance in human cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 348(1): 153-157.
- Mathew G., Timm E.A., Jr., Sotomayor P., Godoy A., Montecinos V.P., Smith G.J. y Huss
 W.J. (2009). "Abcg2-mediated dyecycle violet efflux defined side population in benign and malignant prostate." *Cell Cycle* 8(7): 1053-1061.
- Matsuo H., Takada T., Ichida K., Nakamura T., Nakayama A., Suzuki H., Hosoya T. y Shinomiya N. (2011). "Abcg2/bcrp dysfunction as a major cause of gout." *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 30(12): 1117-1128.
- Matsushima S., Maeda K., Kondo C., Hirano M., Sasaki M., Suzuki H. y Sugiyama Y. (2005). "Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using doubletransfected madin-darby canine kidney ii cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1b1 (oatp1b1)/multidrug resistance-associated protein 2, oatp1b1/multidrug resistance 1, and oatp1b1/breast cancer resistance protein." *J Pharmacol Exp Ther* **314**(3): 1059-1067.
- McDevitt C.A., Collins R.F., Conway M., Modok S., Storm J., Kerr I.D., Ford R.C. y Callaghan R. (2006). "Purification and 3d structural analysis of oligomeric human multidrug transporter abcg2." *Structure* 14(11): 1623-1632.

- McKellar Q.A., Gibson I.F. y McCormack R.Z. (1998). "Pharmacokinetics and tissue disposition of danofloxacin in sheep." *Biopharm Drug Dispos* **19**(2): 123-129.
- Mealey K.L., Bentjen S.A., Gay J.M. y Cantor G.H. (2001). "Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene." *Pharmacogenetics* **11**(8): 727-733.
- **Mealey K.L.** (2011). "Abcg2 transporter: Therapeutic and physiologic implications in veterinary species." *J Vet Pharmacol Ther*.
- Merino G., Jonker J.W., Wagenaar E., Pulido M.M., Molina A.J., Alvarez A.I. y Schinkel A.H. (2005a). "Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2)." *Drug Metab Dispos* 33(5): 614-618.
- Merino G., Jonker J.W., Wagenaar E., van Herwaarden A.E. y Schinkel A.H. (2005b). "The breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin." *Mol Pharmacol* **67**(5): 1758-1764.
- Merino G., van Herwaarden A.E., Wagenaar E., Jonker J.W. y Schinkel A.H. (2005c). "Sex-dependent expression and activity of the atp-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) in liver." *Mol Pharmacol* **67**(5): 1765-1771.
- Merino G., Alvarez A.I., Pulido M.M., Molina A.J., Schinkel A.H. y Prieto J.G. (2006). "Breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion." *Drug Metab Dispos* 34(4): 690-695.
- Merino G., Real R., Baro M.F., Gonzalez-Lobato L., Prieto J.G., Alvarez A.I. y Marques M.M. (2009). "Natural allelic variants of bovine atp-binding cassette transporter abcg2: Increased activity of the ser581 variant and development of tools for the discovery of new abcg2 inhibitors." *Drug Metab Dispos* 37(1): 5-9.
- Merino G., Perez M., Real R., Egido E., Prieto J.G. y Alvarez A.I. (2010). "In vivo inhibition of bcrp/abcg2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: A comparative study in bcrp1 (-/-) mice." *Pharm Res* 27(10): 2098-2105.
- Meyer zu Schwabedissen H.E. y Kroemer H.K. (2011). "In vitro and in vivo evidence for the importance of breast cancer resistance protein transporters (bcrp/mxr/abcp/abcg2)." *Handb Exp Pharmacol*(201): 325-371.
- Mickley L., Jain P., Miyake K., Schriml L.M., Rao K., Fojo T., Bates S. y Dean M. (2001). "An atp-binding cassette gene (abcg3) closely related to the multidrug transporter abcg2 (mxr/abcp) has an unusual atp-binding domain." *Mamm Genome* **12**(1): 86-88.
- Michiels F., van der Kammen R.A., Janssen L., Nolan G. y Collard J.G. (2000). "Expression of rho gtpases using retroviral vectors." *Methods Enzymol* **325**: 295-302.

- Mikasa K., Sawaki M., Kita E., Hamada K., Teramoto S., Sakamoto M., Maeda K., Konishi M. y Narita N. (1997). "Significant survival benefit to patients with advanced nonsmall-cell lung cancer from treatment with clarithromycin." *Chemotherapy* 43(4): 288-296.
- Minamida K., Ota K., Nishimukai M., Tanaka M., Abe A., Sone T., Tomita F., Hara H. y Asano K. (2008). "Asaccharobacter celatus gen. Nov., sp. Nov., isolated from rat caecum." *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 5): 1238-1240.
- Minderman H., O'Loughlin K.L., Pendyala L. y Baer M.R. (2004). "Vx-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing p-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein." *Clin Cancer Res* 10(5): 1826-1834.
- Mitomo H., Kato R., Ito A., Kasamatsu S., Ikegami Y., Kii I., Kudo A., Kobatake E., Sumino Y. y Ishikawa T. (2003). "A functional study on polymorphism of the atp-binding cassette transporter abcg2: Critical role of arginine-482 in methotrexate transport." *Biochem* J 373(Pt 3): 767-774.
- Miwa M., Tsukahara S., Ishikawa E., Asada S., Imai Y. y Sugimoto Y. (2003). "Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (bcrp) alter cross resistance patterns in transfectants." *Int J Cancer* 107(5): 757-763.
- Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., Brangi M., Greenberger L., Dean M., Fojo T. y Bates S.E. (1999). "Molecular cloning of cdnas which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to abc transport genes." *Cancer Res* 59(1): 8-13.
- Mizuno N., Suzuki M., Kusuhara H., Suzuki H., Takeuchi K., Niwa T., Jonker J.W. y Sugiyama Y. (2004). "Impaired renal excretion of 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (e3040) sulfate in breast cancer resistance protein (bcrp1/abcg2) knockout mice." *Drug Metab Dispos* 32(9): 898-901.
- Molento M.B. y Prichard R.K. (1999). "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* **85**(12): 1007-1011.
- Moore G.M., Mowrey D.H., Tonkinson L.V., Lechtenberg K.F. y Schneider J.H. (1996). "Efficacy dose determination study of tilmicosin phosphate in feed for control of pneumonia caused by actinobacillus pleuropneumoniae in swine." *Am J Vet Res* **57**(2): 220-223.
- Morck D.W., Merrill J.K., Gard M.S., Olson M.E. y Nation P.N. (1997). "Treatment of experimentally induced pneumonic pasteurellosis of young calves with tilmicosin." *Can J Vet Res* 61(3): 187-192.
- Morris M.E. y Zhang S. (2006). "Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on abc transporters." *Life Sci* 78(18): 2116-2130.

- **Mosmann T.** (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Moussatova A., Kandt C., O'Mara M.L. y Tieleman D.P. (2008). "Atp-binding cassette transporters in escherichia coli." *Biochim Biophys Acta* **1778**(9): 1757-1771.
- Myllynen P., Kummu M., Kangas T., Ilves M., Immonen E., Rysa J., Pirila R., Lastumaki A. y Vahakangas K.H. (2008). "Abcg2/bcrp decreases the transfer of a food-born chemical carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (phip) in perfused term human placenta." *Toxicol Appl Pharmacol* 232(2): 210-217.
- Naisbitt D.J., Hough S.J., Gill H.J., Pirmohamed M., Kitteringham N.R. y Park B.K. (1999). "Cellular disposition of sulphamethoxazole and its metabolites: Implications for hypersensitivity." *Br J Pharmacol* **126**(6): 1393-1407.
- Nakamura S., Nakamura M., Kojima T. y Yoshida H. (1989). "Gyra and gyrb mutations in quinolone-resistant strains of escherichia coli." *Antimicrob Agents Chemother* 33(2): 254-255.
- Nakamura S. (1995). "Veterinary use of new quinolones in japan." Drugs 49 Suppl 2: 152-158.
- Nakanishi T., Doyle L.A., Hassel B., Wei Y., Bauer K.S., Wu S., Pumplin D.W., Fang H.B. y Ross D.D. (2003). "Functional characterization of human breast cancer resistance protein (bcrp, abcg2) expressed in the oocytes of xenopus laevis." *Mol Pharmacol* 64(6): 1452-1462.
- Naruhashi K., Tamai I., Inoue N., Muraoka H., Sai Y., Suzuki N. y Tsuji A. (2002). "Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 in intestinal secretion of grepafloxacin in rats." *Antimicrob Agents Chemother* 46(2): 344-349.
- Neu H.C. (1991). "Synergy and antagonism of combinations with quinolones." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10(4): 255-261.
- Ni Z., Bikadi Z., Rosenberg M.F. y Mao Q. (2010a). "Structure and function of the human breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2)." *Curr Drug Metab* **11**(7): 603-617.
- Ni Z., Mark M.E., Cai X. y Mao Q. (2010b). "Fluorescence resonance energy transfer (fret) analysis demonstrates dimer/oligomer formation of the human breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) in intact cells." *Int J Biochem Mol Biol* **1**(1): 1-11.
- Nies A.T., Jedlitschky G., Konig J., Herold-Mende C., Steiner H.H., Schmitt H.P. y Keppler D. (2004). "Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, mrp1-mrp6 (abcc1-abcc6), in human brain." *Neuroscience* 129(2): 349-360.
- Nishiyama M. y Kuga T. (1989). "Central effects of the neurotropic mycotoxin fumitremorgin a in the rabbit (i). Effects on the spinal cord." *Jpn J Pharmacol* **50**(2): 167-173.
- Noguchi K., Kawahara H., Kaji A., Katayama K., Mitsuhashi J. y Sugimoto Y. (2009). "Substrate-dependent bidirectional modulation of p-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib." *Cancer Sci* 100(9): 1701-1707.

- Nolan G.P. y Shatzman A.R. (1998). "Expression vectors and delivery systems." Curr Opin Biotechnol 9(5): 447-450.
- Nozaki Y., Kusuhara H., Kondo T., Iwaki M., Shiroyanagi Y., Nakayama H., Horita S., Nakazawa H., Okano T. y Sugiyama Y. (2007). "Species difference in the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of methotrexate by human kidney slices." J Pharmacol Exp Ther 322(3): 1162-1170.
- **Olchowy T.W., TerHune T.N. y Herrick R.L.** (2000). "Efficacy of difloxacin in calves experimentally infected with mannheimia haemolytica." *Am J Vet Res* **61**(6): 710-713.
- Olsen H.G., Nilsen H., Hayes B., Berg P.R., Svendsen M., Lien S. y Meuwissen T. (2007). "Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the abcg2 gene affecting milk composition of dairy cattle." *BMC Genet* 8: 32.
- **Omura S. y Crump A.** (2004). "The life and times of ivermectin a success story." *Nat Rev Microbiol* **2**(12): 984-989.
- **Oostendorp R.L., Beijnen J.H. y Schellens J.H.** (2009a). "The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier." *Cancer Treat Rev* **35**(2): 137-147.
- **Oostendorp R.L., Buckle T., Beijnen J.H., van Tellingen O. y Schellens J.H.** (2009b). "The effect of p-gp (mdr1a/1b), bcrp (bcrp1) and p-gp/bcrp inhibitors on the in vivo absorption, distribution, metabolism and excretion of imatinib." *Invest New Drugs* **27**(1): 31-40.
- Ozvegy C., Litman T., Szakacs G., Nagy Z., Bates S., Varadi A. y Sarkadi B. (2001). "Functional characterization of the human multidrug transporter, abcg2, expressed in insect cells." *Biochem Biophys Res Commun* **285**(1): 111-117.
- Pachot J.I., Botham R.P., Haegele K.D. y Hwang K. (2003). "Experimental estimation of the role of p-glycoprotein in the pharmacokinetic behaviour of telithromycin, a novel ketolide, in comparison with roxithromycin and other macrolides using the caco-2 cell model." *J Pharm Pharm Sci* 6(1): 1-12.
- Paradis M., Abbey L., Baker B., Coyne M., Hannigan M., Joffe D., Pukay B., Trettien A., Waisglass S. y Wellington J. (2001). "Evaluation of the clinical efficacy of marbofloxacin (zeniquin) tablets for the treatment of canine pyoderma: An open clinical trial." Vet Dermatol 12(3): 163-169.
- Paturi D.K., Kwatra D., Ananthula H.K., Pal D. y Mitra A.K. (2010). "Identification and functional characterization of breast cancer resistance protein in human bronchial epithelial cells (calu-3)." *Int J Pharm* 384(1-2): 32-38.
- Pavek P., Merino G., Wagenaar E., Bolscher E., Novotna M., Jonker J.W. y Schinkel A.H. (2005). "Human breast cancer resistance protein: Interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine." J Pharmacol Exp Ther 312(1): 144-152.

- Peer M., Csaszar E., Vorlaufer E., Kopp S. y Chiba P. (2005). "Photoaffinity labeling of pglycoprotein." *Mini Rev Med Chem* 5(2): 165-172.
- **Peeters T.L.** (1993). "Erythromycin and other macrolides as prokinetic agents." *Gastroenterology* **105**(6): 1886-1899.
- Perez M., Blazquez A.G., Real R., Mendoza G., Prieto J.G., Merino G. y Alvarez A.I. (2009a). "In vitro and in vivo interaction of moxidectin with bcrp/abcg2." *Chem Biol Interact* 180(1): 106-112.
- Perez M., Real R., Mendoza G., Merino G., Prieto J.G. y Alvarez A.I. (2009b). "Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific bcrp/abcg2 substrate, in assaf sheep: Modulation by isoflavones." J Vet Pharmacol Ther 32(5): 498-502.
- Polgar O., Robey R.W., Morisaki K., Dean M., Michejda C., Sauna Z.E., Ambudkar S.V., Tarasova N. y Bates S.E. (2004). "Mutational analysis of abcg2: Role of the gxxxg motif." *Biochemistry* 43(29): 9448-9456.
- **Polgar O., Robey R.W. y Bates S.E.** (2008). "Abcg2: Structure, function and role in drug response." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**(1): 1-15.
- Poller B., Iusuf D., Sparidans R.W., Wagenaar E., Beijnen J.H. y Schinkel A.H. (2011). "Differential impact of p-glycoprotein (abcb1) and breast cancer resistance protein (abcg2) on axitinib brain accumulation and oral plasma pharmacokinetics." *Drug Metab Dispos* 39(5): 729-735.
- **Pollex E., Lubetsky A. y Koren G.** (2008). "The role of placental breast cancer resistance protein in the efflux of glyburide across the human placenta." *Placenta* **29**(8): 743-747.
- **Poole K.** (2000). "Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(9): 2233-2241.
- Poutrel B., Stegemann M.R., Roy O., Pothier F., Tilt N. y Payne-Johnson M. (2008). "Evaluation of the efficacy of systemic danofloxacin in the treatment of induced acute escherichia coli bovine mastitis." *J Dairy Res* 75(3): 310-318.
- Pozza A., Perez-Victoria J.M., Sardo A., Ahmed-Belkacem A. y Di Pietro A. (2006). "Purification of breast cancer resistance protein abcg2 and role of arginine-482." *Cell Mol Life Sci* 63(16): 1912-1922.
- Pozza A., Perez-Victoria J.M. y Di Pietro A. (2009). "Overexpression of homogeneous and active abcg2 in insect cells." *Protein Expr Purif* 63(2): 75-83.
- Prichard R.K. y Roulet A. (2007). "Abc transporters and beta-tubulin in macrocyclic lactone resistance: Prospects for marker development." *Parasitology* 134(Pt 8): 1123-1132.
- Pulido M.M., Molina A.J., Merino G., Mendoza G., Prieto J.G. y Alvarez A.I. (2006). "Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2): Influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep." *J Vet Pharmacol Ther* 29(4): 279-287.

- **Rabindran S.K., Ross D.D., Doyle L.A., Yang W. y Greenberger L.M.** (2000). "Fumitremorgin c reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein." *Cancer Res* **60**(1): 47-50.
- Rajendra R., Gounder M.K., Saleem A., Schellens J.H., Ross D.D., Bates S.E., Sinko P. y Rubin E.H. (2003). "Differential effects of the breast cancer resistance protein on the cellular accumulation and cytotoxicity of 9-aminocamptothecin and 9-nitrocamptothecin." *Cancer Res* 63(12): 3228-3233.
- Ramirez C.J., Minch J.D., Gay J.M., Lahmers S.M., Guerra D.J., Haldorson G.J., Schneider T. y Mealey K.L. (2011). "Molecular genetic basis for fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats." *Pharmacogenet Genomics* 21(2): 66-75.
- Real R., Egido E., Perez M., Gonzalez-Lobato L., Barrera B., Prieto J.G., Alvarez A.I. y Merino G. (2011a). "Involvement of breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) in the secretion of danofloxacin into milk: Interaction with ivermectin." *J Vet Pharmacol Ther* 34(4): 313-321.
- Real R., Gonzalez-Lobato L., Baro M.F., Valbuena S., de la Fuente A., Prieto J.G., Alvarez A.I., Marques M.M. y Merino G. (2011b). "Analysis of the effect of the bovine adenosine triphosphate-binding cassette transporter g2 single nucleotide polymorphism y581s on transcellular transport of veterinary drugs using new cell culture models." J Anim Sci 89(12): 4325-4338.
- Rivers F., O'Brien T.J. y Callaghan R. (2008). "Exploring the possible interaction between anti-epilepsy drugs and multidrug efflux pumps; in vitro observations." *Eur J Pharmacol* 598(1-3): 1-8.
- Robey R.W., Steadman K., Polgar O., Morisaki K., Blayney M., Mistry P. y Bates S.E. (2004). "Pheophorbide a is a specific probe for abcg2 function and inhibition." *Cancer Res* 64(4): 1242-1246.
- Robey R.W., To K.K., Polgar O., Dohse M., Fetsch P., Dean M. y Bates S.E. (2009). "Abcg2: A perspective." *Adv Drug Deliv Rev* 61(1): 3-13.
- Ron M., Cohen-Zinder M., Peter C., Weller J.I. y Erhardt G. (2006). "Short communication: A polymorphism in abcg2 in bos indicus and bos taurus cattle breeds." J Dairy Sci 89(12): 4921-4923.
- Rosenberg M.F., Bikadi Z., Chan J., Liu X., Ni Z., Cai X., Ford R.C. y Mao Q. (2010). "The human breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) shows conformational changes with mitoxantrone." *Structure* 18(4): 482-493.
- Rougier S., Borell D., Pheulpin S., Woehrle F. y Boisrame B. (2005). "A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa." *Vet Dermatol* **16**(5): 299-307.

- Roulet A., Puel O., Gesta S., Lepage J.F., Drag M., Soll M., Alvinerie M. y Pineau T. (2003). "Mdr1-deficient genotype in collie dogs hypersensitive to the p-glycoprotein substrate ivermectin." *Eur J Pharmacol* **460**(2-3): 85-91.
- **Russel F.G., Koenderink J.B. y Masereeuw R.** (2008). "Multidrug resistance protein 4 (mrp4/abcc4): A versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules." *Trends Pharmacol Sci* **29**(4): 200-207.
- Saison C., Helias V., Ballif B.A., Peyrard T., Puy H., Miyazaki T., Perrot S., Vayssier-Taussat M., Waldner M., Le Pennec P.Y., Cartron J.P. y Arnaud L. (2012). "Null alleles of abcg2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system junior." *Nat Genet* 44(2): 174-177.
- Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Sanford S.E., Rehmtulla A.J. y Josephson G.K. (1988). "Ivermectin overdose and toxicosis in neonatal pigs." Can Vet J 29(9): 735-736.
- Sarkadi B., Homolya L., Szakacs G. y Varadi A. (2006). "Human multidrug resistance abcb and abcg transporters: Participation in a chemoimmunity defense system." *Physiol Rev* 86(4): 1179-1236.
- Scorneaux B. y Shryock T.R. (1999). "Intracellular accumulation, subcellular distribution, and efflux of tilmicosin in bovine mammary, blood, and lung cells." *J Dairy Sci* 82(6): 1202-1212.
- Scott D.W., Peters J. y Miller W.H., Jr. (2006). "Efficacy of orbifloxacin tablets for the treatment of superficial and deep pyoderma due to staphylococcus intermedius infection in dogs." *Can Vet J* 47(10): 999-1002.
- Scharenberg C.W., Harkey M.A. y Torok-Storb B. (2002). "The abcg2 transporter is an efficient hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors." *Blood* **99**(2): 507-512.
- Schinkel A.H., Smit J.J., van Tellingen O., Beijnen J.H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C.A., van der Valk M.A., Robanus-Maandag E.C., te Riele H.P. y et al. (1994). "Disruption of the mouse mdr1a p-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." *Cell* 77(4): 491-502.
- Schinkel A.H. y Jonker J.W. (2003). "Mammalian drug efflux transporters of the atp binding cassette (abc) family: An overview." *Adv Drug Deliv Rev* **55**(1): 3-29.
- Schrickx J.A. y Fink-Gremmels J. (2007). "Danofloxacin-mesylate is a substrate for atpdependent efflux transporters." Br J Pharmacol 150(4): 463-469.
- Schuetz J.D., Connelly M.C., Sun D., Paibir S.G., Flynn P.M., Srinivas R.V., Kumar A. y Fridland A. (1999). "Mrp4: A previously unidentified factor in resistance to nucleosidebased antiviral drugs." *Nat Med* 5(9): 1048-1051.

- Sesink A.L., Arts I.C., de Boer V.C., Breedveld P., Schellens J.H., Hollman P.C. y Russel F.G. (2005). "Breast cancer resistance protein (bcrp1/abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides." *Mol Pharmacol* 67(6): 1999-2006.
- Setchell K.D., Brown N.M. y Lydeking-Olsen E. (2002). "The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones." J Nutr 132(12): 3577-3584.
- Setchell K.D., Clerici C., Lephart E.D., Cole S.J., Heenan C., Castellani D., Wolfe B.E., Nechemias-Zimmer L., Brown N.M., Lund T.D., Handa R.J. y Heubi J.E. (2005). "Sequol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora." Am J Clin Nutr 81(5): 1072-1079.
- Shem-Tov M., Ziv G., Glickman A. y Saran A. (1997). "Pharmacokinetics and penetration of marbofloxacin from blood into the milk of cows and ewes." *Zentralbl Veterinarmed A* 44(9-10): 511-519.
- Shoop W.L., Mrozik H. y Fisher M.H. (1995). "Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health." *Vet Parasitol* **59**(2): 139-156.
- Shukla S., Zaher H., Hartz A., Bauer B., Ware J.A. y Ambudkar S.V. (2009). "Curcumin inhibits the activity of abcg2/bcrp1, a multidrug resistance-linked abc drug transporter in mice." *Pharm Res* 26(2): 480-487.
- Solazzo M., Fantappie O., D'Amico M., Sassoli C., Tani A., Cipriani G., Bogani C., Formigli L. y Mazzanti R. (2009). "Mitochondrial expression and functional activity of breast cancer resistance protein in different multiple drug-resistant cell lines." *Cancer Res* 69(18): 7235-7242.
- Sparreboom A., Loos W.J., Burger H., Sissung T.M., Verweij J., Figg W.D., Nooter K. y Gelderblom H. (2005). "Effect of abcg2 genotype on the oral bioavailability of topotecan." *Cancer Biol Ther* 4(6): 650-658.
- Staud F. y Pavek P. (2005). "Breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2)." Int J Biochem Cell Biol 37(4): 720-725.
- Stefkova J., Poledne R. y Hubacek J.A. (2004). "Atp-binding cassette (abc) transporters in human metabolism and diseases." *Physiol Res* **53**(3): 235-243.
- Storch C.H., Ehehalt R., Haefeli W.E. y Weiss J. (2007). "Localization of the human breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro." J Pharmacol Exp Ther 323(1): 257-264.
- Sugie M., Asakura E., Zhao Y.L., Torita S., Nadai M., Baba K., Kitaichi K., Takagi K. y Hasegawa T. (2004). "Possible involvement of the drug transporters p glycoprotein and multidrug resistance-associated protein mrp2 in disposition of azithromycin." *Antimicrob Agents Chemother* 48(3): 809-814.

- **Susanto M. y Benet L.Z.** (2002). "Can the enhanced renal clearance of antibiotics in cystic fibrosis patients be explained by p-glycoprotein transport?" *Pharm Res* **19**(4): 457-462.
- Susanto J., Lin Y.H., Chen Y.N., Shen C.R., Yan Y.T., Tsai S.T., Chen C.H. y Shen C.N. (2008). "Porphyrin homeostasis maintained by abcg2 regulates self-renewal of embryonic stem cells." *PLoS One* 3(12): e4023.
- Takabe K., Kim R.H., Allegood J.C., Mitra P., Ramachandran S., Nagahashi M., Harikumar K.B., Hait N.C., Milstien S. y Spiegel S. (2010). "Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via abcc1 and abcg2." J Biol Chem 285(14): 10477-10486.
- Takenaka K., Morgan J.A., Scheffer G.L., Adachi M., Stewart C.F., Sun D., Leggas M., Ejendal K.F., Hrycyna C.A. y Schuetz J.D. (2007). "Substrate overlap between mrp4 and abcg2/bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution." *Cancer Res* 67(14): 6965-6972.
- Tamura A., Watanabe M., Saito H., Nakagawa H., Kamachi T., Okura I. y Ishikawa T. (2006). "Functional validation of the genetic polymorphisms of human atp-binding cassette (abc) transporter abcg2: Identification of alleles that are defective in porphyrin transport." *Mol Pharmacol* **70**(1): 287-296.
- Tanaka Y., Slitt A.L., Leazer T.M., Maher J.M. y Klaassen C.D. (2005). "Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) in rats and mice." *Biochem Biophys Res Commun* 326(1): 181-187.
- Tang S.C., Lagas J.S., Lankheet N.A., Poller B., Hillebrand M.J., Rosing H., Beijnen J.H. y Schinkel A.H. (2012). "Brain accumulation of sunitinib is restricted by p-glycoprotein (abcb1) and breast cancer resistance protein (abcg2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration." *Int J Cancer* 130(1): 223-233.
- Taub M.E., Podila L., Ely D. y Almeida I. (2005). "Functional assessment of multiple pglycoprotein (p-gp) probe substrates: Influence of cell line and modulator concentration on p-gp activity." *Drug Metab Dispos* 33(11): 1679-1687.
- **Tiwari A.K., Sodani K., Wang S.R., Kuang Y.H., Ashby C.R., Jr., Chen X. y Chen Z.S.** (2009). "Nilotinib (amn107, tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the abcb1/pgp and abcg2/bcrp/mxr transporters." *Biochem Pharmacol* **78**(2): 153-161.
- **Trailovic S.M. y Nedeljkovic J.T.** (2011). "Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats." *J Vet Med Sci* **73**(5): 591-599.
- **Tukey R.H. y Strassburg C.P.** (2000). "Human udp-glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 581-616.
- Urpi-Sarda M., Morand C., Besson C., Kraft G., Viala D., Scalbert A., Besle J.M. y Manach C. (2008). "Tissue distribution of isoflavones in ewes after consumption of red clover silage." Arch Biochem Biophys 476(2): 205-210.

- Usuda J., Tsunoda Y., Ichinose S., Ishizumi T., Ohtani K., Maehara S., Ono S., Tsutsui H., Ohira T., Okunaka T., Furukawa K., Sugimoto Y., Kato H. y Ikeda N. (2010). "Breast cancer resistant protein (bcrp) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (pdt) for centrally located early lung cancer." *Lung Cancer* 67(2): 198-204.
- Vahakangas K. y Myllynen P. (2009). "Drug transporters in the human blood-placental barrier." *Br J Pharmacol* 158(3): 665-678.
- Valdameri G., Pereira Rangel L., Spatafora C., Guitton J., Gauthier C., Arnaud O., Ferreira-Pereira A., Falson P., Winnischofer S.M., Rocha M.E., Tringali C. y Pietro A.D. (2012). "Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance protein." ACS Chem Biol 7(2): 322-330.
- Van Bambeke F., Michot J.M., Van Eldere J. y Tulkens P.M. (2005). "Quinolones in 2005: An update." *Clin Microbiol Infect* **11**(4): 256-280.
- van den Hoven R., Wagenaar J.A. y Walker R.D. (2000). "In vitro activity of difloxacin against canine bacterial isolates." J Vet Diagn Invest 12(3): 218-223.
- van Herwaarden A.E., Wagenaar E., Karnekamp B., Merino G., Jonker J.W. y Schinkel A.H. (2006). "Breast cancer resistance protein (bcrp1/abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin b1, iq and trp-p-1 but also mediates their secretion into breast milk." *Carcinogenesis* 27(1): 123-130.
- van Herwaarden A.E., Wagenaar E., Merino G., Jonker J.W., Rosing H., Beijnen J.H. y Schinkel A.H. (2007). "Multidrug transporter abcg2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin b2) into milk." *Mol Cell Biol* 27(4): 1247-1253.
- Vander Borght S., Libbrecht L., Katoonizadeh A., van Pelt J., Cassiman D., Nevens F., Van Lommel A., Petersen B.E., Fevery J., Jansen P.L. y Roskams T.A. (2006). "Breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) is expressed by progenitor cells/reactive ductules and hepatocytes and its expression pattern is influenced by disease etiology and species type: Possible functional consequences." J Histochem Cytochem 54(9): 1051-1059.
- Versantvoort C.H., Schuurhuis G.J., Pinedo H.M., Eekman C.A., Kuiper C.M., Lankelma J. y Broxterman H.J. (1993). "Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-p-glycoprotein mediated multidrug resistant tumour cells." *Br J Cancer* 68(5): 939-946.
- Versantvoort C.H., Rhodes T. y Twentyman P.R. (1996). "Acceleration of mrp-associated efflux of rhodamine 123 by genistein and related compounds." *Br J Cancer* 74(12): 1949-1954.
- Vethanayagam R.R., Wang H., Gupta A., Zhang Y., Lewis F., Unadkat J.D. y Mao Q. (2005). "Functional analysis of the human variants of breast cancer resistance protein: I2061, n590y, and d620n." *Drug Metab Dispos* 33(6): 697-705.
- Vila J., Ruiz J., Goni P. y De Anta M.T. (1996). "Detection of mutations in parc in quinoloneresistant clinical isolates of escherichia coli." *Antimicrob Agents Chemother* 40(2): 491-493.

- Vlaming M.L., Lagas J.S. y Schinkel A.H. (2009). "Physiological and pharmacological roles of abcg2 (bcrp): Recent findings in abcg2 knockout mice." Adv Drug Deliv Rev 61(1): 14-25.
- Volk E.L., Rohde K., Rhee M., McGuire J.J., Doyle L.A., Ross D.D. y Schneider E. (2000). "Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant mcf7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux." *Cancer Res* 60(13): 3514-3521.
- Wang X. y Morris M.E. (2007). "Effects of the flavonoid chrysin on nitrofurantoin pharmacokinetics in rats: Potential involvement of abcg2." *Drug Metab Dispos* 35(2): 268-274.
- Wang H., Lee E.W., Cai X., Ni Z., Zhou L. y Mao Q. (2008a). "Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) determined by epitope insertion and immunofluorescence." *Biochemistry* 47(52): 13778-13787.
- Wang H., Lee E.W., Zhou L., Leung P.C., Ross D.D., Unadkat J.D. y Mao Q. (2008b). "Progesterone receptor (pr) isoforms pra and prb differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma bewo cells." *Mol Pharmacol* 73(3): 845-854.
- Wang H., Unadkat J.D. y Mao Q. (2008c). "Hormonal regulation of bcrp expression in human placental bewo cells." *Pharm Res* 25(2): 444-452.
- Wesolowska O., Wisniewski J., Sroda K., Krawczenko A., Bielawska-Pohl A., Paprocka M., Dus D. y Michalak K. (2010). "8-prenylnaringenin is an inhibitor of multidrug resistance-associated transporters, p-glycoprotein and mrp1." *Eur J Pharmacol* 644(1-3): 32-40.
- Wielinga P., Hooijberg J.H., Gunnarsdottir S., Kathmann I., Reid G., Zelcer N., van der Born K., de Haas M., van der Heijden I., Kaspers G., Wijnholds J., Jansen G., Peters G. y Borst P. (2005). "The human multidrug resistance protein mrp5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates." *Cancer Res* 65(10): 4425-4430.
- Wolf A., Bauer B. y Hartz A.M. (2012). "Abc transporters and the alzheimer's disease enigma." Front Psychiatry 3: 54.
- Wolfson J.S. (1989). "Quinolone antimicrobial agents: Adverse effects and bacterial resistance." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8**(12): 1080-1092.
- Wolstenholme A.J. y Rogers A.T. (2005). "Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics." *Parasitology* **131 Suppl**: S85-95.
- Woodward K.N. (2011). "Toxicity in animals: Target species." Curr Pharm Biotechnol.
- Woodward O.M., Kottgen A. y Kottgen M. (2011). "Abcg transporters and disease." FEBS J 278(18): 3215-3225.

- Wu C.P., Calcagno A.M., Hladky S.B., Ambudkar S.V. y Barrand M.A. (2005). "Modulatory effects of plant phenols on human multidrug-resistance proteins 1, 4 and 5 (abcc1, 4 and 5)." *FEBS J* 272(18): 4725-4740.
- Wu H.J., Luo J., Wu N., Matand K., Zhang L.J., Han X.F. y Yang B.J. (2008). "Cloning, sequence and functional analysis of goat atp-binding cassette transporter g2 (abcg2)." *Mol Biotechnol* 39(1): 21-27.
- Xia C.Q., Liu N., Yang D., Miwa G. y Gan L.S. (2005). "Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in caco-2 cells." *Drug Metab Dispos* 33(5): 637-643.
- Xu M., Molento M., Blackhall W., Ribeiro P., Beech R. y Prichard R. (1998). "Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of p-glycoprotein homolog." *Mol Biochem Parasitol* 91(2): 327-335.
- Xu J., Liu Y., Yang Y., Bates S. y Zhang J.T. (2004). "Characterization of oligomeric human half-abc transporter atp-binding cassette g2." *J Biol Chem* 279(19): 19781-19789.
- Yamaguchi H., Yano I., Hashimoto Y. y Inui K.I. (2000). "Secretory mechanisms of grepafloxacin and levofloxacin in the human intestinal cell line caco-2." *J Pharmacol Exp Ther* 295(1): 360-366.
- Yamaguchi H., Yano I., Saito H. y Inui K. (2004). "Effect of cisplatin-induced acute renal failure on bioavailability and intestinal secretion of quinolone antibacterial drugs in rats." *Pharm Res* 21(2): 330-338.
- Yapar K., Kapt, A., Karapehlivan, M., (2006). "Effects of different doses of tilmicosin on some biochemical parameters and antioxidant status in serum and cardiac tissues in mice." *Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy* 50: 605–608.
- Yas-Natan E., Shamir M., Kleinbart S. y Aroch I. (2003). "Doramectin toxicity in a collie." Vet Rec 153(23): 718-720.
- Yatsunami J., Fukuno Y., Nagata M., Tominaga M., Aoki S., Tsuruta N., Kawashima M., Taniguchi S. y Hayashi S. (1999). "Antiangiogenic and antitumor effects of 14-membered ring macrolides on mouse b16 melanoma cells." *Clin Exp Metastasis* 17(4): 361-367.
- Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M. y Nakamura S. (1990). "Quinolone resistancedetermining region in the DNA gyrase gyra gene of escherichia coli." *Antimicrob Agents Chemother* 34(6): 1271-1272.
- Zaher H., Khan A.A., Palandra J., Brayman T.G., Yu L. y Ware J.A. (2006). "Breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse." *Mol Pharm* **3**(1): 55-61.
- Zamber C.P., Lamba J.K., Yasuda K., Farnum J., Thummel K., Schuetz J.D. y Schuetz
 E.G. (2003). "Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (bcrp) and their relationship to bcrp expression in human intestine." *Pharmacogenetics* 13(1): 19-28.

- Zamek-Gliszczynski M.J., Hoffmaster K.A., Humphreys J.E., Tian X., Nezasa K. y Brouwer K.L. (2006). "Differential involvement of mrp2 (abcc2) and bcrp (abcg2) in biliary excretion of 4-methylumbelliferyl glucuronide and sulfate in the rat." *J Pharmacol Exp Ther* 319(1): 459-467.
- Zechiedrich E.L. y Cozzarelli N.R. (1995). "Roles of topoisomerase iv and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in escherichia coli." *Genes Dev* **9**(22): 2859-2869.
- Zelcer N., van de Wetering K., Hillebrand M., Sarton E., Kuil A., Wielinga P.R., Tephly T., Dahan A., Beijnen J.H. y Borst P. (2005). "Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(20): 7274-7279.
- Zelinski T., Coghlan G., Liu X.Q. y Reid M.E. (2012). "Abcg2 null alleles define the jr(a-) blood group phenotype." *Nat Genet* 44(2): 131-132.
- Zhang S., Yang X. y Morris M.E. (2004). "Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (abcg2)-mediated transport." *Mol Pharmacol* **65**(5): 1208-1216.
- Zhang Y., Gupta A., Wang H., Zhou L., Vethanayagam R.R., Unadkat J.D. y Mao Q. (2005). "Bcrp transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers." *Pharm Res* 22(12): 2023-2034.
- Zhang Y., Wang H., Unadkat J.D. y Mao Q. (2007). "Breast cancer resistance protein 1 limits fetal distribution of nitrofurantoin in the pregnant mouse." *Drug Metab Dispos* 35(12): 2154-2158.
- Zheng L.S., Wang F., Li Y.H., Zhang X., Chen L.M., Liang Y.J., Dai C.L., Yan Y.Y., Tao L.Y., Mi Y.J., Yang A.K., To K.K. y Fu L.W. (2009). "Vandetanib (zactima, zd6474) antagonizes abcc1- and abcg2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function." *PLoS One* 4(4): e5172.
- Zhou S., Morris J.J., Barnes Y., Lan L., Schuetz J.D. y Sorrentino B.P. (2002). "Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19): 12339-12344.
- Zhou L., Naraharisetti S.B., Wang H., Unadkat J.D., Hebert M.F. y Mao Q. (2008). "The breast cancer resistance protein (bcrp1/abcg2) limits fetal distribution of glyburide in the pregnant mouse: An obstetric-fetal pharmacology research unit network and university of washington specialized center of research study." *Mol Pharmacol* 73(3): 949-959.
- Zimmermann C., van de Wetering K., van de Steeg E., Wagenaar E., Vens C. y Schinkel A.H. (2008). "Species-dependent transport and modulation properties of human and mouse multidrug resistance protein 2 (mrp2/mrp2, abcc2/abcc2)." *Drug Metab Dispos* 36(4): 631-640.

10. PUBLICACIONES

Contents lists available at ScienceDirect



European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Molecular and Cellular Pharmacology

Differential inhibition of murine Bcrp1/Abcg2 and human BCRP/ABCG2 by the mycotoxin fumit remorgin ${\rm C}$

Lucía González-Lobato^{a,b}, Rebeca Real^b, Julio G. Prieto^b, Ana I. Álvarez^{a,b}, Gracia Merino^{a,*}

^a INDEGSAL, Campus Vegazana s/n, University of Leon, 24071 Leon, Spain

^b Department of Biomedical Sciences-Physiology, Campus Vegazana s/n, University of León, 24071 Leon, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 20 May 2010 Received in revised form 25 June 2010 Accepted 11 July 2010 Available online 22 July 2010

Keywords: Fumitremorgin C BCRP/ABCG2 Transport Inhibition Cytotoxicity

ABSTRACT

Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2/BCRP) is an ATP-binding cassette transporter expressed in absorptive and excretory organs whose main physiological role is protection of cells against xenobiotics. In addition, ABCG2/BCRP expression has been linked to cellular resistance to anticancer drugs due to the acquisition of a multidrug resistance phenotype. Fumitremorgin C (FTC) is a mycotoxin described as a potent ABCG2/BCRP inhibitor that reverses multidrug resistance. However, little is known about its speciesspecificity. This issue is scientifically relevant since FTC is widely used to evaluate the in vitro role of BCRP. We compared the FTC-mediated inhibition of human BCRP and its murine orthologue, overexpressed in two independent cell lines, MDCKII and MEF3.8 transduced cell lines. Accumulation experiments, using mitoxantrone and chlorine e6 as substrates, revealed that although FTC inhibits both Bcrp1 and BCRP, the human transporter is more potently inhibited, resulting in significantly lower IC₅₀ values. Transcellular transport of known Bcrp1/BCRP substrates, such as nitrofurantoin and mitoxantrone, was completely inhibited by FTC 1 µM in human BCRP-transduced cells but only moderately in murine Bcrp1-transduced cells. Finally, cytotoxicity assays using mitoxantrone and topotecan as substrates revealed that the EC₉₀ values for FTC were always significantly lower in human BCRP-transduced cells. Altogether, these results indicate that human BCRP is more sensitive to inhibition by FTC than murine Bcrp1. This differential inhibition could have a great impact on the use of in vitro models of toxicity and pharmacological interaction for drug discovery and development involving FTC as Bcrp1/BCRP inhibitor.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Efflux transporters of the ATP-binding cassette (ABC) family are present in almost all organisms and have a highly conserved structure suggesting an important role in cellular function. Indeed, they restrict the systemic exposure of their substrates by mediating active excretion of transported substrates via the liver, intestine and kidneys (Sarkadi et al., 2006). Overexpression of ABC transporters has been related to failure in some cancer treatments due to the acquisition of multidrug resistance (MDR) phenotype (Noguchi et al., 2009).

ABCG2/BCRP belongs to this family of transporters and has a major role in the protection of tissue against xenotoxins, being the main factor involved in the presence of residues of drugs and xenotoxins in contaminated milk (Vlaming et al., 2009). There is a wide range of compounds that have been described as BCRP inhibitors including fumitremorgin C and its analogues Ko143 and Ko132 (Allen et al., 2002). BCRP inhibitors may have relevant clinical applications as modulators of the efficacy and toxicity of xenobiotics, including drugs (Noguchi et al., 2009).

Fumitremorgin C (FTC) is a mycotoxin isolated from *Aspergillus fumigatus*. FTC has been described as a potent and selective BCRP inhibitor (Rabindran et al., 2000; Allen et al., 2002). The application of this compound is mostly restricted to *in vitro* experiments because it has been reported to be neurotoxic (Cole and Cox, 1981). However, Garimella et al. (2005) have reported on the plasma pharmacokinetics and tissue distribution of FTC in mice without toxic effects with a dose of 25 mg/kg.

FTC is widely used *in vitro* as a pharmacological tool to evaluate the role of BCRP in MDR and drug disposition assays since it reverses MDR mediated by BCRP and increases cytotoxicity of several anticancer agents *in vitro*. It is commonly used as a positive control in BCRP function assessments (Hauswald et al., 2009; Solazzo et al., 2009; Paturi et al., 2010) including the identification of the side population phenotype in stem cells (Mathew et al., 2009), studies of MDR mediated by BCRP and cytotoxicity assays (Rabindran et al., 2000; Ceckova et al., 2008; Tiwari et al., 2009) and substrate specificity determinations (Takenaka et al., 2007; Susanto et al., 2008). In addition, a correlation between BCRP expression and FTC-inhibitable substrate transport has been established. This inhibition can be

^{*} Corresponding author. Tel.: + 34 987291263; fax: + 34 987291267. *E-mail address:* gmerp@unileon.es (G. Merino).

^{0014-2999/\$ –} see front matter @ 2010 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.ejphar.2010.07.016

detected in cells with low protein expression, and is a useful method to evaluate BCRP expression and function in clinical samples (Robey et al., 2004).

However, there are few studies using this compound to inhibit murine Bcrp1 (Allen et al., 2002) and there is no data on comparative inhibition studies between murine Bcrp1 and human BCRP. Species variations in inhibition properties have implications for *in vitro* models of toxicity and drug interaction.

The objective of the present study was to compare the FTC-mediated inhibition of human BCRP and its murine orthologue (Bcrp1) to obtain information which will be of great value for the design, interpretation and extrapolation of research data obtained using mouse Bcrp1 to the human situation.

2. Methods

2.1. Drugs and chemicals

Mitoxantrone (MXR), topotecan (TPT) and nitrofurantoin (NTF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Chlorine e6 was purchased from Frontier Scientific (Logan, UT). Fumitremorgin C (FTC) was obtained from Bioaustralis (Smithfield, NSW). All the other chemicals were analytical grade and available from commercial sources.

2.2. Cell culture

MDCKII cells (Madin-Darby canine kidney) and MEF3.8 (an adherent spontaneously immortalized embryo fibroblast cell line derived from triple knockout Mdr1a/b⁻/⁻, Mrp1⁻/⁻ mice) and their subclones stably transduced with murine Abcg2 wild-type (Bcrp1) or the human variant (BCRP) were kindly provided by Dr. A. H. Schinkel, Netherlands Cancer Institute (Amsterdam, The Netherlands). Generation and culture conditions from both cellular types have been previously described (Allen et al., 2000; Pavek et al., 2005). They were cultured in DMEM with glutamax (Life Technologies, Inc.) and supplemented with penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), and 10% (v/v) fetal calf serum (Life Technologies, Inc.) at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂. Cells were subcultured every three or four days.

2.3. Accumulation assays

Cells were cultured in 24- well plates in complete medium for 36 h to subconfluence. Cells were washed with PBS and preincubated in Optimem medium (Life Technologies, Inc.) with or without inhibitor for 1 h. Then cells were incubated with the fluorescent substrate mitoxantrone (at 10 µM) (Minderman et al., 2002) or chlorine e6 (at 50 μ M) (Robey et al., 2005) with or without various FTC concentrations (0.1-10 µM) for 1 h. Accumulation of fluorescent substrates was arrested by washing cells with ice-cold PBS. Cells were collected and resuspended in PBS with 2.5% fetal calf serum. Relative cellular accumulation of fluorescent compounds was determined by flow cytometry using a Cyan ADP cytometer. Fluorescence of accumulated substrates of at least 5000 GFP gated-positive cells was quantified using the median of fluorescence (MF). At least three independent experiments were performed. IC₅₀ (concentration of FTC which produces 50% inhibition in drug accumulation) calculation was performed using the fitting software Simfit (Bardsley, 2001) assuming Michaelis-Menten kinetics.

2.4. Transcellular transport assays

Transport assays were performed using MDCKII cells and their subclones. Cells were seeded on microporous polycarbonate membrane filters (12-well plates, 3.0-µm pore size; Transwell 3414; Costar, Corning, NY). Cells were grown for 3 days and medium was replaced

every day. The integrity of the cell monolayers was evaluated by measuring transepithelial electrical resistance (TEER) with a Millicell ohmmeter at the beginning and at the end of the experiments. Cells were considered suitable for use in transport when TEER values were at least 200 Ω cm². Two hours before the start of the experiment, the medium at both sides of the monolayer was replaced with 2 ml of Optimem medium, without serum, either with or without the inhibitor FTC (1 and 5 µM). Transepithelial drug transport was determined by replacing medium with Optimem and the Bcrp1/ BCRP substrate (mitoxantrone 20 μ M or nitrofurantoin 10 μ M; in independent experiments) with and without the inhibitor FTC (1 and 5 μ M). Samples were taken from the drug opposite compartment at 2 and 4 h. Drug concentration was determined by HPLC analysis as described below and presented as the fraction of total drug added at the beginning of the experiment. At least three independent experiments were performed. The apparent permeability coefficient was calculated as follows: $P_{app} = (\Delta Q / \Delta t) \times [1 / (A \times C_0)]$, where $\Delta Q / \Delta t$ is the rate of drug appearing in the receiver chamber, which was obtained from the slope of the regression line on the transport-time profile of drug across MDCK cell monolayers, C₀ being the initial concentration of drug loaded in the donor chamber, and A the cell monolayer surface area (1.12 cm^2) .

2.5. Cytotoxicity and inhibitory potency assays

Cytotoxicity assays were performed as previously described, with modifications (Allen et al., 2002). Briefly, cells were plated at 6,000-10,000/well in 96-well plates 24 h prior to the addition of drugs. A concentration series of drug (mitoxantrone or topotecan) was applied along one plate axis and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Relative cell proliferation was quantified with MTT or CyQuant. MTT assay is one of the most common assays used for the detection of cytotoxicity or cell viability and is based on mitochondrial activity, MTT only being reduced in living cells to dark blue MTT formazan crystals; it was first described and validated in several cellular types by Mosmann (1983) and has been used for cytotoxicity assays involving cells overexpressing BCRP (Rivers et al., 2008; Zheng et al., 2009). CyQuant assay has also been previously described (Allen et al., 2000, 2002) and is based on the measurement of cellular DNA content via fluorescent dye binding which is proportional to cell proliferation. The IC₅₀ values of mitoxantrone and topotecan (drug concentrations that reduce cell viability by 50%) were determined from the sigmoidal curve obtained by plotting % survival cells at various drug concentrations using GraphPad Prism (version 4.00, GraphPad Software, San Diego, CA).

In order to quantify FTC inhibition potency, the EC_{90} was defined as the effective concentration of inhibitor that reduces drug resistance by 90%, and thus renders a cell line 10 times as sensitive to a BCRP substrate drug. EC_{90} values were calculated by modified cytotoxicity assays as described by Allen et al. (2002). Briefly, cells were incubated with a concentration series of FTC in the presence of mitoxantrone or topotecan at 10% of their IC₅₀ concentration, where the IC₅₀ had been determined immediately beforehand. The percentage of survival cells was plotted against the FTC concentrations and the concentration that results in a 50% reduction in cell viability thus reduced the IC₅₀ by 90%.

2.6. HPLC analysis

The conditions for HPLC analysis of nitrofurantoin were based on previously described methods (Gerk et al., 2003), as well as mitoxantrone (Johnson et al., 2003). Samples were not processed and 50 μ l of culture medium was directly injected into the chromatographic system. Separation was performed at 30 °C on a reversed-phase column (Nucleosil 120 C18, 10- μ m particle size, 250 × 4 mm). The system consisted of a Waters 616 pump, a Waters 717plus autosampler, and a UV detector (model Waters 2487). The composition of the mobile phase for nitrofurantoin analysis was 25 mM disodium phosphate buffer pH 3/methanol (78:22). The flow rate was set to 1.5 ml/min and UV absorbance was measured at 366 nm. Mitoxantrone was analyzed using 0.5 M ammonium acetate pH 3/methanol (50:50). The flow rate was set to 1 ml/min and UV absorbance was determined at 245 nm. Peak areas were compared with the standard curve. The integration was performed using the software Millennium32 (Waters, Etten-Leur, The Netherlands).

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis for significant differences was performed using the two tailed Student's *t* test, except when comparing more than two groups, in which case one-way analysis of variance (ANOVA), using the Newman–Keuls test, was performed. A probability of P<0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Intracellular accumulation of mitoxantrone and chlorine e6

In order to characterize FTC-mediated inhibition of murine Bcrp1 and human BCRP, initial accumulation studies were performed in MDCKII and MEF3.8 and their Bcrp1/BCRP-transduced subclones using mitoxantrone and chlorine e6 as Bcrp1/BCRP substrates (Fig. 1). As expected, mitoxantrone and chlorine e6 accumulation was significantly lower in Bcrp1/BCRP-transduced cells (P<0.05), but FTC (10 μ M) did not completely revert the effect on mitoxantrone accumulation in murine Bcrp1-transduced MDCKII cells (Fig. 1). To further characterize this phenomenon, inhibition studies with different FTC concentrations were performed and IC₅₀ values were

Table 1

Inhibition of Bcrp1/BCRP-mediated effect on accumulation of mitoxantrone and chlorine e6 by fumitremorgin C (FTC) in MDCKII and MEF3.8 cells transduced with murine Bcrp1 and human BCRP.

	IC ₅₀ (μ M) mean \pm SEM							
	MDCKII			MEF3.8				
	Bcrp1	BCRP	R	Bcrp1	BCRP	R		
MXR (10 μM) Ce6 (50 μM)	$\begin{array}{c} 8.29 \pm 1.00 \\ 7.17 \pm 0.28 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.04 \pm 1.23^{a} \\ 4.07 \pm 0.28^{a} \end{array}$	7.97 1.76	$\begin{array}{c} 1.02 \pm 0.02 \\ 2.23 \pm 0.29 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.45 \pm 0.07^{a} \\ 0.89 \pm 0.05^{a} \end{array}$	2.27 2.50		

 IC_{50} (concentration of inhibitor which produces 50% inhibition). Three independent experiments were performed. R = ratio Bcrp1/BCRP.

^a Statistically different compared to Bcrp1-transduced subclones (P < 0.05).

calculated (Table 1). Inhibition by FTC was always higher in the human BCRP-transduced cells, as reflected by the significantly lower IC_{50} values in all cases.

3.2. In vitro transcellular transport of nitrofurantoin and mitoxantrone

We used MDCKII and its subclones stably overexpressing murine Bcrp1 or human BCRP to determine differential FTC-mediated inhibition in the *in vitro* Bcrp1/BCRP-mediated transport of nitrofurantoin and mitoxantrone, two well-known BCRP substrates. MDCKII cells were grown to confluent polarized monolayers on porous membrane filters, and vectorial transport of nitrofurantoin (10 μ M) and mitoxantrone (20 μ M) across the monolayers was determined. In the Bcrp1 and BCRP-transduced MDCKII cell lines there was an increase in apically directed translocation and a significant increase in Papp ratios (Figs. 2 and 3, Tables 2 and 3) for both drugs studied. As reported previously for other BCRP substrates (Zhang et al., 2005),



Fig. 1. Percentage of inhibition of FTC on mitoxantrone (MXR) (A, B) and chlorine e6 (Ce6) (C, D) accumulation in MDCKII-Bcrp1 and MDCKII-BCRP (A, C) and MEF3.8-Bcrp1 and MEF3.8-BCRP (B, D). Results are means ± S.D.



Fig. 2. Transepithelial transport of nitrofurantoin (10 μ M) in MDCKII parental cells monolayers and its murine Bcrp1 (M-Bcrp1) and human BCRP (M-BCRP) subclones in the presence and absence of fumitremorgin C (1 μ M). The experiment started with the addition of nitrofurantoin to one compartment (basolateral or apical). After 2 and 4 h, drug concentration was measured in the opposite compartment by HPLC and plotted. Results are means \pm S.D. • Translocation from the basolateral to the apical compartment; \odot translocation from the apical to the basolateral compartment.

when we used FTC 5 μ M as BCRP inhibitor, transport was completely inhibited both in murine Bcrp1 and human BCRP cells so we could not show differential inhibition (data not shown). However, FTC 1 μ M did produce a difference in inhibition between both orthologues. BCRP-mediated transport of nitrofurantoin and mitoxantrone was completely inhibited by FTC 1 μ M only in human BCRPtransduced cells (Figs. 2 and 3). In the case of mitoxantrone, no inhibition at all was seen for murine Bcrp1-mediated transport, as reported by Papp ratios (5.22 \pm 0.24 without FTC versus 5.54 \pm 0.28 with FTC). Papp ratios in experiments with FTC corroborate these results with statistically significant differences compared to parental cells only in murine Bcrp1-transduced cells (Tables 2 and 3) showing no complete inhibition of Bcrp1-mediated transport. In agreement with our accumulation assays, FTC seemed to inhibit human BCRP more efficiently than its murine orthologue.

3.3. Reversal of BCRP-mediated drug resistance: cytotoxicity assays

The effect of FTC on drug accumulation is reflected in its role as reversal agent for Bcrp1/BCRP-mediated drug resistance. We used

MDCKII and MEF3.8 and their subclones to study this phenomenon in cytotoxicity assays. Bcrp1/BCRP-transduced clones had higher IC50 values for mitoxantrone and topotecan than the parental cells (data not shown). As an index of FTC inhibitory potency we determined the EC90 that indicates the concentration of FTC which reverts 90% of drug-mediated resistance, which means the concentration of inhibitor that would make cells ten times more sensitive to the drug. EC₉₀ values for FTC were calculated as previously described by Allen et al. (2002) for reversal of resistance to mitoxantrone and topotecan, and are shown in Fig. 4. EC_{90} values ranged from 11 to 20 μM for murine Bcrp1-transduced cells and from 5 to 12 µM in the case of human BCRP-transduced cells depending on the drug used as substrate and the cell line used (Fig. 4). In all cases, the EC₉₀ was significantly lower in human BCRP-transduced cells compared to murine Bcrp1-transduced cells. The highest difference was found for topotecan in transduced MEF3.8 cells. No significant differences in cell viability between Bcrp1and BCRP-transduced cells were observed in the assays without FTC. As expected, at the EC₉₀ there was approximately a 10-fold reduction of resistance to mitoxantrone and to topotecan in both cell lines as reflected in the new IC₅₀ values obtained (Table 4). No significant effects



Fig. 3. Transepithelial transport of mitoxantrone ($20 \,\mu$ M) in MDCKII parental cell monolayers and its murine Bcrp1 (M-Bcrp1) and human BCRP (M-BCRP) subclones in the presence and absence of fumitremorgin C ($1 \,\mu$ M). The experiment started with the addition of mitoxantrone to one compartment (basolateral or apical). After 2 and 4 h, drug concentration was measured in the opposite compartment by HPLC and plotted. Results are means \pm S.D. \bullet Translocation from the basolateral to the apical compartment; \odot translocation from the apical to the basolateral compartment.

of FTC were seen on drug resistance in the parental cell lines. Moreover, FTC alone did not itself affect cell viability at any of the concentrations assayed. These results agree with those obtained in the accumulation and transport assays where human BCRP seems to be more sensitive to inhibition by FTC than its murine counterpart.

4. Discussion

Knowledge of species differences in the function of BCRP would be helpful to extrapolate *in vitro* models of interaction and toxicity to the human situation. For BCRP inhibition studies, it is essential to systematically compare FTC inhibitory properties for both homologues, murine Bcrp1 and human BCRP, in order to properly design, interpret and extrapolate results to the human situation. For this purpose, a comparative study of the inhibitory effect exerted by the mycotoxin fumitremorgin C on murine and human variant of the BCRP transporter was performed. The interaction between FTC with the human transporter has been extensively reported (Rabindran et al., 2000; Allen et al., 2002), but the potency of FTC inhibition on murine and human variants have never been characterized side by side.

FTC has been described as a potent and specific inhibitor of BCRP with a very slight effect on P-gp and Mrp1 at higher concentrations

Table 2

Permeability	coefficients	P(app)	of	nitrofurantoin	determined	in	both	sides	of	the
MDCKII mon	olayers and it	ts Bcrp1/	BC	RP subclones in	presence an	d al	osence	e of FT	C 1	μМ.

		AP-to-BL	BL-to-AP	Ratio		
	_	$(\times 10^{-6} cm/s)$	$(\times 10^{-6} \text{ cm/s})$	BL-to-AP/AP-to-BL		
Nitrofurantoin	MDCKII M-Bcrp1 M-BCRP	$\begin{array}{c} 4.61 \pm 0.07 \\ 2.12 \pm 0.12 \\ 2.89 \pm 0.08 \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.20 \pm 0.13 \\ 7.82 \pm 0.10 \\ 7.77 \pm 0.32 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.69 \pm 0.02 \\ 3.70 \pm 0.19^{a} \\ 2.69 \pm 0.07^{a} \end{array}$		
Nitrofurantoin + FTC 1 μM	MDCKII M-Bcrp1 M-BCRP	$\begin{array}{c} 5.51 \pm 0.17 \\ 4.07 \pm 0.29 \\ 4.76 \pm 0.56 \end{array}$	$\begin{array}{c} 4.18 \pm 0.37 \\ 5.63 \pm 0.58 \\ 3.63 \pm 0.15 \end{array}$	0.76 ± 0.06 1.38 ± 0.08^{a} 0.77 ± 0.11		

Results are means \pm S.D. Experiments were done in triplicate. ^a Statistically different compared to parental cell line (*P*<0.05).

Table	3
-------	---

Permeability	coefficients	P(app)	of	mitoxantrone	determined	in	both	sides	of	the
MDCKII mone	players and it	s Bcrp1/	BCF	RP subclones in	presence an	d al	osence	e of FT	C 1	μМ.

		AP-to-BL	BL-to-AP	Ratio
	_	$(\times 10^{-6} \text{ cm/s})$	$(\times 10^{-6} \text{ cm/s})$	BL-to-AP/AP-to-BL
Mitoxantrone	MDCKII M-Bcrp1 M-BCRP	$\begin{array}{c} 1.05 \pm 0.03 \\ 1.16 \pm 0.06 \\ 1.10 \pm 0.02 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.64 \pm 0.17 \\ 6.05 \pm 0.11 \\ 6.28 \pm 0.31 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.53 \pm 0.12 \\ 5.22 \pm 0.24^a \\ 5.72 \pm 0.38^a \end{array}$
Mitoxantrone + FTC 1 μM	MDCKII M-Bcrp1 M-BCRP	$\begin{array}{c} 1.27 \pm 0.05 \\ 1.30 \pm 0.12 \\ 1.44 \pm 0.13 \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.61 \pm 0.06 \\ 7.22 \pm 0.27 \\ 4.25 \pm 0.47 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.85 \pm 0.16 \\ 5.54 \pm 0.28^{a} \\ 2.97 \pm 0.50 \end{array}$

Results are means \pm S.D. Experiments were done in triplicate.

^a Statistically different compared to parental cell line (*P*<0.05).

(Allen et al., 2002; Rabindran et al., 2000). Indeed, it is widely used as positive control in BCRP inhibition studies since it reverses MDR mediated by BCRP and increases the cytotoxicity of several compounds *in vitro* (Bram et al., 2009; Usuda et al., 2010). Due to the selectivity of FTC, and despite the fact that MDCKII cells express some levels of endogenous transporters (Taub et al., 2005), no significant interfering effects of other transporters on our experiments would be expected. In any case, for a clearer setup, we also included MEF3.8 cells (Allen et al., 2000), which lack the transport proteins P-gp and Mrp1, in this assay. This enabled us to observe the specific inhibitory action on Bcrp1/BCRP in its transduced subclones.

Our results demonstrate that there are pronounced differences in FTC inhibitory properties between human BCRP and murine Bcrp1 in our experimental assays. Accumulation studies enabled us to confirm that FTC is an inhibitor of both Bcrp1 and BCRP. There was more potent inhibition of the human orthologue compared to its murine counterpart for both substrates tested (mitoxantrone and chlorine e6), and levels of statistical significance were reached in all cases (Table 1). Transcellular transport studies subsequently confirmed the higher sensitivity of human BCRP to FTC. This mycotoxin has been widely used in transport experiments such as those with Caco-2 cells (Li et al., 2008a) and MDCKII cells (Zhang et al., 2005) to test whether drugs such as topotecan, belotecan and dipyridamole are human BCRP substrates, since the difference between the apical-basolateral and the basolateral-apical transport was completely eliminated on adding FTC 5 µM. However, our study reveals that when using lower FTC concentrations (in our case 1 µM, a widely used concentration), care should be taken when interpreting data, especially with murine Bcrp1. These transport experiments also suggest that there are no pronounced differences in the level of expression of Bcrp1 and BCRP in the MDCKII and MEF3.8 system which could cause misinterpretation of our data, since Bcrp1/BCRP-mediated transport of nitrofurantoin and mitoxantrone is very similar between both subclones (Figs. 2 and 3, Tables 2 and 3). Unfortunately, no antibodies that recognize human BCRP and mouse Bcrp1 with equal efficiency are currently available.

Finally, cytotoxicity experiments performed in MDCKII and MEF3.8 enabled us to establish the ability of FTC to reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. Previous reports have studied the ability of FTC to reverse drug resistance in human BCRP-overexpressing cells. In fact, Rabindran et al., (2000) performed cytotoxic studies with 3 days of incubation in MCF cells using, among others, mitoxantrone as a substrate and obtained a reduction in resistance of almost 30-fold using FTC at a concentration of 5 µM. In our case, a 10-fold reduction is observed in a similar range of concentrations (our EC₉₀ values) (Table 4). The difference may be due to time of incubation with drugs, in our case 24 h, or cell type, amongst other factors. Ceckova et al. (2008) obtained a reduction in resistance to mitoxantrone of



Fig. 4. Effect of FTC on the viability of MDCKII (A, C) and MEF3.8 (B, D), both stably transduced with murine Bcrp1 and human BCRP using a concentration of mitoxantrone (MXR) (A, B) or topotecan (TPT)(C, D) ten times lower than its IC_{50} . The concentration of FTC that results in a 50% reduction in cell viability under these conditions has thus reduced the IC50 by 90% and is designated as EC_{90} (Allen et al., 2002). EC_{90} is expressed as mean \pm S.D. Experiments were done in quadruplicate. Relative cell proliferation was quantified using the MTT assay for MDCKII transduced cells and the CyQuant assay for the MEF3.8 transduced cells. *Statistically different compared to Bcrp1 homologue (P<0.05).

Table 4 Reversal of drug resistance in MDCKII and MEF3.8 both stably transduced with murine Bcrp1 and human BCRP by FTC.

		IC_{50} (μ M) mean \pm S	SD
		Mitoxantrone	Mitoxantrone + FTC ^a
MCDKII	Bcrp1	3.75 ± 0.68	0.40 ± 0.03
	BCRP	2.50 ± 0.20	0.27 ± 0.05
MEF3.8	Bcrp1	2.74 ± 0.60	0.34 ± 0.02
	BCRP	1.12 ± 0.41	0.09 ± 0.02
		Topotecan	Topotecan + FTC ^a
MCDKII	Bcrp1	43.22 ± 1.44	4.15 ± 0.37
	BCRP	13.82 ± 0.91	1.53 ± 0.10
MEF3.8	Bcrp1	30.76 ± 1.05	2.33 ± 0.34
	BCRP	10.37 ± 1.09	1.16 ± 0.77

Experiments were done in quadruplicate

 $^{a}\,$ FTC concentration used was the EC_{90} obtained in each case (see Fig. 4).

approximately 10 times using FTC 5 μ M in cytotoxicity studies with MDCKII-BCRP. In the latter case the data are very similar to ours. In addition, our results confirm that FTC causes greater inhibition in human BCRP versus mouse homologue.

Functional differences of Bcrp1/BCRP among species, including their specificity/affinity for the inhibitors, are likely to be attributable to the primary sequence of amino acids. The mouse Bcrp1 and human BCRP amino acid sequences are 81% identical and 86% homologous. Conservation is very high in the ATP-binding cassette. However, the locations of charged amino acids in the mouse sequence merit small shifts in the positions assigned to some of the transmembrane domains relative to those proposed for human BCRP (Allen et al., 1999). Single amino acid changes can dramatically affect the substrate preference and the inhibition pattern of ABC transporters including BCRP (Cusatis and Sparreboom, 2008; Merino et al., 2009). Existence of multiple binding sites on BCRP (Clark et al., 2006) and different affinities for the inhibitors have been suggested (Giri et al., 2009). Charged amino acids present at the binding sites of the transporter are likely to be responsible for species differences, as is the case for other ABC transporters (Ito, 2008). In fact, differences between murine and human BCRP in substrate specificity/affinity have already been reported (Merino et al., 2006). In the same way, their specificity/affinity for the inhibitors may also be different, as we show for FTC. Differences in specific behaviour have also been revealed in previous comparisons of BCRP homologues from different species, such as mouse, dog, monkey and human (Li et al., 2008b). These kinds of differences between human and murine homologues have been reported for other ABC transporters. Differences in drug resistance and cytotoxicity profiles, sensitivity to modulators and substrate specificity for human and murine Pglycoprotein and MRP2 transporter have also been established (Katoh et al., 2006; Zimmermann et al., 2008; Choi et al., 2009).

5. Conclusion

In summary, this study has permitted us to confirm that FTC is an excellent inhibitor of BCRP, as has been reported in previous studies. Using two independent cell lines and different substrates we also describe a differential FTC inhibition pattern between mouse Bcrp1 and human BCRP, the inhibition potency of FTC being higher in the latter case. This finding has relevant applications in toxicological and pharmacological research. For instance, cytotoxic agents would show higher effects by addition of FTC in cells expressing human BCRP than in those expressing murine Bcrp1. Thus, this differential inhibition of both homologues could have important implications for different *in vitro* models of toxicity, pharmacological interactions and reversal of MDR used for drug discovery and development.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Science and Technology (Spain) [Research project AGL2009-11730 (to GM), predoctoral fellowship (FPU) (to LGL), Ramon y Cajal fellowship (European Social Fund) (to GM)]; and Junta de Castilla y León [Research group of Excellence grant GR132 (to JGP)]. We wish to thank Dr. Alfred Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) for kindly supplying the MDCKII and MEF3.8 cells and their transduced subclones. We are grateful to Prof. James McCue for assistance in language editing and to Borja Barrera (University of Leon) and Dr. Koen van de Wetering (The Netherlands Cancer Institute) for critical reading of the manuscript.

References

- Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., Wijnholds, J., Schinkel, A.H., 1999. The mouse Bcrp1/Mxr/ Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone or doxorubicin. Cancer Res. 59, 4237–4241.
- Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., van Deemter, L., Wijnholds, J., Schinkel, A.H., 2000. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. Cancer Res. 60, 5761–5766.
- Allen, J.D., Loevezijn, A., Lakhai, J., van der Valk, M., Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J., Koomen, G., Schinkel, A.H., 2002. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter *in vitro* and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorein C. Mol. Cancer Ther. 1, 417–425.
- Bardsley, W.G., 2001. SIMFIT. Simulation, fitting, statistics and plotting. Version 5.4. Reference Manual.
- Bram, E.E., Adar, Y., Mesika, N., Sabisz, M., Skladanowski, A., Assaraf, Y.G., 2009. Structural determinants of imidazoacridinones facilitating antitumor activity are crucial for substrate recognition by ABCG2. Mol. Pharmacol. 75, 1149–1159.
- Ceckova, M., Vackova, Z., Radilova, H., Libra, A., Buncek, M., Staud, F., 2008. Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: interference of EGFP. Toxicol. In Vitro 22, 1846–1852.
- Choi, M.K., Kim, H., Han, Y.H., Song, I.S., Shim, C.K., 2009. Involvement of Mrp2/MRP2 in the species different excretion route of benzylpenicillin between rat and human. Xenobiotica 39, 171–181.
- Clark, R., Kerr, I.D., Callaghan, R., 2006. Multiple drug binding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter. Br. J. Pharmacol. 149, 506–515.
- Cole, R.J., Cox, R.H., 1981. Tremorgin group. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, New York, pp. 355–509.
- Cusatis, G., Sparreboom, A., 2008. Pharmacogenomic importance of ABCG2. Pharmacogenomics 9, 1005–1009.
- Gerk, P.M., Moscow, J.A., McNamara, P.J., 2003. Basolateral active uptake of nitrofurantoin in the CIT3 cell culture model of lactation. Drug Metab. Dispos. 31, 691–693.
- Garimella, T.S., Ross, D.D., Eiseman, J.L., Mondick, J.T., Joseph, E., Nakanishi, T., Bates, S.E., Bauer, K.S., 2005. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) inhibitor fumitremorgin C in SCID mice bearing T8 tumors. Cancer Chemother. Pharmacol. 55, 101–109.
- Giri, N., Agarwal, S., Shaik, N., Pan, G., Chen, Y., Elmquist, W.F., 2009. Substrate-dependent breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2)-mediated interactions: consideration of multiple binding sites in *in vitro* assay design. Drug Metab. Dispos. 37, 560–570.
- Hauswald, S., Duque-Afonso, J., Wagner, M.M., Schertl, F.M., Lübbert, M., Peschel, C., Keller, U., Licht, T., 2009. Histone deacetylase inhibitors induce a very broad, pleiotropic anticancer drug resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by modulation of multiple ABC transporter genes. Clin. Cancer Res. 15, 3705–3715.
- Ito, K., 2008. ABCC2/Abcc2 transport property in different species and its modulation by heterogeneous factors. Drug Metab. Pharmacokinet. 23, 394–405.
- Johnson, J.L., Ahmad, A., Khan, S., Wang, Y.F., Abu-Qare, A.W., Ayoub, J.E., Zhang, A., Ahmad, I., 2003. Improved liquid chromatographic method for mitoxantrone quantification in mouse plasma and tissues to study the pharmacokinetics of a liposome entrapped mitoxantrone formulation. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 799, 149–155.
- Katoh, M., Suzuyama, N., Takeuchi, T., Yoshitomi, S., Asahi, S., Yokoi, T., 2006. Kinetic analyses for species differences in P-glycoprotein-mediated drug transport. J. Pharm. Sci. 95 2673-1683.
- Li, H., Jin, H.E., Kim, W., Han, Y.H., Kim, D.D., Chung, S.J., Shim, C.K., 2008a. Involvement of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in Caco-2 and MDCKII cells. Pharm. Res. 25, 2601–2612.
- Li, M., Yuan, H., Li, N., Song, G., Zheng, Y., Baratta, M., Hua, F., Thurston, A., Wang, J., Lai, Y., 2008b. Identification of interspecies difference in efflux transporters of hepatocytes from dog, rat, monkey and human. Eur. J. Pharm. Sci. 35, 114–126.
- Mathew, G., Timm Jr., E.A., Sotomayor, P., Godoy, A., Montecinos, V.P., Smith, G.J., Huss, W.J., 2009. ABCG2-mediated DyeCycle Violet efflux defined side population in benign and malignant prostate. Cell Cycle 8, 1053–1061.
- Merino, G., Álvarez, A.I., Pulido, M.M., Molina, A.J., Schinkel, A.H., Prieto, J.G., 2006. Breast cáncer resistance protein (BCRP/ABCG2) transport fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics and milk secretion. Drug Metab. Dispos. 34, 690–695.

- Merino, G., Real, R., Baro, M.F., Gonzalez-Lobato, L., Prieto, J.G., Alvarez, A.I., Marques, M. M., 2009. Natural allelic variants of bovine ABCG2 transporter: increased activity of the S581 variant and development of tools for the discovery of new ABCG2 inhibitors. Drug Metab. Dispos. 37, 5–9.
- Minderman, H., Suvannasankha, A., O'Loughlin, K.L., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Robey, R.W., Baer, M.R., 2002. Flow cytometric analysis of breast cancer resistance protein expression and function. Cytometry 48, 59–65.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65, 55–63.
- Noguchi, K., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y., 2009. Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. Adv. Drug Deliv. Rev. 61, 26–33.
- Paturi, D.K., Kwatra, D., Ananthula, H.K., Pal, D., Mitra, A.K., 2010. Identification and functional characterization of breast cancer resistance protein in human bronchial epithelial cells (Calu-3). Int. J. Pharm. 384, 32–38.
- Pavek, P., Merino, G., Wagenaar, E., Bolscher, E., Novotna, M., Jonker, J.W., Schinkel, A.H., 2005. Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidaz01(4, 5-b) pyridine. and transport of cimetidine. I. Pharm. Exp. Ther. 312. 144–152.
- pyridine, and transport of cimetidine. J. Pharm. Exp. Ther. 312, 144–152. Rabindran, S., Ross, D., Doyle, L., Yang, W., Greenberger, L., 2000. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. Cancer Res. 60, 47–50.
- Rivers, F., O'Brien, T.J., Callaghan, R., 2008. Exploring the possible interaction between anti-epilepsy drugs and multidrug efflux pumps; in vitro observations. Eur. J. Pharmacol. 598, 1–8.
- Robey, R.W., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., Bates, S.E., 2004. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. Cancer Res. 64, 1242–1246.
- Robey, R.W., Steadman, K., Polgar, O., Bates, S.E., 2005. ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy. Cancer Biol. Ther. 4, 187–194.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A., 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. Physiol. Rev. 86, 1179–1236.

- Solazzo, M., Fantappiè, O., D'Amico, M., Sassoli, C., Tani, A., Cipriani, G., Bogani, C., Formigli, L., Mazzanti, R., 2009. Mitochondrial expression and functional activity of breast cancer resistance protein in different multiple drug-resistant cell lines. Cancer Res. 69, 7235–7242.
- Susanto, J., Lin, Y.H., Chen, Y.N., Shen, C.R., Yan, Y.T., Tsai, S.T., Chen, C.H., Shen, C.N., 2008. Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells. PLoS ONE 3, e4023.
- Takenaka, K., Morgan, J.A., Scheffer, G.L., Adachi, M., Stewart, C.F., Sun, D., Leggas, M., Ejendal, K.F., Hrycyna, C.A., Schuetz, J.D., 2007. Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. Cancer Res. 67, 6965–6972.
- Taub, M.E., Podila, L., Ely, D., Almeida, I., 2005. Functional assessment of multiple P-glycoprotein (P-gp) probe substrates: influence of cell line and modulator concentration on P-gp activity. Drug Metab. Dispos. 33, 1679–1687.
- concentration on P-gp activity. Drug Metab. Dispos. 33, 1679–1687.
 Tiwari, A.K., Sodani, K., Wang, S.R., Kuang, Y.H., Ashby Jr., C.R., Chen, X., Chen, Z.S., 2009.
 Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. Biochem. Pharmacol. 78, 153–161.
- Usuda, J., Tsunoda, Y., Ichinose, S., Ishizumi, T., Ohtani, K., Maehara, S., Ono, S., Tsutsui, H., Ohira, T., Okunaka, T., Furukawa, K., Sugimoto, Y., Kato, H., Ikeda, N., 2010. Breast cancer resistant protein (BCRP) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (PDT) for centrally located early lung cancer. Lung Cancer 67, 198–204.
- Vlaming, M.L., Lagas, J.S., Schinkel, A.H., 2009. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. Adv. Drug Deliv. Rev. 61, 14–25.
- Zhang, Y., Gupta, A., Wang, H., Zhou, L., Vethanayagam, R.R., Unadkat, J.D., Mao, Q., 2005. BCRP Transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers. Pharm. Res. 22, 2023–2034.
- Zheng, L.S., Wang, F., Li, Y.H., Zhang, X., Chen, L.M., Liang, Y.J., Dai, C.L., Yan, Y.Y., Tao, L.Y., Mi, Y.J., Yang, A.K., To, K.K., Fu, L.W., 2009. Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function. PLoS ONE 4, e5172.
- Zimmermann, C., van de Wetering, K., van de Steeg, E., Wagenaar, E., Vens, C., Schinkel, A.H., 2008. Species-dependent transport and modulation properties of human and mouse multidrug resistance protein 2 (MRP2/Mrp2, ABCC2/Abcc2). Drug Metab. Dispos. 36, 631–639.
Analysis of the effect of the bovine adenosine triphosphate-binding cassette transporter G2 single nucleotide polymorphism Y581S on transcellular transport of veterinary drugs using new cell culture models¹

R. Real,^{*2} L. González-Lobato,^{*†²} M. F. Baro,[†] S. Valbuena,^{*} A. de la Fuente,^{*} J. G. Prieto,^{*‡} A. I. Álvarez,^{*} M. M. Marques,[†] and G. Merino^{†³}

*Department of Biomedical Sciences–Physiology, †Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL), ‡Instituto de Biomedicina (IBIOMED), University of Leon, 24071 Leon, Spain

ABSTRACT: In commercial dairy production, the risk of drug residues and environmental pollutants in milk from ruminants has become an outstanding problem. One of the main determinants of active drug secretion into milk is the ATP-binding cassette transporter G2/breast cancer resistance protein (ABCG2/ BCRP). It is located in several organs associated with drug absorption, metabolism, and excretion, and its expression is highly induced during lactation in the mammary gland of ruminants, mice, and humans. As a consequence, potential contamination of milk could expose suckling infants to xenotoxins. In cows, a SNP for this protein affecting quality and quantity of milk production has been described previously (Y581S). In this study, our main purpose was to determine whether this polymorphism has an effect on transcellular transport of veterinary drugs because this could alter substrate pharmacokinetics and milk residues. We stably expressed the wild-type bovine ABCG2 and the Y581S variant in Madin-Darby canine kidney epithelial cells (MDCKII) and MEF3.8 cell lines generating cell models in which the functionality of the bovine transporter could be addressed. Functional studies confirmed the

greater functional activity in mitoxantrone accumulation assays for the Y581S variant with a greater relative $V_{\rm MAX}$ value (P = 0.040) and showed for the first time that the Y581S variant presents greater transcellular transport of the model ABCG2 substrate nitrofurantoin (P = 0.024) and of 3 veterinary antibiotics, the fluoroquinolone agents enrofloxacin (P = 0.035), danofloxacin (P = 0.001), and difloxacin (P = 0.008), identified as new substrates of the bovine ABCG2. In addition, the inhibitory effect of the macrocyclic lactone ivermectin on the activity of wild-type bovine ABCG2 and the Y581S variant was also confirmed, showing a greater inhibitory potency on the wild-type protein at all the concentrations tested (5 μM , P = 0.017; 10 μM , P = 0.001; 25 µM, P = 0.008; and 50 µM, P = 0.003). Differential transport activity depending on the genotype together with the differential inhibition pattern might have clinical consequences, including changes in substrate pharmacokinetics (and subsequently pharmacodynamics) and more specifically, changes in secretion of ABCG2 substrates into milk, potentially implying important consequences to veterinary therapeutics.

Key words: breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP), polymorphism, transcellular transport, veterinary antibiotic

© 2011 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2011. 89:4325–4338 doi:10.2527/jas.2011-3841

¹This work was supported by the Ministry of Science and Innovation (Spain; research project AGL2009-11730, to G. Merino), predoctoral fellowship Formación Profesorado Universitario (to L. González-Lobato), Ramon y Cajal fellowship (European Social Fund, to G. Merino), and by Junta de Castilla y León (Research Group of Excellence grant GR132, to J. G. Prieto). We thank Alfred Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) for kindly supplying the Madin-Darby canine kidney epithelial cells (MDCKII) and MEF3.8 cells. We are grateful to James McCue (University of Extremadura, Badajoz Campus, Spain) for assistance in language editing.

²Both authors contributed equally to this work.

³Corresponding author: gmerp@unileon.es

Received January 4, 2011.

Accepted July 31, 2011.

Real et al.



Figure 1. Membrane location and tissue distribution of ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) and major ATP-binding cassette transporters involved in the transport of fluoroquinolones. The ABCG2 is present in the apical membrane of enterocytes, in the bile canalicular membrane of hepatocytes, and in the apical membrane of renal proximal tubular epithelial cells, where it mediates direct intestinal excretion, reduces uptake from the intestine, and mediates hepatobiliary excretion and renal elimination. In blood capillaries in the brain, ABCG2 limits penetration across the blood-brain barrier, and in the apical membrane of alveolar cells of the mammary gland, it actively secretes its substrates into milk. The process of passive diffusion is present in all membranes. ABCB1 = ATP-binding cassette transporter B1, p-glycoprotein; ABCC2 = ATP-binding cassette transporter C2, multidrug resistance protein 2.

INTRODUCTION

In dairy production, the risk of residues of drugs and pollutants in milk is an outstanding problem. In addition, the health of suckling animals could be impaired. Expression of the ATP-binding cassette transporter G2/breast cancer resistance protein (ABCG2/ BCRP) is induced during lactation in the mammary gland, and its substrates, including toxic compounds, are actively pumped into the milk (Jonker et al., 2005). This apical transporter restricts the systemic exposure of its substrates by mediating their active excretion via the liver, intestine, and kidneys, and limits the brain penetration of xenobiotics (Figure 1).

Little is known about the relevance of ABCG2 polymorphisms in domestic animals. A single nucleotide change (adenosine/cytosine) encoding a substitution of tyrosine-581 to Ser (**Y581S**) has been proposed as a quantitative trait nucleotide (Cohen-Zinder et al., 2005; Olsen et al., 2007), affecting quality and quantity of milk production. However, its impact on drug excretion into milk or on drug systemic disposition has not yet been investigated. Our previous results showed significant differences in mitoxantrone accumulation assays between the wild-type bovine ABCG2 and the Y581S variant using transiently transfected ovine primary fibroblasts (P < 0.001; Merino et al., 2009).

However, a more relevant question is to determine whether the Y581S variant can differentially transport veterinary drugs because drug systemic disposition, tissue distribution, and drug excretion into milk can then be altered depending on the genotype. For this reason, we aimed to generate new cell models stably expressing the wild-type bovine ABCG2 and the Y581S variant. Using these cells, we addressed the differential effect of the SNP on transcellular transport of 3 veterinary antibiotics (enrofloxacin, danofloxacin, and difloxacin) and the differential inhibition pattern of both variants using the macrocyclic lactone ivermectin.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures were approved by the Research Committee of Animal Use of the University of Leon (Spain) and carried out according to the Principles of Laboratory Animal Care and the European guidelines described in EC Directive 86/609.

Drugs and Chemicals

Mitoxantrone, danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, and nitrofurantoin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The Ko143 was obtained from Tocris (Bristol, UK) and has been described previously as a potent and specific ABCG2 inhibitor (Allen et al., 2002) with effects on both variants of bovine ABCG2 (Merino et al., 2009). Ivermectin was obtained from Fort Dodge (Girona, Spain). All the other chemicals were of analytical grade and available from commercial sources.

Cell Culture

epithelial Madin-Darby canine kidney cells (MDCKII) and MEF3.8 cells [a spontaneously immortalized embryo fibroblast cell line derived from triple knockout multidrug resistance protein 1a/1b $(Mdr1a/1b^{-/-})$, multidrug resistance-associated protein 1 $(\mathbf{Mrp1}^{-/-})$ mice] were kindly provided by A. H. Schinkel, Netherlands Cancer Institute (Amsterdam, the Netherlands). Generation and culture conditions for both cellular types have been described previously (Allen et al., 2000; Jonker et al., 2000). Briefly, cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium with GlutaMAX (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA), supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (MP Biomedicals, Solon, OH), penicillin (50 U/mL), and streptomycin (50 μ g/mL; Life Technologies Inc.) at 37° C and pH 7.4 in an atmosphere with 5% CO₂.

Generation of MDCKII and MEF3.8 Cells Expressing Wild-Type Bovine ABCG2 and the Y581S Variant

Recombinant retroviral vectors containing wild-type bovine ABCG2 or the Y581S variant were generated. The full-length bovine cDNA had been previously cloned from the liver of a heterozygous animal using a reverse-transcription PCR approach (Merino et al., 2009). Bovine cDNA were excised from pABCG2-TO-PO plasmids by EcoRI digestion, and inserted as cohesive-end fragments into the plasmid LZRS (pLZRS)internal ribosome entry site (**IRES**)-green fluorescence protein (GFP) vector (Michiels et al., 2000). The IRES sequence allows the generation of a bicistronic mRNA, which provides expression of ABCG2 along with the GFP followed by the translation of 2 independent proteins. These constructs were transfected into the amphotropic packaging cell line Phoenix (Kinsella and Nolan, 1996) using the calcium phosphate-precipitation method (Calphos Mammalian Transfection Kit, Clontech, Mountain View, CA). Virus-containing supernatants were harvested 24 and 48 h after transfection, filtered, and used to transduce cultures of MDCKII and MEF3.8 cells. Fifty to 60% confluent cultures of either cell type were incubated with virus supernatants for 24 h in the presence of 4 μ g/mL of polybrene (Sigma-Aldrich). After 7 to 10 d, MDCKII- and MEF3.8-transduced clones were selected according to GFP expression and functional ABCG2 activity on the basis of reduced mitoxantrone accumulation. The expression of ABCG2 in selected clones was verified by immunoblot and immunofluorescence.

Immunoblot Analysis

The MDCKII- and MEF3.8-transduced cells were washed with PBS, homogenized in ice-cold RadioImmunoPrecipitation Assay (**RIPA**) buffer (Sigma-Aldrich) with protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), and centrifuged at 8,000 \times g for 15 min at 4°C. Protein concentrations were determined using Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Protein samples were resolved in an 8% SDS-polyacrylamide gel and electrotransferred to nitrocellulose Hybond membranes (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). The membranes were blocked with 1% skim milk in Tris buffer saline plus 0.05%Tween 20 (blocking buffer), then incubated overnight at 4°C with anti-mouse ABCG2 BXP-53 monoclonal antibody (Monosan, Uden, the Netherlands) diluted 1:500 in blocking buffer. This antibody reacts with bovine ABCG2 (Merino et al., 2009). Secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody and Immobilon Western kit (Millipore Corporation, Billerica, MA) were used to visualize ABCG2. Equal loading was verified, after stripping, by incubating the membrane with β -actin antibody (1:5,000 dilution in blocking buffer; Sigma-Aldrich). Visualization of β -actin was performed the same way as ABCG2.

Immunolocalization of Plasma Membrane Proteins

The MDCKII- and MEF3.8-transduced cells growing on coverslips (90% confluency) were fixed for 10 min with ice-cold methanol and permeabilized for 10 min with 1% Triton. Incubation with anti-mouse BXP-53 monoclonal antibody (Monosan) diluted 1:50 in PBS was carried out overnight at 4°C. The cells were washed



Figure 2. Schematic diagram of the 2 experimental cell models used. Panel A: mitoxantrone accumulation assays. The ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) overexpressed in the apical membrane prevents accumulation of mitoxantrone into ABCG2-transduced cells but not into vector-transduced cells (LZRS). The MEF3.8 cells lack the multidrug resistance protein 1a/1b (Mdr1a/1b-/-) and the multidrug resistance-associated protein 1 (Mrp1-/-) as potential endogenous transporters. Panel B: transcellular transport assays. The ABCG2 overexpressed in the apical membrane of the polarized cells transports its substrates toward the apical direction. In this way, vectorial transport in the ABCG2-transduced cells is greater in the basolateral-to-apical direction than in the apical-to-basolateral direction. Different gray fading indicates different substrate concentrations.

3 times with PBS and incubated with Alexa fluor 568-conjugated secondary antibody (Life Technologies Inc.) in a 1:200 dilution in PBS for 1 h at room temperature. Nuclear counterstaining was performed with 4',6-diamidino-2-phenylindole (**DAPI**; 1 μ g/mL) for 5 min. The coverslips were mounted on glass slides using Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK). Images were obtained with a laser-scanning confocal microscope Nikon Eclipse TE-200-U and analyzed using EZ-C1 3.30 Free Viewer software (Nikon Corporation, Surrey, UK).

Accumulation Assays

In vitro accumulation assays were carried out as described previously (Pavek et al., 2005) using mitoxantrone as fluorescent substrate. In brief, subconfluent cultures (90% confluency) of MDCKII- and MEF3.8transduced cells were used after 36 h from seeding. Medium was aspirated and cells were incubated at pH 7.4 and 5% CO_2 in prewarmed Optimem medium (Life Technologies Inc.) with or without the specific ABCG2 inhibitor Ko143 (1 μM ; Tocris, Bristol, UK) for 60 min before the addition of mitoxantrone. Accumulation of mitoxantrone was allowed for 1 h at 37°C. Then cells were washed with ice-cold PBS and trypsinized. Collected cells were centrifuged and resuspended in PBS with 2.5% fetal calf serum. Relative cellular accumulation of mitoxantrone was determined by flow cytometry using a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Excitation and emission wavelengths for mitoxantrone were 635 and 650 nm, respectively,

and for GFP were 435 and 507 nm, respectively. Mitoxantrone fluorescence in tested populations of at least 5,000 GFP-gated positive cells was quantified from histogram plots using the median of fluorescence (**MF**). Flow cytometry data were processed and analyzed using WinMDI software (The Scripps Institute, West Lafayette, IN). In this assay, ABCG2 expression prevents accumulation of mitoxantrone in ABCG2-transduced cells. The ABCG2 inhibition increases accumulation of mitoxantrone in ABCG2-transduced cells and thus increases MF (Figure 2A).

For the ivermectin inhibition assays in MEF3.8transduced cells, the same protocol was performed; ivermectin (Fort Dodge) was added as an inhibitor 60 min before the addition of mitoxantrone. Possible background fluorescence of ivermectin was checked in appropriate channels, but the fluorescence was negligible in all cases. Inhibitory potency of ivermectin was calculated according to the following equation: inhibitory potency (%) = [(MF with tested compound in ABCG2 cells – MF without tested compound in ABCG2 cells)/ (MF with tested compound in vector control cells – MF without tested compound in ABCG2 cells)] × 100.

For kinetic experiments with different mitoxantrone concentrations, an indirect estimation of mitoxantrone relative efflux was calculated by subtracting the MF of ABCG2-expressing cells from the MF of vector control cells, in accordance with Merino et al. (2009). The resulting data were used for semiquantitative analysis of relative kinetic constants by the fitting software SIM-FIT (University of Manchester, Manchester, UK; Bardsley, 2001), assuming Michaelis-Menten kinetics.

Transcellular Transport Assays

Transepithelial assays using MDCKII-transduced cells were carried out as described elsewhere (Merino et al., 2005a) with minor modifications. With this assay, the rate of basolaterally or apically directed translocation can be determined after adding the drug to the apical or basolateral side. The ABCG2 transports its substrates in the apical direction (Figure 2B). Cells around passage 10 were seeded on microporous membrane filters (3.0-µm pore size, 24-mm diameter, Transwell 3414, Costar, Corning, NY) at a density of $1.0 \times$ 10^6 cells/well. Cells were grown for 3 d, and medium was replaced every day. Transepithelial resistance was measured in each well using a Millicell-ERS ohmmeter (Millipore) and corrected for the resistance obtained in blank control wells; wells registering a resistance of ≥ 200 ohms were used in the transport experiments. This measurement was repeated at the end of the experiment to check the tightness of the monolayer. Two hours before the start of the experiment, medium at both the apical and basolateral sides of the monolayer was replaced with 2 mL of Optimem medium (Life Technologies Inc.) without serum, and either with or without the specific ABCG2 inhibitor Ko143 (1 μM). The experiment started (t = 0) when medium in either the apical or basolateral compartment was replaced with fresh Optimem medium containing 10 μM of the tested substrate, either with or without 1 μM Ko143. Cells were incubated at 37° C in 5% CO₂ and 100-µL aliquots of culture media were taken at t = 2 and t = 4h and stored at -20° C for HPLC analysis. The appearance of the compound in the opposite compartment was presented as the fraction of the total compound added at the beginning of the experiment. The apparent permeability coefficient (P_{app}) was calculated as follows: $P_{\rm app} = (\Delta Q / \Delta t) \times [1 / (A \times C_0)]$, where $\Delta Q / \Delta t$ is the rate of drug appearing in the receiver chamber, which was obtained from the slope of the regression line on the transport-time profile across MDCK cell monolayers, with C_0 being the initial concentration of drug loaded in the donor chamber, and A the cell monolayer surface area (4.71 cm^2) .

HPLC Analysis

The HPLC system consisted of a Waters 600 pump, a Waters 717plus autosampler and a Waters 2487 UV detector (Waters Corporation, Milford, MA). The conditions for HPLC analysis of danofloxacin, enrofloxacin and difloxacin were modified according to previously published methods (Marazuela and Moreno-Bondi, 2004; Merino et al., 2006). Samples were thawed and 50 μ L of the culture media was directly injected into the HPLC system. Separation of the samples was performed on a reversed-phase column (Phenomenex Synergi 4 μ m Hydro-RP 80A). The mobile phase consisted of 25 m*M* orthophosphoric acid (pH 3.0)/acetonitrile (75:25), and the flow rate of the mobile phase was set to 1.5 mL/min. Absorbance (UV) was measured at 278 nm. Integration was performed using Millennium32 software (Waters Corporation, Milford, MA). Standard samples in Optimem were prepared, yielding a concentration range from 0.1 to 10 μ g/mL. Interassay precision CV were <15%, and relative error (accuracy) values were <20%. Limits of quantification and detection were established as the least concentration measured with a CV <15%, with that being the least concentration included in the calibration curves (0.1 μ g/mL).

The conditions for HPLC analysis of nitrofurantoin were based on a previously published method (Merino et al., 2005a). Samples were thawed and kept protected from light in brown Eppendorf tubes; 50 μ L of the culture media was directly injected into the HPLC system. Separation was performed at 30°C on a reversed-phase column (Nucleosil 120 C18, 10- μ m particle size, 250 \times 4 mm), preceded by a precolumn cartridge (3.9×20) mm) with the same packing material. The composition of the mobile phase was 25 mM potassium phosphate buffer, pH 3/methanol (vol/vol; 78:22). The flow rate of the mobile phase was set to 1.2 mL/min. Absorbance was measured at 366 nm. Standard samples in Optimem were prepared at concentrations ranging from 0.04 to 5 μ g/mL. Interassay precision CV were <15%, and relative error (accuracy) values were <20%. Limits of quantification and detection were established as the least concentration measured with a CV <15%, that being the least concentration included in the calibration curve (0.04 μ g/mL).

Statistical Analysis

A 2-tailed unpaired Student t-test was used to assess the significance of differences (P < 0.05) between cells expressing wild-type bovine ABCG2 and the Y581S variant for the following variables: GFP expression, mitoxantrone accumulation, relative kinetic constants, transcellular efflux ratio, and inhibitory potency. The ABCG2-expressing cells were also compared with vector control cells when needed. Mitoxantrone accumulation including Ko143 treatment was separately evaluated for each cell type (MDCKII- and MEF3.8-transduced cells). Ivermectin inhibition in MEF3.8-transduced cells was tested in an independent experiment. Transcellular transport for each tested compound was separately evaluated, using nitrofurantoin as positive control. All values are given as means \pm SE.

RESULTS

Generation of MDCKII Cells Stably Expressing Wild-Type Bovine ABCG2 and the Y581S Variant

To address the effect of the Y581S SNP on transcellular transport of veterinary drugs, we generated stable cell lines expressing the wild-type bovine ABCG2 and the Y581S variant in MDCKII cells. Pharmacological barriers contain at least 1 tight cell layer, which is deterministic of the compound trafficking properties of the barrier. Therefore, a representative epithelial polarized cell line (MDCKII) in a monolayer transport setup is an excellent in vitro tool for modeling pharmacological barriers to investigate vectorial transport (Hegedus et al., 2009; International Transporter Consortium, 2010).

The cDNA encoding wild-type ABCG2 and the Y581S variant were successfully subcloned in the retroviral expression vector pLZRS-IRES-GFP (Michiels et al., 2000), which provided expression of the gene of interest along with the GFP. The obtained constructs were used to transduce MDCKII cells and stable lines were generated. Approximately 50 clones expressing wild-type ABCG2 or the Y581S variant (25 clones each) were established by limited dilution plating. Clones were first selected according to GFP expression and were subsequently screened for ABCG2 expression and functional activity based on reduced mitoxantrone accumulation. Most of the clones presenting increased GFP expression showed greater ABCG2 functional activity (Figures 3 and 4). A further selection of the clones was performed based on ABCG2 expression stability after 8 wk of routine subculture (20 cell passages). Figure 5 (panels A and B) shows a representative Western blot analysis and GFP flow cytometry expression analysis of selected clones. Similar amounts of ABCG2 protein for both wild-type ABCG2 and the Y581S variant were detected, using β -actin as the loading control. The pLZ-RS1 vector control cells show undetectable background transporter expression. Analysis of GFP expression



Figure 3. Distribution of bovine ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) clones into categories according to mitoxantrone (MXR) accumulation. The initial set of 50 Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCKII) clones stably transduced with both variants of bovine ABCG2 was classified into different categories after accumulation assays. Fluorescence of MXR was measured by flow cytometry and represented in terms of relative arbitrary units. Clones expressing wild-type (WT) ABCG2 showed greater fluorescence, suggesting less transporter activity. On the contrary, 84% of Y581S clones presented fluorescence less than 50 (arbitrary units), pointing to increased activity.



Figure 4. Classification of the initial Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCKII) clones stably transduced with both variants of bovine ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) according to green fluorescence protein (GFP) expression and mitoxantrone (MXR) accumulation. Panel A: Y581S-ABCG2 variant; panel B: wild-type (WT)-ABCG2 variant. Closed circles represent clones that had increased GFP fluorescence and reduced MXR accumulation indicative of proper transporter activity, which were selected for further analysis. Open circles represent clones that were not selected for further analysis. Fluorescence of GFP and MXR was measured by flow cytometry and represented in terms of relative arbitrary units. Closed squares represent MDCKII cells stably transduced with mouse Abcg2.

did not reveal significant differences between wild-type ABCG2 and the Y581S variant either. The Y581S-56, wild-type-27, and LZRS1 MDCKII stable cell clones were used in all subsequent experiments.

To confirm the plasma membrane localization of the transporter and to explore whether it was affected by the polymorphism, we examined ABCG2 subcellular localization in Y581S and wild-type cells by immunofluorescence. The X-Z cross sections were collected from the top of the cells to the glass slide to construct 3-dimen-



Figure 5. Expression of bovine wild-type (WT) ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) and the Y581S variant in stably transduced Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCKII) clones. Panel A: Western blot analysis of selected clones performed with 30 μ g of protein per lane and probed with monoclonal antibody BXP-53 (Monosan, Uden, the Netherlands) and β -actin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for loading control. The ABCG2 was detected as a band of approximately 70 kDa. No signal was detected in the plasmid LZRS1 (pLZRS1) vector control cells. Protein samples were collected at the indicated time points (T = 0, T = 8, wk). Panel B: green fluorescence protein (GFP) expression analysis of the same clones shown in panel A. Mean GFP fluorescence was measured at the indicated time points (T = 0, T = 8, wk) by flow cytometry and represented in terms of relative arbitrary units (units of fluorescence, median). The bars indicate the means \pm SE from triplicate samples. Panel C: ABCG2 membrane immunolocalization performed in transduced cells using monoclonal antibody BXP-53 (Monosan) and Alexa fluor 568-conjugated secondary antibody (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA). Confocal laser scanning microscopy images are included (original magnification, 60×). No membrane fluorescence was detected in the pLZRS1 vector control cells. Images have been enhanced for maximal contrast between the black background and fluorescence and were not intended for quantitative determination of ABCG2 expression.

sional pictures. Transduced cells showed strong apical cytoplasmic membrane staining (Figure 5C), judging from the nuclear positions stained with DAPI, suggesting that both protein variants were predominantly routed to the apical plasma membrane, and therefore, the SNP had no effect on the transporter trafficking to the cell surface. The ABCG2 was not detectable in cells transduced with the empty pLZRS expression vector.

To validate the new cell model, flow cytometry accumulation assays were performed in MDCKII clones. A typical ABCG2 substrate such as mitoxantrone (10 μM) was used. As shown in Table 1, cells expressing the bovine transporter demonstrated greatly reduced intracellular mitoxantrone accumulation (around 90% of fluorescence reduction, P = 0.016) indicative of the transporter functionality. The reduced accumulation effect was completely reversed by the addition of 1 μM Ko143, a specific ABCG2 inhibitor. Comparison of the functionality of wild-type ABCG2 and the Y581S variant indicated significantly different activities (P = 0.040). Mitoxantrone accumulation for the vector control cells was 15-fold greater compared with the Y581S variant and 11-fold greater compared with the wild-type ABCG2 variant (Table 1). These data demonstrate a greater efflux activity of the Y581S variant.

To further analyze the function of both variants, kinetic analyses using a range of mitoxantrone concentrations (1 to 200 μ M) were performed in MDCKII-transduced cells. An indirect estimation of mitoxantrone relative efflux was calculated by subtracting the MF of ABCG2-expressing cells from the MF of vector control cells; the resulting data were used for semiquantitative analysis of relative kinetic constants. The relative V_{MAX} value was significantly greater for the Y581S variant (7.31 ± 0.13 units of fluorescence/min for Y581S vs. 6.78 ± 0.12 units of fluorescence/min for wild type, P

Table 1. Effect of the Y581S polymorphism on ac-
cumulation of mitoxantrone in Madin-Darby canine
kidney epithelial cells (MDCKII) stably transduced
with both variants of the bovine ATP-binding cassette
transporter G2 (ABCG2)

	Units of fluore	Units of fluorescence, ¹ median		
Subclone	MXR	MXR + Ko143		
LZRS ² Y581S-ABCG2 WT-ABCG2	$\begin{array}{c} 155.73 \pm 9.08 \\ 10.22 \pm 0.54 ^{\rm a} \\ 14.05 \pm 0.43 \end{array}$	$\begin{array}{c} 168.69 \pm 9.00 \\ 145.66 \pm 10.33 \\ 162.19 \pm 9.14 \end{array}$		

^aWild-type (WT) variant accumulation was different from Y581S variant accumulation (P = 0.040).

¹Mitoxantrone (MXR) accumulation (10 μ M) was measured in cells preincubated with or without 1 μ M Ko143. Mean MXR fluorescence is shown in terms of relative arbitrary units (units of fluorescence, median); n = 3.

²LZRS: control vector.

= 0.040), indicating that the decreased drug accumulation previously observed for this variant was associated to an increased efflux velocity. However, estimated $K_{\rm M}$ values were not significantly different among the variants (5.65 ± 0.44 μM for Y581S vs. 4.69 ± 0.40 μM for wild type, P = 0.18).

Differential Transcellular Transport of Veterinary Drugs

To determine whether the bovine ABCG2 Y581S variant can differentially transport veterinary compounds, transcellular transport assays were carried out in the polarized MDCKII-transduced cells. The International Transporter Consortium et al. (2010) indicated that transport systems should be well characterized with known substrates or inhibitors. In our case, the antibiotic nitrofurantoin (a model ABCG2 substrate; Merino et al., 2005a; Yue et al., 2009) and Ko143 (a potent and specific ABCG2 inhibitor) were used to validate our results, ensuring that the effects we observed in the ABCG2-transduced cells are ABCG2-specific mediated, with no effect on the cell lines transduced with the empty vector.

Basal to apical transport of nitrofurantoin was highly increased in the cells expressing the bovine transporter with respect to the vector-transduced cells, indicating that the efflux activity of both bovine ABCG2 variants was appropriate in the established cell lines (Figure 6). Accordingly, the transcellular efflux ratio ($P_{\rm app, BL-AP}/P_{\rm app, AP-BL}$) in the ABCG2-expressing cells was greater than that in the vector control cells (Table 2; P < 0.001), where BL-AP is basal-apical and AP-BL is apical-basal. When the selective ABCG2 inhibitor Ko143 was used, ABCG2-mediated transport was completely inhibited, resulting in the same vectorial translocation pattern as the vector-transduced cell line (Figure 6).

Once the cell model was validated with the typical substrate nitrofurantoin, similar analyses were per-

formed with 3 fluoroquinolone antibiotics commonly used in veterinary therapeutics: enrofloxacin, danofloxacin, and difloxacin. The tested compounds showed basal to apical preferential transport in the bovine ABCG2-transduced cell lines, indicating that they are substrates of the bovine ABCG2 transporter (Table 2). The Ko143 also showed a complete inhibitor effect on the ABCG2-mediated transport of these antibiotics (data not shown).

When wild-type ABCG2 and the Y581S variant were compared, a difference in transcellular efflux ratios of the 4 compounds tested was observed (Table 2; P =0.024 for nitrofurantoin; P = 0.035 for enrofloxacin; P= 0.001 for danofloxacin; and P = 0.008 for difloxacin), with a greater transport activity corresponding to the Y581S variant. The results obtained in the transport assays are in agreement with the mitoxantrone accumulation experiments and clearly support the greater activity of the Y581S variant vs. the wild-type protein.

Differential Inhibition Pattern of the Wild-Type ABCG2 and the Y581S Variant

To further characterize bovine ABCG2 and the Y581S SNP, another cell model was generated. The MEF3.8 cells are mouse embryonic fibroblasts lacking the Mdr1a/1b^{-/-} and Mrp1^{-/-} (Allen et al., 2000); thus, they were an excellent tool to study a specific inhibitor action of selected compounds on the ABCG2 transporter. For this reason, MEF3.8 cells were transduced with the pLZRS-IRES-GFP constructs containing wild-type ABCG2 and the Y581S variant, in the same way than the transduced MDCKII cells.

Similar results to the ones described for MDCKII clones were obtained for protein expression analysis (Figure 7A) and GFP flow cytometry studies (Figure 7B). The LZRS4 vector control cells show undetectable background transporter expression (Figure 7A). The Y581S-15, wild-type-12, and LZRS4 MEF3.8 clones were selected for all subsequent experiments. Immunostaining analysis of transduced cells revealed strong plasma membrane staining (Figure 7C), suggesting that both wild-type ABCG2 and the Y581S variant were predominantly routed to the plasma membrane.

Functionality of the bovine transporter in MEF3.8 clones was first tested in control mitoxantrone accumulation assays. Significant differences in activity between MEF3.8 clones expressing wild-type ABCG2 and the Y581S variant were observed (n = 3, P = 0.03), with a mitoxantrone accumulation for the vector control cells 47-fold greater compared with the Y581S clones (535.08 ± 30.94 vs. 12.55 ± 0.52 units of fluorescence, P < 0.001) and 37-fold greater compared with the wild-type protein (535.08 ± 30.94 vs. 15.80 ± 0.84 units of fluorescence, P < 0.001). Again, the intracellular fluorescence of mitoxantrone in ABCG2-expressing clones was increased (P < 0.001) by the addition of 1 μM Ko143 (177.34 ± 5.70 units of fluorescence for Y581S



Figure 6. Transpithelial transport of nitrofurantoin (10 μM , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells (MDCKII) stably transduced with wild-type (WT) ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2), the Y581S variant, and vector control (LZRS). The experiment started with the addition of nitrofurantoin to 1 compartment (basolateral or apical) in the presence and absence of the inhibitor Ko143 (1 μM). After 2 and 4 h, drug concentration was measured in the opposite compartment by HPLC and plotted. Closed circles (\bullet) = translocation from the basolateral to the apical compartment (B to A); open circles (\bigcirc) = translocation from the apical to the basolateral compartment (A to B). The results shown are means; error bars indicate the SE (n = 3 to 6).

and 239.96 \pm 11.30 units of fluorescence for wild type, n = 3). These data confirmed the greater efflux activity of the Y581S variant.

To study the effect of the Y581S SNP on inhibition of the transporter by veterinary drugs and to elaborate further on our previous findings regarding the interaction of the widely used anthelmintic ivermectin with bovine ABCG2 (Merino et al., 2009), ivermectin was used to reverse the reduced mitoxantrone accumulation in MEF3.8-transduced clones. Tested ivermectin concentrations ranged from 5 to 50 μM because greater concentrations were cytotoxic. Ivermectin showed a significantly greater inhibitory potency on the wild-type protein at all the concentrations tested (5 μM , P =

Real et al.

Table 2. Permeability coefficients for transported transport of nitrofurantoin, enrofloxacin, danofloxacin, and difloxacin (10 μ M) determined in both sides of the Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCKII) monolayers and their bovine ATPbinding cassette transporter G2 (ABCG2) subclones stably transduced with the control vector and both variants [Y581S and wild-type (WT); n = 3 to 6]¹

Drug	Subclone	$\begin{array}{c} \text{BL-AP,} \\ \times \ 10^{-6} \ \text{cm/s} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{AP-BL,} \\ \times \ 10^{-6} \ \text{cm/s} \end{array}$	Ratio BL-AP/AP-BL
Nitrofurantoin	LZRS Y581S-ABCG2 WT-ABCG2	4.5 ± 0.4 9.7 ± 0.5 10.7 ± 0.2	6.4 ± 0.3 4.4 ± 0.8 6.0 ± 0.3	$egin{array}{l} 0.7 \pm 0.1 \ 2.3 \pm 0.3^{ m ab} \ 1.8 \pm 0.1^{ m a} \end{array}$
Enrofloxacin	LZRS Y581S-ABCG2 WT-ABCG2	14.4 ± 0.1 21.6 ± 0.6 17.6 ± 0.2	$\begin{array}{c} 14.7 \pm 0.2 \\ 7.0 \pm 0.1 \\ 6.5 \pm 0.3 \end{array}$	$egin{array}{c} 0.9 \pm 0.1 \ 3.1 \pm 0.1^{ m ab} \ 2.7 \pm 0.2^{ m a} \end{array}$
Danofloxacin	LZRS Y581S-ABCG2 WT-ABCG2	8.4 ± 0.5 13.9 ± 1.1 14.8 ± 0.2	10.2 ± 0.7 3.5 ± 0.2 6.7 ± 0.8	$egin{array}{c} 0.8 \pm 0.1 \ 3.9 \pm 0.1^{ m ab} \ 2.3 \pm 0.3^{ m a} \end{array}$
Difloxacin	LZRS Y581S-ABCG2 WT-ABCG2	$\begin{array}{c} 12.1 \pm 1.0 \\ 17.9 \pm 3.8 \\ 11.9 \pm 0.6 \end{array}$	8.5 ± 0.5 4.3 ± 0.1 7.4 ± 0.3	$egin{array}{rl} 1.3 \pm 0.1 \ 3.3 \pm 0.3^{ m ab} \ 1.6 \pm 0.1^{ m a} \end{array}$

^aY581S and WT ratios were different from the vector control (P < 0.001).

^bY581S ratios differed from WT [P = 0.024 for nitrofurantoin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); P = 0.035 for enrofloxacin (Sigma-Aldrich); P = 0.001 for danofloxacin (Sigma-Aldrich); and P = 0.008 for difloxacin (Sigma-Aldrich)].

¹BL-AP: basal-apical; AP-BL: apical-basal; LZRS: control vector.

0.017; 10 μM , P = 0.001; 25 μM , P = 0.008; 50 μM , P = 0.003; Figure 7D). No effect (P = 0.422) of ivermectin was observed on the vector-transduced cells. Therefore, our results demonstrate that wild-type ABCG2 and the Y581S variant can be differentially inhibited.

DISCUSSION

The ABCG2 transporter is situated in the apical membrane of epithelial cells of the intestine and renal tubule and in the bile canalicular membrane of hepatocytes. This enables ABCG2 to limit the oral availability of its substrates by mediating their hepatobiliary, intestinal, and renal excretion, thus influencing the pharmacokinetics of many drugs. In addition, ABCG2 expression in the blood-brain barrier contributes to limit brain penetration of xenobiotics. Genetic variability in ABCG2 may explain a component of the interindividual variability in drug disposition, ultimately resulting in differences in drug pharmacokinetics, toxicity, and response. As an example, the Q141K variant in humans has been related to altered pharmacokinetics of several substrates (Cusatis and Sparreboom, 2008; Keskitalo et al., 2009), and more recently, it has been reported as a loss-of-function mutation that causes hyperuricemia and gout in humans (Woodward et al., 2009).

Because ABCG2 expression is induced during lactation in the mammary gland of several species including ruminants (Jonker et al., 2005; Pulido et al., 2006; Wu et al., 2008) and is one of the main determinants of xenotoxin presence in milk, polymorphisms in this protein are of great pharmacologic, toxicologic, and economic relevance in ruminants. The missense A/C mutation in bovine ABCG2 exon 14, encoding a substitution of Tyr-581 to Ser (Y581S) that affects the fifth extracellular region of the ABCG2 transporter, has been previously proposed as a quantitative trait nucleotide on bovine chromosome 6, with the Tyr-encoding A allele being associated to increased fat and protein percentages and reduced milk yield in 2 different populations [i.e., Holstein and Norwegian Red cattle populations (Cohen-Zinder et al., 2005; Olsen et al., 2007)]. The allele substitution effects were also similar in the 2 populations, corresponding to approximately 0.15% protein and 0.4% fat in Norwegian Red cattle, and 0.13% protein and 0.09% fat in the Holstein population. Even recently, a positive influence of the C allele on fertility has been suggested (Komisarek and Dorynek, 2009).

The Y581S ABCG2 allele has been found in the Belgian Blue (beef), Belgian Blue Mix, British Friesian, Bohemian Red, East Anatolian Red, German Angus, German Black Pied, German Brown, German Simmental, Israeli Holstein, Menorquina, and US Holstein breeds (Ron et al., 2006). In addition, wild-type ABCG2 allele was found to be fixed in buffalo (*Bubalus bubalis*; Tantia et al., 2006). Cross-species comparison of the AA residue in the same position revealed that goat, sheep, cow, and dog had Tyr, whereas pig, human, monkey, mouse, and rat had Phe (Cohen-Zinder et al., 2005; Wu et al., 2008). Both Tyr and Phe are aromatic acids, whereas Ser is a nucleophilic acid.

To analyze the functional significance of the Y581S SNP and the pharmacological and toxicological relevance of this polymorphism, we stably expressed wildtype ABCG2 and the Y581S variant in MDCKII and MEF3.8 cells. Using the MDCKII-transduced cells, 3 veterinary antibiotics were identified as new substrates of the bovine ABCG2 protein. Transcellular transport data in MDCKII cells clearly showed that danofloxacin, enrofloxacin and difloxacin are transported by bovine



Figure 7. Expression of bovine wild-type (WT) ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) and the Y581S variant in stably transduced MEF3.8 clones. Panel A: Western blot analysis of selected clones performed with 20 µg of protein per lane and probed with monoclonal antibody BXP-53 (Monosan, Uden, the Netherlands) and β-actin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for loading control. The ABCG2 was detected as a band of approximately 70 kDa. No signal was detected in the plasmid LZRS4 (pLZRS4) vector control cells. Protein samples were collected at the indicated time points (T = 0, T = 8, wk). Panel B: green fluorescence protein (GFP) expression analysis of the same clones shown in panel A. Mean GFP fluorescence was measured at the indicated time points (T = 0, T = 8, wk) by flow cytometry and represented in terms of relative arbitrary units (units of fluorescence, median). The bars indicate the means \pm SE from triplicate samples. Panel C: ABCG2 membrane immunolocalization performed in transduced cells using monoclonal antibody BXP-53 (Monosan) and Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibody (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA). Confocal laser scanning microscopy images are shown. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenvlindole (DAPI) to identify individual cells. Representative cross-section images are included (original magnification, $60\times$). No membrane fluorescence was detected in the pLZRS4 vector control cells. Images have been enhanced for maximal contrast between the black background and fluorescence and were not intended for quantitative determination of ABCG2 expression. Panel D: effect of ivermectin on mitoxantrone accumulation mediated by WT-ABCG2 and the Y581S variant. The MEF3.8-transduced cells were preincubated with ivermectin at different concentrations $(0 \text{ to } 50 \ \mu M)$. Possible background fluorescence of ivermectin inhibitors was checked in appropriate channels, but the fluorescence was negligible. The results shown are the means; error bars indicate the SE (n = 3 to 6). *P = 0.017 at 5 μM ; P = 0.001 at 10 μM ; P = 0.008 at 25 μM ; P = 0.003 at 50 μ M, comparing the difference between WT-ABCG2 and the Y581S variant.

ABCG2, which was further confirmed by the specific inhibition of the transporter with Ko143. The concentration used for the tested compounds in these transport assays (10 μM) is within the range of the reported plasma and tissue levels of these fluoroquinolones after their administration to cattle (Ismail, 2007; Mestorino et al., 2009; Idowu et al., 2010). The fact that these veterinary fluoroquinolones are bovine ABCG2 substrates might affect their clinical applications because numerous factors affect the function of transporters and, consequently, their substrate intestinal absorption, hepatobiliary, renal, and milk excretion. These factors include natural feed components (Pérez et al., 2009), comedication (Breedveld et al., 2006), sex (Merino et al., 2005b), and genetic variation (Noguchi et al., 2009) among others.

The effect of the Y581S SNP on drug transcellular transport by bovine ABCG2 was assessed using the stably transduced MDCKII cell model. Our results showed differential transcellular transport of wild-type ABCG2 and the Y581S variant, with a greater activity corresponding to the latter. Differences in activity between transporters carrying a single AA difference have been demonstrated (Sissung et al., 2010). Although mutations in ABC genes often result in decreased activity (Cascorbi, 2006), several examples of increased activity associated to human ABCG2 SNP have been reported. In this way, the R482G and R482T variants show increased transport and ATP hydrolytic-activity for various compounds (Ozvegy et al., 2002). Another ABCG2 variant, I206L [so far, only identified in Hispanic livers (Zamber et al., 2003)], also exhibits 2 to 3 times greater drug resistance capacity than that of wild-type protein (Vethanayagam et al., 2005). These authors suggest that the increased transport activity of I206L could be the result of greater affinity of substrates or augmented transport efficiency for this protein variant. The latter seems to be the case for bovine Y581S because the relative V_{MAX} value for mitoxantrone efflux was significantly greater for the Y581S variant, thus indicating greater efflux capacity. These results were in correlation with our previous preliminary data obtained in transiently transfected fetal ovine fibroblasts (Merino et al., 2009).

The observation that Y581S SNP correlates with different transcellular transport activities is highly relevant because this SNP could potentially influence intestinal absorption, hepatobiliary, renal and milk excretion, and brain penetration of its substrates. For instance, the 3 identified substrates danofloxacin, enrofloxacin, and difloxacin have clearly established withdrawal periods in milk from ruminants, and the fact that they are transported differently depending on ABCG2 genotype could imply important economic consequences regarding modifications in withdrawal time of the drug milk residues depending on the individual genotypes. The effects of the potential presence of drug residues in milk are related to hypersensitivity reactions, specific toxic effects, increase of resistance to antibiotics, and changes in intestinal microflora of consumers of dairy products (McManaman and Neville, 2003). The potential presence of chemical residues, particularly antibiotics, could delay (if not totally prevent) the bacteriological processes used in the manufacture of certain dairy products and are one of the causes of reduced milk payment to milk producers.

In addition, the 3 compounds identified as bovine ABCG2 substrates are fluoroquinolones whose activity is concentration dependent, and concentrations below the therapeutic index potentially due to ABCG2 SNP could be associated with insufficient antibiotic activity and rapid emergence of resistance (Michot et al., 2004). Finally, increased concentrations of the fluoroquinolones could increase the incidence of adverse effects not only in adults but also in newborns. Adverse effects such as arthropathy have been observed in young animals after administration of quinolones.

In any case, this SNP could potentially modify blood, tissue, or milk concentrations of ABCG2 substrates, and this in turn could affect therapeutic success, increase the risk of toxicity, the effect on the newborn, and the development of resistance microorganisms or modify the risk of drug residues.

In addition, our results with the transduced MEF3.8 cells confirm our previous findings on the interaction of the macrocyclic lactone ivermectin with bovine ABCG2 using transiently transfected fibroblasts (Merino et al., 2009) and show a different inhibition effect of this compound on the activity of wild-type ABCG2 and the Y581S variant. Macrocyclic lactones belong to a large family of structurally related compounds widely used for parasite treatment in veterinary and human medicine. Ivermectin has been previously identified as an inhibitor of murine and human BCRP (Muenster et al., 2008; Jani et al., 2011). Here we show that this macrocyclic lactone differentially interacts with each bovine ABCG2 variant. Recently, we have shown that ivermectin can affect in vivo danofloxacin secretion into milk in ruminants (Real et al., 2011). Our present results suggest that the effect of ivermectin on the disposition of ABCG2 substrates in intestine, liver, and kidney where ABCG2 affects drug absorption, elimination, or milk secretion of its substrates may vary among individuals due to the existence of the Y581S SNP, potentially affecting drug efficacy and risk of drug residues in milk.

The functional difference observed for the Y581S variant may also influence the bioavailability of toxins present in food. For example, phytoporphyrin, a natural metabolite of chlorophyll that acts as a photosensitizer in livestock, has been found to be a substrate of ABCG2 (Robey et al., 2006). Therefore, the possibility exists that variable activity of the transporter due to polymorphisms in the ABCG2 gene in cattle (or prolonged exposure to modulators) could correlate with different genetic predisposition to photosensitivity. In support of this hypothesis is the finding of skin phototoxicity in *Abcq2*-knockout mice (Jonker et al., 2002) and the suggestion that certain human ABCG2 polymorphisms could enhance the potential risk of photosensitivity (Tamura et al., 2007). In addition, in a recent report, a defect in feline ABCG2 has been related to fluoroquinolone-induced retinal degeneration due to photosensitivity in cats (Ramirez et al., 2011). These authors suggest that the potential for fluoroquinolone retinal toxicity must be considered for individuals with ABCG2 polymorphisms.

Changes in the functionality of ABCG2 caused by genetic polymorphism could also potentially affect milk vitamin composition. van Herwaarden et al. (2007) showed riboflavin transport into the lactating mammary gland; however, its cofactor FAD can enter the milk independently of Bcrp1. This partial redundancy explains why no obvious vitamin B_2 deficiency was observed in $Abcg2^{-/-}$ pups. However, under more natural conditions than in a mouse facility or depending on the animal genotype, ABCG2-mediated transport of riboflavin into milk could potentially affect the health condition of the suckling animals, including calves. Whether the bovine Y581S SNP could affect riboflavin transfer into milk remains to be determined.

The cell culture models we have generated may be a valuable tool for functional analyses of SNP variants of bovine ABCG2 gene, including transcellular transport and inhibition assays, as well as for the identification of new ABCG2 substrates. The developed approaches represent an investment toward safer therapeutic practice and enhanced risk assessment related to drug residues in milk.

LITERATURE CITED

- Allen, J. D., R. F. Brinkhuis, L. van Deemter, J. Wijnholds, and A. H. Schinkel. 2000. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. Cancer Res. 60:5761–5766.
- Allen, J. D., A. van Loevezijn, J. M. Lakhai, M. van der Valk, O. van Tellingen, G. Reid, J. H. Schellens, G. J. Koomen, and A. H. Schinkel. 2002. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. Mol. Cancer Ther. 1:417–425.
- Bardsley, W. G. 2001. SIMFIT. Simulation, Fitting, Statistics and Plotting. Version 5.4. Reference Manual. University of Manchester, Manchester, UK.
- Breedveld, P., J. H. Beijnen, and J. H. Schellens. 2006. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. Trends Pharmacol. Sci. 27:17–24.
- Cascorbi, I. 2006. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. Pharmacol. Ther. 112:457–473.
- Cohen-Zinder, M., E. Seroussi, D. M. Larkin, J. J. Loor, A. Evertsvan der Wind, J. H. Lee, J. K. Drackley, M. R. Band, A. G. Hernandez, M. Shani, H. A. Lewin, J. I. Weller, and M. Ron. 2005. Identification of a missense mutation in the bovine *ABCG2* gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. Genome Res. 15:936–944.
- Cusatis, G., and A. Sparreboom. 2008. Pharmacogenomic importance of ABCG2. Pharmacogenomics 9:1005–1009.
- Hegedus, C., G. Szakács, L. Homolya, T. I. Orbán, A. Telbisz, M. Jani, and B. Sarkadi. 2009. Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: An update on in vitro functional assays. Adv. Drug Deliv. Rev. 61:47–56.
- Idowu, O. R., J. O. Peggins, R. Cullison, and J. Bredow. 2010. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers after intravenous administration of enrofloxacin. Res. Vet. Sci. 89:230–235.
- International Transporter Consortium, K. M. Giacomini, S. M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, K. A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R. B. Kim, C. A. Lee, M. Niemi, J. W. Polli, Y. Sugiyama, P. W. Swaan, J. A. Ware, S. H. Wright, S. W. Yee, M. J. Zamek-Gliszczynski, and L. Zhang. 2010. Membrane transporters in drug development. Nat. Rev. Drug Discov. 9:215–236.

- Ismail, M. 2007. Disposition kinetics of difloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in calves. Vet. Res. Commun. 31:467–476.
- Jani, M., I. Makai, E. Kis, P. Szabó, T. Nagy, P. Krajcsi, and A. Lespine. 2011. Ivermectin interacts with human ABCG2. J. Pharm. Sci. 100:94–97.
- Jonker, J. W., M. Buitelaar, E. Wagenaar, M. A. Van Der Valk, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, T. Plosch, F. Kuipers, R. P. Elferink, H. Rosing, J. H. Beijnen, and A. H. Schinkel. 2002. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll derived dietary phototoxin and protoporphyria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:15649–15654.
- Jonker, J. W., G. Merino, S. Musters, A. E. van Herwaarden, E. Bolscher, E. Wagenaar, E. Mesman, T. C. Dale, and A. H. Schinkel. 2005. The Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. Nat. Med. 11:127–129.
- Jonker, J. W., J. W. Smit, R. F. Brinkhuis, M. Maliepaard, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, and A. H. Schinkel. 2000. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. J. Natl. Cancer Inst. 92:1651–1656.
- Keskitalo, J. E., O. Zolk, M. F. Fromm, K. J. Kurkinen, P. J. Neuvonen, and M. Niemi. 2009. ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. Clin. Pharmacol. Ther. 86:197–203.
- Kinsella, T. M., and G. P. Nolan. 1996. Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. Hum. Gene Ther. 7:1405–1413.
- Komisarek, J., and Z. Dorynek. 2009. Effect of ABCG2, PPARG-C1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. J. Appl. Genet. 50:125–132. http://www. ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubM ed&list_uids=19193979&dopt=Abstract
- Marazuela, M. D., and M. C. Moreno-Bondi. 2004. Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. J. Chromatogr. A 1034:25–32.
- McManaman, J. L., and M. C. Neville. 2003. Mammary physiology and milk secretion. Adv. Drug Deliv. Rev. 55:629–641.
- Merino, G., A. I. Alvarez, M. M. Pulido, A. J. Molina, A. H. Schinkel, and J. G. Prieto. 2006. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability pharmacokinetics and milk secretion. Drug Metab. Dispos. 34:690–695.
- Merino, G., J. W. Jonker, E. Wagenaar, A. E. van Herwaarden, and A. H. Schinkel. 2005a. The Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. Mol. Pharmacol. 67:1758–1764.
- Merino, G., R. Real, M. F. Baro, L. Gonzalez-Lobato, J. G. Prieto, A. I. Alvarez, and M. M. Marques. 2009. Natural allelic variants of bovine ATP-binding cassette transporter ABCG2: Increased activity of the Ser581 variant and development of tools for the discovery of new ABCG2 inhibitors. Drug Metab. Dispos. 37:5–9.
- Merino, G., A. E. van Herwaarden, E. Wagenaar, J. W. Jonker, and A. H. Schinkel. 2005b. Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. Mol. Pharmacol. 67:1765–1771.
- Mestorino, N., M. L. Marchetti, E. Turic, J. Pesoa, and J. Errecalde. 2009. Concentrations of danofloxacin 18% solution in plasma, milk and tissues after subcutaneous injection in dairy cows. Anal. Chim. Acta 637:33–39.
- Michiels, F., R. A. van der Kammen, L. Janssen, G. Nolan, and J. G. Collard. 2000. Expression of Rho GTPases using retroviral vectors. Methods Enzymol. 325:295–302.
- Michot, J. M., F. van Bambeke, M. P. Mingeot-Leclercq, and P. M. Tulkens. 2004. Active efflux of ciprofloxacin from J774 macro-

phages through an MRP-like transporter. Antimicrob. Agents Chemother. $48{:}2673{-}2682.$

- Muenster, U., B. Grieshop, K. Ickenroth, and M. J. Gnoth. 2008. Characterization of substrates and inhibitors for the in vitro assessment of Bcrp mediated drug-drug interactions. Pharm. Res. 25:2320–2326.
- Noguchi, K., K. Katayama, J. Mitsuhashi, and Y. Sugimoto. 2009. Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ ABCG2) in chemotherapy. Adv. Drug Deliv. Rev. 61:26–33.
- Olsen, H. G., H. Nilsen, B. Hayes, P. R. Berg, M. Svendsen, S. Lien, and T. Meuwissen. 2007. Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the ABCG2 gene affecting milk composition of dairy cattle. BMC Genet. 8:32.
- Ozvegy, C., A. Váradi, and B. Sarkadi. 2002. Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. J. Biol. Chem. 277:47980– 47990.
- Pavek, P., G. Merino, E. Wagenaar, E. Bolscher, M. Novotna, J. W. Jonker, and A. H. Schinkel. 2005. Human breast cancer resistance protein: Interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5b)pyridine, and transport of cimetidine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 312:144–152.
- Pérez, M., R. Real, G. Mendoza, G. Merino, J. G. Prieto, and A. I. Alvarez. 2009. Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: Modulation by isoflavones. J. Vet. Pharmacol. Ther. 32:498–502.
- Pulido, M. M., A. J. Molina, G. Merino, J. G. Prieto, and A. I. Álvarez. 2006. Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. J. Vet. Pharmacol. Ther. 29:279–287.
- Ramirez, C. J., J. D. Minch, J. M. Gay, S. M. Lahmers, D. J. Guerra, G. J. Haldorson, T. Schneider, and K. L. Mealey. 2011. Molecular genetic basis for fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats. Pharmacogenet. Genomics 21:66–75.
- Real, R., E. Egido, M. Pérez, L. González-Lobato, B. Barrera, J. G. Prieto, A. I. Alvarez, and G. Merino. 2011. Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: Interaction with ivermectin. J. Vet. Pharmacol. Ther. 34:313–321.
- Robey, R. W., P. A. Fetsch, O. Polgar, M. Dean, and S. E. Bates. 2006. The livestock photosensitizer, phytoporphyrin (phylloerythrin), is a substrate of the ATP-binding cassette transporter ABCG2. Res. Vet. Sci. 81:345–349.

- Ron, M., M. Cohen-Zinder, C. Peter, J. I. Weller, and G. Erhardt. 2006. Short communication: A polymorphism in ABCG2 in Bos indicus and Bos taurus cattle breeds. J. Dairy Sci. 89:4921– 4923.
- Sissung, T. M., C. E. Baum, C. T. Kirkland, R. Gao, E. R. Gardner, and W. D. Figg. 2010. Pharmacogenetics of membrane transporters: An update on current approaches. Mol. Biotechnol. 44:152–167.
- Tamura, A., Y. Onishi, R. An, S. Koshiba, K. Wakabayashi, K. Hoshijima, W. Priebe, T. Yoshida, S. Kometani, T. Matsubara, K. Mikuriya, and T. Ishikawa. 2007. In vitro evaluation of photosensitivity risk related to genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2 and inhibition by drugs. Drug Metab. Pharmacokinet. 22:428–440.
- Tantia, M. S., R. K. Vijh, B. P. Mishra, B. Mishra, S. T. Kumar, and M. Sodhi. 2006. DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. BMC Vet. Res. 2:32.
- van Herwaarden, A. E., E. Wagenaar, G. Merino, J. W. Jonker, H. Rosing, J. H. Beijnen, and A. H. Schinkel. 2007. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B₂) into milk. Mol. Cell. Biol. 27:1247– 1253.
- Vethanayagam, R. R., H. Wang, A. Gupta, Y. Zhang, F. Lewis, J. D. Unadkat, and Q. Mao. 2005. Functional analysis of the human variants of breast cancer resistance protein: I206L, N590Y, and D620N. Drug Metab. Dispos. 33:697–705.
- Woodward, O. M., A. Köttgen, J. Coresh, E. Boerwinkle, W. B. Guggino, and M. Köttgen. 2009. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:10338–10342.
- Wu, H. J., J. Luo, N. Wu, K. Matand, L. J. Zhang, X. F. Han, and B. J. Yang. 2008. Cloning, sequence and functional analysis of goat ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2). Mol. Biotechnol. 39:21–27.
- Yue, W., K. Abe, and K. L. Brouwer. 2009. Knocking down breast cancer resistance protein (Bcrp) by adenoviral vector-mediated RNA interference (RNAi) in sandwich-cultured rat hepatocytes: A novel tool to assess the contribution of Bcrp to drug iliary excretion. Mol. Pharm. 6:134–143.
- Zamber, C. P., J. K. Lamba, K. Yasuda, J. Farnum, K. Thummel, J. D. Schuetz, and E. G. Schuetz. 2003. Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. Pharmacogenetics 13:19–28.