



**universidad
de león**

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE
ANTIINFLAMATORIOS Y ANTIPARASITARIOS CON EL
TRANSPORTADOR ABCG2: EFECTO EN LA SEGURIDAD
DE LA LECHE**

Esther Blanco Paniagua

Programa de Doctorado

Biomedicina y Ciencias de la Salud

Directoras de Tesis

Dra. Ana Isabel Álvarez de Felipe

Dra. Gracia Merino Peláez

León, 2023

Artículo I. Role of the Abcg2 transporter in plasma levels and tissue accumulation of the anti-inflammatory tolfenamic acid in mice. Blanco-Paniagua E, García-Lino AM, García-Mateos D, Álvarez AI, and Merino G. *Chemico-Biological Interactions* (2021) 345:109537 doi: 10.1016/j.cbi.2021.109537. IF: 5.1 Q1.

Artículo II. Abcg2 transporter affects plasma, milk and tissue levels of meloxicam. García-Lino AM, Blanco-Paniagua E, Astorga-Simón EN, Álvarez-Fernández L, García-Mateos D, Álvarez-Fernández I, Álvarez AI, and Merino G. *Biochemical Pharmacology* (2020) 175:113924 doi: 10.1016/j.bcp.2020.113924. IF: 5.8 Q1.

Artículo III. Ivermectin inhibits ovine ABCG2-mediated in vitro transport of meloxicam and reduces its secretion into milk in sheep. Blanco-Paniagua E, García-Lino AM, Álvarez-Fernández L, Álvarez AI, and Merino G. *Research in Veterinary Science* (2022) 153:88-91 doi: 10.1016/j.rvsc.2022.10.019. IF: 2.4 Q1.

Artículo IV. Secretion into Milk of the Main Metabolites of the Anthelmintic Albendazole Is Mediated by the ABCG2/BCRP Transporter. Blanco-Paniagua E, Álvarez-Fernández L, García-Lino AM, Álvarez AI, and Merino G. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2022) 66: e00062-22 doi: 10.1128/aac.00062-22 IF: 4.9 Q1.

Artículo V. Effect of coadministration of macrocyclic lactones on the milk residues of the metabolites of the anthelmintic albendazole in sheep. *Manuscript in preparation.*

Artículo VI. Role of the Abcg2 transporter in the secretion into milk of the anthelmintic clorsulon: interaction with ivermectin. Blanco-Paniagua E, Álvarez-Fernández L,

Rodríguez-Alonso A, Millán-García A, Álvarez AI, and Merino G. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2023) 67(5): e00095-23 doi: 10.1128/aac.00095-23 IF: 4.9 Q1.

Artículo VII. Coadministration of ivermectin and abamectin affects milk pharmacokinetics of the antiparasitic clorsulon in Assaf sheep. *Manuscript in preparation.*

Artículo VIII. Role of ABCG2 efflux transporter in the pharmacokinetics and secretion into milk of the anthelmintic closantel: in vivo studies in mice and sheep. *Manuscript in preparation.*

Además, durante todo el período predoctoral, la doctoranda ha colaborado en otros estudios dando lugar a las siguientes publicaciones:

- ✓ **Role of ABCG2 in Secretion into Milk of the Anti-Inflammatory Flunixin and Its Main Metabolite: In Vitro-In Vivo Correlation in Mice and Cows.** García-Mateos D, García-Lino A.M, Álvarez-Fernández I, Blanco-Paniagua E, de la Fuente A, Álvarez A.I, and Merino G *Drug Metabolism and Disposition* (2019) 47:516–524, doi: 10.1124/dmd.118.085506. IF: 3.2 Q2.
- ✓ **Transporters in the Mammary Gland—Contribution to Presence of Nutrients and Drugs into Milk.** García-Lino A.M, Álvarez-Fernández I, Blanco-Paniagua E, Merino G, and Álvarez A.I. *Nutrients* (2019) 11:2372, doi: 10.3390/nu11102372. IF: 4.5 Q1.
- ✓ **Role of eprinomectin as inhibitor of the ruminant ABCG2 transporter: Effects on plasma distribution of danofloxacin and meloxicam in sheep.** García-Lino AM, García-Mateos D, Álvarez-Fernández I, Blanco-Paniagua E, Medina JM, Merino G, Álvarez AI. *Research in Veterinary Science* (2021) 136:478–483, doi: 10.1016/j.rvsc.2021.03.026. IF: 2.5 Q1.

- ✓ **In vitro interaction of the pesticides flupyradifurone, bupirimate and its metabolite ethirimol with the ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2).** Ben Halima N, Álvarez-Fernández L, Blanco-Paniagua E, Abid-Essefi S, Guedri Y, Merino G. *Toxicology Letters* (2023) 380:23-30, doi: 10.1016/j.toxlet.2023.03.012 IF: 3.5 Q2

Los estudios realizados por la doctoranda durante el desarrollo de esta Tesis doctoral han dado lugar a las siguientes comunicaciones a congresos nacionales e internacionales:

-VI Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La Aventura de la Ciencia y la Tecnología. León, España (2020).

- **Comunicación oral:** Evaluación de la interacción de xenobióticos con el transportador ABCG2: efecto en la seguridad de la leche. Esther Blanco Paniagua, Laura Álvarez, Ana. I Álvarez y Gracia Merino.

-II Congreso Anual de Estudiantes de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Elche, España (2022).

- **Comunicación oral:** "Role of the Abcg2 transporter in plasma levels and tissue accumulation of the anti-inflammatory tolfenamic acid in mice". Esther Blanco, Laura Álvarez, Ana Isabel Álvarez y Gracia Merino.

- VIII Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La Aventura de la Ciencia y la Tecnología. León, España (2022).

- **Comunicación póster:** Efecto de la coadministración de lactonas macrocíclicas sobre la secreción a leche de los metabolitos del antiparasitario albendazol en oveja. E. Blanco, L. Álvarez, B. San Miguel, G. Rivas, A.I Álvarez y G. Merino.

-Gordon Research Conference on Membrane Transport Proteins. Castelldefels, Barcelona, España (2022).

- **Comunicación póster 1.** "The role of the ABCG2/BCRP transporter in the secretion into milk of the main metabolites of the anthelmintic albendazole". Esther Blanco Paniagua, Laura Álvarez Fernández, Ana I. Álvarez y Gracia Merino.
- **Comunicación póster 2.** "The ABCG2/BCRP efflux transporter affects the pharmacokinetics of the anthelmintic closantel in knockout mice". Aldo Gómez-Contreras, Esther Blanco Paniagua, Ana I. Álvarez, Joana M. Planas, Gracia Merino y M. Emilia Juan.

-I Congreso Anual de Estudiantes de Biociencias (CEEBI). Granada, España (2022).

- **Comunicación póster:** Papel de ABCG2 en el transporte *in vitro* de los metabolitos del antiparasitario albendazol. Esther Blanco-Paniagua, Laura Álvarez-Fernández, Alicia Millán-García, Ana I. Álvarez y Gracia Merino.

-15th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT). Bruges, Belgium (2023).

- **Comunicación póster:** “Coadministration of macrocyclic lactones affects milk residues of the antiparasitic clorsulon in Assaf sheep”. Millán-García A., Álvarez-Fernández L, Blanco-Paniagua E., San Miguel B., Álvarez A.I y Merino G.

Además, la doctoranda ha colaborado en otros estudios dando lugar a las siguientes comunicaciones a congresos nacionales e internacionales:

-14th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT). Wroclaw, Polonia (2018).

- **Comunicación póster:** “*In vitro* transepithelial transport of the fluoroquinolone flumequine by the ruminant ABCG2 transporter”. Dafne García-Mateos, Alba M. García-Lino, Indira Álvarez-Fernández, Esther Blanco-Paniagua, Ana I. Álvarez y Gracia Merino.

-I Congreso Anual de Estudiantes de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Elche, España (2021)

- **Comunicación póster 1:** “Pharmacological interactions with the ABCG2 membrane transporter: studies with Diclofenac”. Esther Blanco Paniagua, Laura Álvarez, Ana. I Álvarez y Gracia Merino.
- **Comunicación póster 2:** “*In vitro* interaction of anthelmintic morantel with ABCG2 membrane transporter”. Laura Álvarez, Esther Blanco, Ana I. Álvarez y Gracia Merino.

-II Congreso Anual de Estudiantes de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Elche, España (2022).

- **Comunicación póster:** Interacción farmacológica del antiparasitario oxantel con el transportador de membrana ABCG2. Laura Álvarez, Esther Blanco, Ana Isabel Álvarez y Gracia Merino.

-VIII Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La Aventura de la Ciencia y la Tecnología. León, España (2022).

- **Comunicación póster 1.** Papel del transportador de membrana ABCG2 en el transporte *in vitro* de nitroxylinil. L. Álvarez, E. Blanco, A. Millán, B. Rubio, A.I Álvarez y G. Merino.
- **Comunicación póster 2.** Interacción del lumicromo con el transportador de membrana ABCG2/BCRP. A. Millán, L. Álvarez, E. Blanco, A.I Álvarez, G. Merino y B. Rubio.

-Gordon Research Conference on Membrane Transport Proteins. Castelldefels, Barcelona, España (2022).

- **Comunicación póster 1.** “The ABCG2 membrane protein transports the main metabolite of fungicide thiabendazole”. Álvarez Fernández L., Blanco Paniagua E., Álvarez A.I. y Merino G.
- **Comunicación póster 2.** “Inhibition of the ABCG2 membrane transporter by pesticides”. Gracia Merino, David García-Gutiérrez, Laura Álvarez, Esther Blanco y Ana I. Álvarez.

-I Congreso Anual de Estudiantes de Biociencias (CEEBI). Granada, España (2022).

- **Comunicación póster:** Interacción farmacológica del transportador de membrana ABCG2 con la sulfona del antihelmíntico fenbendazol. Laura Álvarez-Fernández, Esther Blanco-Paniagua, Sheila Díez-Casado, Alicia Millán-García, Ana I. Álvarez y Gracia Merino.

-15th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT). Bruges, Belgium (2023).

- **Comunicación póster 1.** “Analysis of the effect of the bovine ABCG2 polymorphism Y581S in biodistribution of endogenous compounds using untargeted metabolomics”. Álvarez-Fernández L. Boyle N.R., Blanco-Paniagua E., Millán-García A., de la Fuente A. y Merino G.
- **Comunicación póster 2.** “*In vitro* interaction of melatonin and its main metabolites with the ovine and bovine ABCG2 transporter”. Merino G., Álvarez-Fernández L., García-Lino A.M., Millán-García A., Blanco-Paniagua E. y Álvarez A.I.

FINANCIACIÓN

El desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la concesión de una Ayuda para la realización de estudios de Doctorado en el marco del Programa Propio de Investigación de la Universidad de León comprendida entre enero 2019 a agosto 2019. Posteriormente, se ha desarrollado gracias a la concesión de una Ayuda Predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación Cultura y Deporte del Gobierno de España (FPU18/01559) comprendida entre los años 2019 a 2023.

Durante este periodo la doctoranda también ha disfrutado de una beca del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España (EST22/00383) para la realización de una estancia breve de 3 meses en un centro de investigación internacional en el Instituto Suizo de Salud Tropical y Pública de la Universidad de Basel (Suiza) comprendida entre los meses de septiembre a diciembre de 2022 y tutorizada por la Dra. Jennifer Keiser.

Además, para la realización de esta tesis doctoral se ha contado con la siguiente financiación:

-Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España. Proyecto de Investigación Fundamental del Plan Nacional. Título del proyecto: "La actividad del transportador de membrana ABCG2/BCRP en rumiantes como potencial marcador de la calidad y seguridad de la leche". REF: AGL2015-65626-R. Duración: 2016-2018. Investigadores principales: Gracia Merino Peláez y Ana I. Álvarez.

-Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Agencia Estatal de Investigación. Proyecto de Investigación Fundamental del Plan Nacional. Título del proyecto: "Papel del transportador ABCG2 y sus polimorfismos en la excreción de agentes antiparasitarios y pesticidas en leche de rumiantes." REF: RTI2018-100903-B-I00. Duración: 2019-2022. Investigadores principales: Gracia Merino Peláez y Ana I. Álvarez.

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas, sin duda, son las que más me ha costado escribir, ya que resulta imposible expresar con palabras lo agradecida que estoy con tantas personas que me han ayudado a llegar hasta aquí. Palabras que escribo con lágrimas en los ojos, lágrimas que mezclan tristeza por el final de una etapa, alegría al sentirme afortunada por haberme cruzado con gente tan maravillosa e ilusión por la nueva etapa.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis la Dra. Ana I. Álvarez y Dra. Gracia Merino la oportunidad que me dieron para realizar este trabajo con ellas y sobre todo, por depositar su confianza en mí para llevarlo a cabo. Han sido muchos días, meses, años de trabajo juntas, con sus momentos buenos y malos, pero al final del camino, uno se da cuenta de todo lo que ha aprendido, y por ello, os lo agradezco.

Todavía recuerdo cómo empezó toda esta aventura. Yo era muy curiosa y tenía claro que era una Bióloga de bata y que quería investigar y trabajar en el laboratorio. Fue en tercer año de carrera cuando, Gracia, me brindaste la oportunidad de adentrarme en este mundo. Quiero expresarte mi agradecimiento por haber confiado en mí desde entonces y por haber apostado por mí. Y a ti Ana, gracias por tu valiosa experiencia, tus consejos, tu inestimable ayuda y tu buen humor, han sido fundamentales en este camino que hemos recorrido juntas. Gracias a ambas, por ayudarme a crecer no solo a nivel profesional sino también personal.

Esta etapa predoctoral me ha permitido explorar nuevas facetas, como por ejemplo, la posibilidad de impartir prácticas en distintos grados. La oportunidad de transmitir los conocimientos que yo había recibido años atrás a nuevos alumnos ha sido gratificante. Y por ello, me gustaría agradecer a los demás profesores y mis compañeros predoctorales del área de Fisiología Animal que tanto me han ayudado en este tema, ya que estoy segura de que en muchas ocasiones he

AGRADECIMIENTOS

sido muy pesada por querer hacerlo lo mejor posible. Quiero agradecer de manera muy especial a Ludy, Héctor, Pudren y Julio, ya que siempre estáis dispuestos a ayudar y habéis hecho que todo sea mucho más sencillo para mí, muchas gracias. Y, por supuesto, quiero agradecer al Equipo A por su acogida, a pesar de ser una de las integrantes más novatas. Gracias por todas esas quedadas en ubicaciones misteriosas donde compartimos mesa, conversación y risas.

La investigación y el trabajo diario en el laboratorio requieren mucho esfuerzo y dedicación, y por supuesto, unos comienzos que implican un aprendizaje intenso y exhaustivo. En este sentido, puedo decir que tuve la fortuna de contar con las mejores. Gracias Dafne, porque me permitiste pegarme a ti como una lapilla y me enseñaste todo. No solamente lo necesario para trabajar en el laboratorio como las técnicas, el manejo de animales, el cultivo de las células..., sino también un aprendizaje a nivel personal que no tengo palabras suficientes para agradecértelo. Gracias por estar siempre, has sido y sigues siendo un apoyo incondicional tanto cuando has estado cerca, como lejos. Y por supuesto, a ti Alba e Indira, gracias, porque completasteis esa atmósfera de buen ambiente en el laboratorio, por toda vuestra ayuda y apoyo absoluto, vuestros consejos, por enseñarme que lo más importante en esta vida es ser buena gente y feliz y por Fascinarme con esa manera tan bonita de transmitir la ciencia. Gracias por vuestros conocimientos, no podéis imaginar lo importante que sois para mí, tanto en lo profesional como, sobre todo, en lo personal. Estoy segura de que sin vosotras, Dafne, Alba e Indira, no hubiera sido posible el inicio de este camino, y gracias a vosotras, he logrado llegar a hasta este final.

Además, justo cuando pensé que llegaban los momentos más difíciles, apareciste tú, Laura, como un salvavidas. Gracias por quedarte, por ser energía pura, por entenderme solo con una mirada y saber cuándo tengo un día bueno o un día malo, por la infinidad de horas juntas, por

AGRADECIMIENTOS

estar siempre dispuesta a todo, por el apoyo incondicional, en definitiva, gracias por estar. Gracias a ti también Alicia, porque a pesar de llegar en el momento final te has convertido en una pieza fundamental de este *team*. Como siempre os he dicho, me siento afortunada de que nuestras vidas se hayan cruzado y todo esto no hubiera sido posible sin vuestra ayuda.

Si algo me ha enseñado esta etapa, es lo fundamental que es rodearse de buena gente y trabajar a gusto. Por ello, me siento afortunada y agradecida de haber conocido a los mejores: mis compañeras y compañeros de laboratorio del INDEGSAL y por supuesto, de vida. Junto con Dafne, Alba, Indira, Laura, Alicia, Estela, Estibaliz, Guille, ambas Andreas, Cova, todas las Cristinas, Itxaso..., gracias por todos esos cafés, los jueves de cañas indispensable, las rutas gastronómicas por la provincia de León, las competiciones semanales de bádminton, las celebraciones navideñas y del verano, las charlas infinitas que son medicina pura para desahogarse, gracias, gracias y gracias. Esta increíble piña que hemos formado ha sido fundamental para haber llegado hasta aquí, y sé que seguirá siéndolo en mi futuro.

Quiero agradecer también a esas chicas de la planta de arriba, Sara, María, Paula, Rebeca, ha sido un increíble descubrimiento y un verdadero lujo trabajar con vosotras. De la misma manera, quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado y ayudado en las aventuras que esta etapa implica. Gracias a los trabajadores de granja experimental de la Universidad, así como las cuadrillas que hacían entretenido y llevadero los largos experimentales con ovejas. Gracias Virginia por tu experiencia y ayuda con el HPLC. Gracias también a las Dra. Joana M. Planas y Dra. M. Emilia Juan, así como el Dr. Aldo Gómez-Contreras, desde Barcelona, por las determinaciones analíticas de masas y su disponibilidad incondicional a la hora de emprender y colaborar en parte de este proyecto. Gracias a todos los que se han unido sin dudarlo

AGRADECIMIENTOS

a todo lo que hemos organizado en estos años para divulgar la ciencia, como los chicos de la Expciencia. Y por supuesto, también a mis chicos y chicas de TFG, siempre tan dispuestos a ayudar y a aprender.

I would like to thank to Dr. Jennifer Keiser to give me the opportunity to do a research stay in her laboratory. I also would like to thank to all my Wormy friends: Cecile, Ana, Dominik, Rafael, Stefan, Lea, Tanja, Viviane, Christian, Max, Julian, Rory, Namitha..., for taking care of me, supporting me and teaching me during my stay. I am grateful not only for sharing your experience and knowledge with me, but also for giving me the opportunity to explore Switzerland and making me feel at home.

Quisiera también agradecer a todas esas personitas que, a pesar de no poder vernos de manera tan frecuente, han sido fundamentales y siempre han sido una ayuda para recargar las pilas. En primer lugar, quiero agradecer a todos mis biólogos favoritos Ana, Elsa, Adri, Sarah, Alicia, Rosa, Santiago, Alba; porque tras pasar los mejores años de nuestra vida estudiando Biología, me siento afortunada de seguir teniéndooos y del apoyo que siempre me habéis mostrado. Gracias, porque a pesar de estar repartidos por el mapa de España, basta con una quedada para renovar las energías y seguir adelante. De igual modo, también quiero agradecer a mis compis de biblioteca, Alberto, Guiomar y Lucía, por acogerme estos últimos meses a su lado, sois unos máquinas y mis opositores preferidos.

Quien me conoce sabe que siempre estaré vinculada a mis pueblos, porque de ahí vengo, de pueblo. Y en ellos tengo a personitas que me han mostrado su apoyo incondicional y quiero agradeceréselo. Gracias a los de toda la vida, los de los veranos infinitos con sus fiestas, sus cervezas en la terraza del bar, los cumpleaños temáticos, los llantos y las risas, gracias, Marta,

AGRADECIMIENTOS

Lucía, Aisling y Sergio. A ti en concreto, Sergio, gracias por ser ese hermano mayor que no tengo, por cuidarnos y estar siempre presente. Amaros es poco. Gracias a toda esa gran familia Paniagua, por ser hogar donde sentirme segura. Gracias también a ti Feri y familia por aconsejarme, apoyarme y enseñarme a cuidar más nuestras raíces, nuestros pueblos.

Quiero también agradecer a toda mi familia, tíos, tías, primos y primas, porque siempre me he sentido muy querida y apoyada por todos y cada uno de vosotros. Mi mención especial es para todos mis abuelos, tanto para los que no pude disfrutar porque se fueron pronto, como para los que disfrute y disfruto cada momento. Gracias a ti Leo, por esos valores que me enseñaste: trabajo, respeto y amor. Tú y la abuela me criasteis, me transmitisteis todos vuestros conocimientos, me regañasteis cuando hice las cosas mal, y por supuesto, habéis sido los primeros en estar orgullosos de mis logros. Afortunadamente, a ti abuela, te sigo agradeciendo que sigas siendo esa mujer tan fuerte y vital, y que estés hoy aquí para ver lo que he conseguido gracias a vosotros.

Si hay alguien que me ha aguantado durante esta etapa, ese has sido tú, mi compañero de viaje, mi ratón, mi futbolista preferido, Yorman. Muchas gracias por tu apoyo incondicional, sobre todo, porque sé que no ha sido fácil. Sé que he pasado por momentos de mucho agobio, cambios, distancia y horas y horas de trabajo. Sin embargo, siempre has estado ahí, apoyándome, ayudándome, sacándome una sonrisa y, por supuesto, transmitiéndome tu positividad. Gracias, amor.

Y por último y más importante, gracias a ti papá, mamá y Lucía. Sois los pilares de mi vida. Todo esto es gracias a vosotros. Gracias, papá y mamá por apoyarme siempre en todo lo que he querido hacer, por ayudarme a conseguir mis metas y sueños. Quiero agradecer no solo vuestro apoyo en estos años en los que he estado trabajando para sacar adelante este proyecto, sino por

AGRADECIMIENTOS

enseñarme y educarme con valores de respeto, esfuerzo, constancia y humildad. Gracias a ellos es que he conseguido llegar hasta aquí, y es con ellos con los que pienso seguir caminando en esta vida. Todos mis logros siempre serán por y para vosotros.

Gracias Lucía por ser no solo hermana, sino amiga, compañera de piso, de biblioteca, de viajes, de aventuras, de cuarentenas, de paseos, de discusiones, de risas y de llantos. Gracias por tus broncas sin sentido, tus deliciosas comidas, tus innumerables consejos de ortografía, las cervezas improvisadas y tu apoyo incondicional. Gracias por ser el rayito de luz en mi vida.

Y a ti Lucía, voy a cogerte prestadas estas palabras tan bonitas que simbolizan perfectamente mi agradecimiento por todos los que habéis hecho posible esta tesis:

~ No se puede separar lo que se ata en el corazón ~

A todos, gracias de corazón.

A mis padres y a mi hermana

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VI
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	8
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1. TRANSPORTADORES DE MEMBRANA ABC	16
3.1.1. ABCG2/BCRP	21
A. Estructura y mecanismo de transporte.....	22
B. Sustratos e inhibidores.....	31
C. Distribución y funciones	36
D. Expresión en glándula mamaria.....	43
E. Modelos animales para el estudio de ABCG2.....	48
F. Interacciones farmacocinéticas mediadas por ABCG2.....	57
3.2. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS.....	62
3.2.1. Ácido tolfenámico	69
3.2.2. Meloxicam	73
3.3. ANTIPARASITARIOS.....	77
3.3.1. Albendazol.....	82
3.3.2. Clorsulón	88
3.3.3. Closantel	91
4. OBJETIVOS	97
5. RESULTADOS.....	101
5.1. PARTE I: ANTIINFLAMATORIOS	102
Artículo I	102
Artículo II	105
Artículo III	108

ÍNDICE DE CONTENIDOS

5.2.	PARTE II: ANTIPARASITARIOS.....	111
5.2.1.	ALBENDAZOL.....	111
	Artículo IV.....	111
	Artículo V.....	114
5.2.2.	CLORSULÓN.....	117
	Artículo VI.....	117
	Artículo VII.....	120
5.2.3.	CLOSANTEL.....	123
	Artículo VIII.....	123
6.	DISCUSIÓN.....	126
6.1.	ANTIINFLAMATORIOS.....	127
6.2.	ANTIPARASITARIOS.....	133
7.	CONCLUSIONES.....	144
8.	CONCLUSIONS.....	149
9.	SUMMARY.....	153
9.1.	Introduction.....	154
9.2.	ABCG2 membrane transporter.....	155
9.3.	Anti-inflammatory drugs.....	157
9.4.	Antiparasitic drugs.....	160
9.5.	Interaction between anti-inflammatory drugs and ABCG2.....	164
9.6.	Interaction between antiparasitic drugs and ABCG2.....	166
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	176

- Figura 1. Estructura de los transportadores ABC.** Representación esquemática de A y B) *full-transporters* tipo ABCB1 y ABCC1, respectivamente, y C) un *half-transporter* como ABCG2. En todos ellos se muestran los dominios TMD (en rojo) y los dominios NBD (encuadrados en gris) con las secuencias conservadas que los caracterizan (adaptada de Al-Shawi, 2011). 17
- Figura 2. Esquema de la estructura de ABCG2.** Este transportador consta de un NBD y un TMD formado por 6 α -hélices transmembrana (TM 1-6). Dentro del TMD, se destacan en azul y marrón los residuos involucrados en la unión del sustrato. En el esquema se destacan el bucle extracelular largo 3 (ECL3) y los motivos de secuencias relevantes en el NBD (Eckenstaler y Benndorf, 2020). 23
- Figura 3. Estructura de ABCG2.** A) Representación esquemática de la topología estructural de ABCG2. Se indican los residuos cruciales para la formación de enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares (C592, C608 y C603) y la glicosilación (N596). B) Representación de la estructura terciaria del transportador ABCG2 dimerizado. Las hélices se representan en los mismos colores que en A (Kapoor *et al.*, 2018). 25
- Figura 4. Estructura de ABCG2 unido a sustrato (*inward-facing*) y unido a ATP (*outward-facing*) según Manolaridis *et al.* (2018).** ABCG2 se representa como un dímero (púrpura, verde). En la configuración *inward-facing*, la unión de una molécula de sustrato como por ejemplo de estrona-3-sulfato (E₃S) tiene lugar en la cavidad 1 dentro del TMD. En este estado, los NBD están enfrentados entre sí. En la configuración *outward-facing*, la unión de dos moléculas de ATP induce la dimerización de los NBD obligándolos a rotar. Dicha rotación se transmite a los TMD mediante el enlace entre NBD y TM1 que empuja todas las hélices- α de TM y, por lo tanto, no deja espacio

para la unión del sustrato. En el espacio extracelular, ECL3 también rota y abre la cavidad 2, permitiendo la liberación del sustrato. Adaptada de Eckenstaler y Benndorf (2020)..... 26

Figura 5. Esquema del mecanismo de transporte de ABCG2. A) En la conformación *inward-facing*, los NBDs se encuentran enfrentados entre sí y los TMDs forman una gran cavidad accesible (cavidad 1 abierta) y una pequeña cavidad inaccesibles (cavidad 2 cerrada), separadas por los residuos de leucina. B) Los sustratos entran desde el citoplasma y se unen a los residuos hidrofóbicos de la cavidad 1. C) La unión de ATP induce una dimerización de ambos NBDs dando lugar a un cambio conformacional de *inward-facing* a *outward-facing*. D) El cierre de los NBDs obliga al sustrato a moverse hacia la cavidad 2, que ahora está abierta debido a la flexión del ECL3. E) Los aminoácidos menos hidrofóbicos en la cavidad 2 ayudan a liberar los sustratos al espacio extracelular. F) La hidrólisis de ATP restaura el estado *inward-facing* del transportador. Adaptada de Eckenstaler y Benndorf (2020)..... 28

Figura 6. Modelo del ciclo de transporte ABCG2 propuesto por Khunweeraphong (2019). La válvula de leucina (triángulo rojo) y el techo formado por el ECL3 (violeta) desempeñan un papel fundamental en la translocación del sustrato (rojo) desde la cavidad central (gota de agua azul claro) a la cavidad superior (óvalo azul claro). Se representan la hélice codo (rosa), las partes distales de TM2 y TM3 (amarillo) y el ICL1 (naranja) las cuales son esenciales para la interacción entre NBD (verde) y el TMD (gris), ya que transmiten el cambio conformacional, representado por flechas negras. Las flechas rojas indican las direcciones de las translocaciones de sustrato o de ATP. Adaptada de Khunweeraphong *et al.* (2019)..... 30

Figura 7. Interacción de compuestos sustratos e inhibidores con ABCG2. A) Corte vertical de una representación de superficie de ABCG2 con el sustrato topotecan unido (azul). B) Cavidad 1

vista desde el citoplasma, con los NBD de ABCG2 eliminados. Se han indicado las hélices TM 1b, 2 y 5a. C) Corte vertical de una representación de superficie de ABCG2 con el inhibidor derivado del Ko143 (MZ29) unido (verde). D) Cavity vista desde el citoplasma con los NBD eliminados. Adaptada de Kowal *et al.* (2021) y Jackson *et al.* (2018). 34

Figura 8. Localización del transportador ABCG2 en el organismo. El transportador se representa con el recuadro naranja y las flechas negras representan la dirección hacia la que son transportados los diferentes sustratos..... 37

Figura 9. Expresión de ABCG2 en la glándula mamaria. Diferencias en la expresión de ABCG2 en glándula mamaria en hembras no lactantes y lactantes de diferentes especies como el ratón, la vaca y la especie humana, observadas mediante técnicas inmunohistoquímicas (ampliación x100) (Jonker *et al.*, 2005). 44

Figura 10. Detección inmunohistoquímica de la expresión de Abcg2 en ratones Abcg2^{-/-} y wild-type en riñón, cerebro, hígado y testículos (Dankers *et al.*, 2012). 49

Figura 11. Representación esquemática de los diferentes modelos de animales para estudiar la interacción con ABCG2. Se indican las posibles alteraciones en los niveles plasmáticos o en leche cuando un compuesto es sustrato de ABCG2. 50

Figura 12. Ruta de síntesis de las prostaglandinas. Se indica el sitio de acción de los AINEs sobre las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), así como algunas de las funciones de cada prostaglandina (PG) (Budsberg, 2015; Tomić *et al.*, 2017; Wong, 2019). 64

Figura 13. Esquema del metabolismo del ácido tolfenámico (Adaptado de Pedersen (1994)).71

Figura 14. Principales metabolitos del meloxicam, 5-hidroximetilo meloxicam y 5-carboxi meloxicam (Miyamoto <i>et al.</i> , 2017).....	75
Figura 15. Esquema del ciclo de vida de <i>Fasciola</i> sp. Los huevos del parásito se eliminan en las heces de los animales infectados (1). Dichos huevos se depositan en el agua (2) donde eclosionan y liberan el miracidio (3), el cual se pone en contacto con el hospedador intermediario (caracol) (4). En el interior del caracol, el miracidio se divide produciendo cercarias que son liberadas al agua (5), donde se enquistan generalmente adheridas a las plantas acuáticas, formando las metacercarias (6). Dichas metacercarias (etapa infectiva) son ingeridas por el hospedador final, los animales herbívoros (7), liberando las formas juveniles del parásito en el intestino delgado, las cuales migran hasta los conductos biliares del huésped (8). La transmisión a los humanos se basa en el consumo de plantas acuáticas y agua contaminadas (9) (Adaptado de Siles-Lucas <i>et al.</i> (2021)).	78
Figura 16. Metabolismo del albendazol. Se muestran las estructuras del albendazol (ABZ) y sus metabolitos: albendazol sulfóxido (ABZSO), albendazol sulfona (ABZSO ₂) y albendazol 2-aminosulfona (ABZSO ₂ -NH ₂). FMO, flavin-monooxigenasa; CYP, citocromo P-450 (basada en Rawden <i>et al.</i> , 2000).	85
Figura 17. Estructura química de las salicilanilidas y del antiparasitario closantel	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos sustratos e inhibidores de ABCG2.	32
Tabla 2. Secreción activa de compuestos a leche de ratón mediada por Abcg2, expresada como ratio leche/plasma (L/P).	55
Tabla 3. Estructura química y límites máximos de residuos (LMR) de los AINEs ácido tolfenámico (ganado bovino) y del meloxicam (ganado bovino y caprino) (<i>The European Commission</i> , 2010).	68
Tabla 4. Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos para el ABZ por el Reglamento (EU) N°37/2010 para los alimentos de origen animal.	87
Tabla 5. Límites máximos de residuos (LMRs) y estructura química del antihelmíntico clorsulón (<i>European Medicines Agency</i> , 2014b).	90
Tabla 6. Límites máximos de residuos (LMRs) en ganado bovino y ovino del antihelmíntico closantel (<i>European Medicines Agency</i> , 2014c).....	94

ABREVIATURAS

A-B: Apical a basal

ABC: *ATP-Binding Cassette*

ABCC1: *ATP-binding Cassette C1*

ABCC2: *ATP-binding Cassette C2*

ABCC4: *ATP-binding Cassette C4*

ABCG2: *ATP-Binding Cassette G2*

ABCP: Transportador ABC específico de la placenta

ABZ: Albendazol

ABZSO: Albendazol sulfóxido

ABZSO₂: Albendazol sulfona

ABZSO₂-NH₂: Albendazol 2-aminosulfona

ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo. En inglés **NSAID** (*nonsteroidal antiinflammatory drugs*)

AP- BL: Transporte en dirección apical basal

ATP: Adenosin trifosfato

AUC: Área bajo la curva de concentración frente al tiempo

AUC_{0-t}: Área bajo la curva de concentración frente al tiempo desde cero a un tiempo determinado

B-A: Basal a apical

BCRP: *Breast Cancer Resistance Protein*

Bcl-2: Proteína de linfoma de células B

BL-AP: Transporte en dirección basal apical

C_{max}: Concentración máxima.

ABREVIATURAS

CNS: *Central Nervous System/Sistema Nervioso Central*

COX: Enzima ciclooxygenasa

CYP: Citocromo P-450

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DDI: *Drug-drug interaction/Interacción fármaco-fármaco*

DHEAS: Sulfato de dehidroepiandrosterona

ECL: *Extracellular loops/Bucles extracelulares*

EFSA: *European Food Safety Authority/Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria*

EMA: *European Medicines Agency/Agencia Europea de Medicamentos*

E₃S: Estrona-3-sulfato

ESI: *Electrospray ionization/Ionización por electropulverización*

FAD: Flavín adenín dinucleótido

FDA: *Food and Drug Administration/Agencia americana de alimentos y fármacos*

FMO: Flavin-monooxygenasa

FTC: Fumitremorgina C

GMP: Guanosín monofosfato

HBA: *Hydrogen Bond Acceptors/Aceptores de enlaces de hidrógeno*

HPLC: *High pressure liquid chromatography/Cromatografía líquida de alta resolución*

IC₅₀: Concentración a la que se consigue una inhibición del 50%

ICL: *Intracellular loops/Bucles intracelulares*

IDA: Ingesta diaria admisible

i.m: Intramuscular

ABREVIATURAS

i.p: Intraperitoneal

IQ: 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina

i.r: Intrarruminal

i.v: Intravenosa

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)

L/P: ratio leche/plasma

LC: *Liquid chromatography*/Cromatografía líquida

LOD: *Limit of detection*/Límite de detección

LOQ: *Limit of quantification*/Límite de cuantificación

MeIQx: 2-amino-3,8-dimetil-imidazo[4,5-f]quinoxalina

MDCK-II: *Madin-Darby Canine Kidney Cells*/Línea celular derivada de riñón de perro

MDR: *Multidrug Resistance*/Resistencia múltiple a fármacos

LMR: Límite Máximo de Residuos. En inglés **MRL** (*maximum residues levels*)

MRP: *Multidrug Resistance Protein*/Proteína de multiresistencia a fármacos

MS: *Mass spectrometry*/Espectrometría de masas

MRT: Tiempo medio de residencia o de permanencia

MXR: Mitoxantrona

NBD: *Nucleotide binding domain*/Dominio de unión a nucleótido

ncRNA: *Non-coding RNA*/ARN no codificantes

PG: Prostaglandina

P-gp: Glicoproteína P

ABREVIATURAS

PHIP: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol (4,5-b) piridina

s.c: Subcutánea

SNP: *Single nucleotide polymorphism*/ Polimorfismo de nucleótido único

SP: *Side population*

Sp1: Proteína específica 1

T_{1/2}: Vida media de eliminación

T_{max}: Tiempo al que se alcanza la concentración máxima

TMD: *Transmembrane domain*/Dominio transmembrana

TM: Hélices transmembrana

Trp-P-1: 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol

TX: Tromboxano

UPLC: *Ultra performance liquid chromatography*/Cromatografía líquida de ultra rendimiento

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

1. RESUMEN

1. RESUMEN

El transportador de membrana ABCG2 es una proteína transportadora perteneciente a la subfamilia G de los transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*). Se expresa en la membrana apical de células pertenecientes a órganos de interés farmacocinético como el hígado, riñón e intestino, así como en las principales barreras protectoras: hematoencefálica, hematotesticular y fetoplacentaria (Vlaming *et al.*, 2009; Stacy *et al.*, 2013), actuando como una bomba que expulsa compuestos fuera de la célula (Khunweeraphong *et al.*, 2019). Una de las características fundamentales de ABCG2 reside en su capacidad para interactuar con una amplia variedad de sustancias de distinta naturaleza, como compuestos endógenos, naturales, fármacos y compuestos tóxicos (Mo y Zhang, 2012; Mao y Unadkat, 2015; Safar *et al.*, 2019; Zattoni *et al.*, 2022), los cuales pueden interactuar como sustratos, inhibidores o ambos. Debido a su distribución y capacidad de interacción con diferentes compuestos, este transportador juega un papel fundamental en la protección del organismo frente a compuestos tóxicos. Asimismo, participa en los procesos de absorción, distribución y eliminación de fármacos, limitando su absorción intestinal y favoreciendo su eliminación y, por lo tanto, afectando a su disponibilidad, eficacia y toxicidad (Vlaming *et al.*, 2009; Basseville *et al.*, 2016). Además, ABCG2 está involucrado en el desarrollo de resistencias a fármacos antitumorales, lo cual agrava el pronóstico del cáncer al limitar la acumulación intracelular de estos fármacos en las células tumorales (Chen *et al.*, 2016).

En contraposición a su función protectora, la expresión de ABCG2 se induce en la glándula mamaria durante la lactación, participando en la secreción activa de sus sustratos, muchos de ellos tóxicos, a leche. Se ha demostrado su implicación en el paso a leche de compuestos naturales o endógenos (van Herwaarden *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2014; García-Mateos *et al.*, 2017; Garcia-Lino *et al.*, 2021b), así como de algunos fármacos de uso veterinario (Real *et al.*, 2011a; Otero

1. RESUMEN

et al., 2013, 2016a). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado en profundidad la interacción entre ABCG2 y ciertos fármacos comúnmente empleados en medicina veterinaria, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) o los antiparasitarios. Esta interacción adquiere relevancia debido al posible peligro derivado de la exposición a residuos farmacológicos en la leche, tanto para los lactantes como para los consumidores de productos lácteos (Prado Flores *et al.*, 2002; Daeseleire *et al.*, 2017; Rana *et al.*, 2019). Además, el efecto de la coadministración de inhibidores que pueden afectar a la presencia de dichos residuos en la leche es un área de estudio muy relevante. Investigaciones previas han demostrado la reducción en los niveles de diversos fármacos en la leche en ganado ovino (Real *et al.*, 2011a; Otero *et al.*, 2018; Gunes *et al.*, 2023).

Por lo tanto, la finalidad de los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral fue conocer la interacción del transportador ABCG2 con algunos fármacos comúnmente usados en medicina veterinaria, tales como los AINEs ácido tolfenámico y meloxicam, así como los antiparasitarios albendazol (ABZ), clorsulón y closantel. Así, se estudió el efecto de ABCG2 sobre los niveles plasmáticos y la distribución tisular de estos fármacos, y se evaluó la participación del transportador en su secreción activa a la leche. Finalmente, se examinó el efecto de la coadministración de otros fármacos que inhiben ABCG2 sobre los residuos en leche de los fármacos objeto de estudio.

Dichos estudios se recogen en diversos artículos que figuran en la presenta memoria. Por un lado, los **artículos I, II y III** exponen los resultados obtenidos para los AINEs estudiados: ácido tolfenámico y meloxicam. En el **artículo I** se demostró que el ácido tolfenámico es sustrato *in vitro* del transportador murino Abcg2 mediante ensayos de transporte transepitelial. Asimismo, en el **artículo II**, el meloxicam fue descrito como sustrato *in vitro* tanto de la variante murina como

1. RESUMEN

humana de ABCG2. Considerando estos resultados, se llevaron a cabo ensayos en modelos de ratones *Abcg2^{-/-}* para evaluar la implicación del transportador en la biodisponibilidad plasmática, distribución tisular y secreción a leche de ambos AINEs. En el **artículo I**, se observó que los niveles en plasma, en hígado y en testículos de ácido tolfenámico en ratones *Abcg2^{-/-}* fue superior en comparación con los ratones *wild-type*. Sin embargo, la secreción a leche del ácido tolfenámico no se vio afectada por el transportador. En el caso del meloxicam (**artículo II**), los estudios mostraron que el transportador está involucrado en la farmacocinética oral y la acumulación en cerebro del fármaco, así como se mostró que el transportador participa en la secreción del meloxicam a la leche, siendo sus concentraciones en la leche y el ratio leche/plasma superiores en los animales *wild-type*.

En el **artículo III** se investigó el efecto de la ivermectina, un antiparasitario perteneciente al grupo de las lactonas macrocíclicas y descrito como inhibidor de ABCG2 (Merino *et al.*, 2009), en la secreción de meloxicam a la leche en ovejas. Primeramente, se pudo observar que la presencia de ivermectina redujo el transporte *in vitro* de meloxicam mediado por la variante ovina de ABCG2. Asimismo, los estudios farmacocinéticos realizados en ovejas de raza Assaf mostraron, tras la coadministración de meloxicam junto con ivermectina, una reducción en los niveles de meloxicam en la leche. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de modular la secreción de este fármaco a leche mediante la inhibición de la proteína ABCG2.

En cuanto a los antiparasitarios, el **artículo IV** mostró que los metabolitos del ABZ, albendazol sulfona (ABZSO₂) y albendazol 2-aminosulfona (ABZSO₂-NH₂), son sustratos *in vitro* del transportador murino *Abcg2* y humano ABCG2. Además, la participación del transportador en la secreción a leche de los metabolitos del ABZ fue demostrada mediante ensayos realizados en

1. RESUMEN

ratones lactantes *Abcg2^{-/-}*. Los ratones *wild-type* mostraron concentraciones más altas de dichos metabolitos en la leche, así como un ratio leche/plasma superior en comparación con los ratones *Abcg2^{-/-}*. Considerando esta situación y el riesgo que representa la exposición a estos compuestos para los lactantes y consumidores, en el **artículo V** se examinó el posible impacto de la coadministración de las lactonas macrocíclicas, ivermectina, doramectina y abamectina, sobre los niveles de los metabolitos del ABZ en la leche de ovejas. Los resultados mostraron que los niveles en leche de albendazol sulfóxido (ABZSO) fueron superiores tras la coadministración de las lactonas macrocíclicas, lo que podría incrementar el riesgo de exposición para los consumidores. Varios estudios han propuesto la existencia de un efecto combinado entre los transportadores y las enzimas metabólicas para explicar estas interacciones (Merino *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2008; Lanusse *et al.*, 2018; Garcia-Lino *et al.*, 2019).

En el caso del clorsulón, los ensayos *in vitro* de transporte transepitelial del **artículo VI** mostraron que el clorsulón es sustrato de la variante murina y humana del transportador. Asimismo, se pudo comprobar la implicación de *Abcg2* en la secreción de clorsulón a leche. Los ratones *wild-type* presentaron concentraciones de clorsulón en la leche y un ratio leche/plasma superior en comparación a los ratones *Abcg2^{-/-}*. Además, se observó que la ivermectina inhibe tanto el transporte *in vitro* como la secreción a leche del clorsulón en ratones.

Considerando estos hallazgos, en el **artículo VII**, se corroboró que el clorsulón también es sustrato *in vitro* de la variante ovina de ABCG2, y que dicho transporte es inhibido por las lactonas macrocíclicas ivermectina y abamectina. Asimismo, los estudios farmacocinéticos realizados en ovejas mostraron una reducción en los niveles de clorsulón en leche tras la coadministración de

1. RESUMEN

ivermectina y abamectina, evidenciando la interacción farmacológica mediada por la actividad del transportador al coadministrar inhibidores.

Finalmente, en el **artículo VIII** se evaluó la interacción del closantel con Abcg2 utilizando ratones *knockouts* para el transportador. Los resultados mostraron que Abcg2 juega un papel relevante en la disponibilidad plasmática del closantel, ya que los ratones *Abcg2^{-/-}* presentan niveles más altos del fármaco en plasma en comparación con los ratones *wild-type*. Además, el transportador participa en la secreción activa de closantel a la leche, lo que se refleja en un ratio leche/plasma superior en ratones *wild-type* en relación con los ratones *Abcg2^{-/-}*. También se llevó a cabo un estudio en ganado ovino para evaluar la posible interacción del closantel con inhibidores de ABCG2. Los resultados mostraron que la administración conjunta de closantel junto con ivermectina y eprinomectina no tuvo un efecto significativo en los niveles plasmáticos o en la leche del closantel, así como tampoco en los parámetros farmacocinéticos. Por lo tanto, para nuestras condiciones experimentales, no se pudo demostrar ninguna interacción farmacológica entre las lactonas macrocíclicas y el closantel.

Los resultados obtenidos en esta memoria de Tesis Doctoral evidencian la participación de ABCG2 en la biodisponibilidad y la secreción a leche de fármacos de uso veterinario, como los antiinflamatorios y los antiparasitarios. Además, estos estudios ponen de manifiesto la implicación de ABCG2 en la presencia de residuos en la leche en ganado ovino, así como las posibles interacciones farmacológicas causadas por la coadministración de fármacos. Estos estudios permitirán diseñar estrategias terapéuticas adecuadas para optimizar la seguridad y calidad de la leche y los productos lácteos.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de Tesis Doctoral recoge el estudio *in vitro* e *in vivo* de la interacción entre el transportador de membrana ABCG2 y los AINEs ácido tolfenámico y meloxicam, así como con los antiparasitarios clorsulón, closantel y los metabolitos del ABZ.

El transportador de membrana ABCG2 es una proteína perteneciente a la familia de los transportadores ABC caracterizada por exportar compuestos de distinta naturaleza fuera de la célula (Mao y Unadkat, 2015). ABCG2 se expresa en la membrana apical de células de diversos tejidos como enterocitos, hepatocitos y las células proximales de los túbulo renales. Debido a su localización, el transportador afecta a la biodisponibilidad de sus sustratos ya que limita su absorción intestinal y favorece su eliminación (Vlaming *et al.*, 2009). Además, se induce su expresión en la glándula mamaria durante el periodo de lactación, participando en la secreción activa de compuestos a leche (Jonker *et al.*, 2005; Garcia-Lino *et al.*, 2019). Por consiguiente, el transportador ABCG2 ha cobrado un gran protagonismo en el campo de la farmacología y la toxicología tanto humana como veterinaria, debido a su implicación en los procesos fisiológicos, farmacológicos y de secreción activa de compuestos a la leche (Riches *et al.*, 2015). Conocer aquellos fármacos que sean sustratos del transportador ABCG2 tiene una gran relevancia en medicina veterinaria y humana, ya que pueden verse afectados los correspondientes niveles plasmáticos y tisulares, así como las concentraciones en leche. En consecuencia, la actividad del transportador podría alterar la eficacia y toxicidad de estos compuestos, lo que afectaría indudablemente a la seguridad alimentaria.

En la industria ganadera, la salud y el bienestar de los animales son componentes fundamentales de la producción agroalimentaria. El uso de fármacos para el tratamiento o prevención de diversas patologías es una práctica frecuente para garantizar el bienestar animal.

2. INTRODUCCIÓN

Sin embargo, la aparición de residuos farmacológicos en productos de origen animal como la leche supone un importante problema tanto de salud pública como de gestión económica. El riesgo causado por dichos residuos en leche es inherente a la exposición, tanto de las crías lactantes como de los consumidores de productos lácteos, a compuestos potencialmente dañinos. Concretamente, se ha descrito que pueden causar reacciones de hipersensibilidad, desarrollo de resistencias o alteraciones de la microbiota intestinal (Prado Flores *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2019; Rana *et al.*, 2019; Penati *et al.*, 2021). Por otra parte, la presencia de residuos conlleva también un importante coste económico debido a la obligatoriedad del ganadero de cumplir los tiempos de espera pertinentes para cada fármaco, desechando la leche producida por los animales tratados. Asimismo, la aparición de residuos en leche puede afectar a la elaboración de sus productos derivados. De hecho, se ha observado que, tras el procesamiento de la leche para obtener productos lácteos como queso y yogur, los residuos de fármacos, como los antiparasitarios, se concentraron, siendo más elevados que los niveles detectados en la leche utilizada para su fabricación (Power *et al.*, 2013b; Iezzi *et al.*, 2014; Imperiale y Lanusse, 2021).

Por lo tanto, la participación de ABCG2 en la eliminación de fármacos a la leche adquiere un importante protagonismo en el ámbito veterinario debido a la contribución del transportador en dicho proceso y a la posible modificación de los periodos de retiro (Schrickx y Fink-Gremmels, 2008; Mealey, 2012; Virkel *et al.*, 2019). Además, la coadministración de fármacos puede influir en la actividad del transportador y afectar a la farmacocinética y a la secreción a leche de los sustratos. A este respecto, estudios previos han demostrado que la secreción a leche de algunos antimicrobianos se puede reducir con la coadministración de inhibidores de ABCG2 en ganado ovino (Pérez *et al.*, 2009b; Real *et al.*, 2011a; Otero *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta esta premisa,

2. INTRODUCCIÓN

en esta Tesis Doctoral se ha evaluado la interacción de algunos fármacos, utilizados comúnmente en el ámbito veterinario y algunos también en medicina humana, con el transportador ABCG2. Dichos fármacos pertenecen a dos grandes grupos de medicamentos como son los AINEs y los antiparasitarios.

Los AINEs se utilizan como analgésicos y antipiréticos, así como para el tratamiento de afecciones inflamatorias, trastornos musculoesqueléticos y afecciones quirúrgicas posoperatorias (Virginia, 2015; Bindu *et al.*, 2020). La Unión Europea ha establecido límites máximos de residuos (LMRs) para estas sustancias con el fin de proteger la salud de los consumidores (*The European Commission*, 2010). Estudios realizados previamente mostraron la interacción de algunos AINEs con ABCG2, como el diclofenaco, el flunixin y su metabolito y el ácido salicílico (Lagas *et al.*, 2009; Wassermann *et al.*, 2013; García-Mateos *et al.*, 2019). Sin embargo, el papel que desempeña el transportador de membrana ABCG2 sobre los niveles plasmáticos, la distribución tisular y el paso a leche de otros antiinflamatorios como el ácido tolfenámico y el meloxicam no había sido descrito previamente.

Con respecto a los antiparasitarios, las infecciones causadas por helmintos son responsables de graves problemas en el sector ganadero debido a un impacto negativo en la producción y en el bienestar animal, causando pérdidas económicas significativas. Cabe destacar que no solo los animales sino también los humanos pueden verse afectados por estas infecciones (Keiser y Utzinger, 2009; Charlier *et al.*, 2018; Gazzinelli-Guimaraes y Nutman, 2018). La fascioliasis es una de las principales infecciones parasitarias estudiadas en ganadería debido a su posible transmisión a los seres humanos (Siles-Lucas *et al.*, 2021). El tratamiento de estas infecciones se basa en el uso preferente de antiparasitarios (Vercruysse *et al.*, 2018).

2. INTRODUCCIÓN

A pesar del indudable beneficio de estos tratamientos en la salud y bienestar animal, el uso frecuente de antiparasitarios en ganado de producción lechera se asocia tanto al desarrollo de resistencias como a la posible aparición de residuos en leche tanto de los antiparasitarios como de sus metabolitos (Statham, 2015; Rana *et al.*, 2019; Fissiha y Kinde, 2021); existiendo, de forma análoga a los antiinflamatorios, una reglamentación que recoge sus LMRs (*The European Commission*, 2010). El uso incorrecto de antihelmínticos ya sea por dosis superiores a las recomendadas, incluyendo lo que se conoce como uso “*extra-label*”, es decir, fuera de los requerimientos aprobados, o el incumplimiento de los tiempos de retiro son las causas principales de la aparición de dichos residuos (Beyene, 2015; Bustamante-Rangel *et al.*, 2022). Asimismo, se ha observado la aparición de resistencias a estos fármacos, lo que ha impulsado el estudio de nuevas estrategias para frenar su desarrollo, siendo el uso de las combinaciones de antiparasitarios una de las mejores (Lanusse *et al.*, 2018; Fissiha y Kinde, 2021), aunque en muchos casos es necesario el estudio del impacto en los niveles de residuos de dichas combinaciones.

La interacción entre ABCG2 y algunos antiparasitarios ha sido estudiada previamente. Así, el oxfendazol, la moxidectina y el monepantel se comportan como sustratos del transportador (Merino *et al.*, 2005c; Pérez *et al.*, 2009a; Mahnke *et al.*, 2016). De igual modo, estudios previos han mostrado que el ABZ no es sustrato del transportador, pero sí lo es uno de sus metabolitos, el ABZSO (Merino *et al.*, 2005c). Por otra parte, los metabolitos del triclabendazol, la selamectina, la ivermectina, la eprinomectina y la doramectina fueron descritos como inhibidores del transportador (Merino *et al.*, 2009; Barrera *et al.*, 2012; González-Lobato *et al.*, 2014; Garcia-Lino *et al.*, 2021a).

2. INTRODUCCIÓN

No obstante, la relación que existe entre el transportador ABCG2 y el resto de metabolitos del ABZ, el clorsulón y el closantel no había sido aún descrita.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en esta Tesis Doctoral se planteó el estudio de la participación de ABCG2 en el transporte *in vitro*, las concentraciones plasmáticas, la distribución tisular y la secreción a leche de fármacos pertenecientes a dos familias diferentes. Por un lado, los AINEs como el ácido tolfenámico y el meloxicam y, por otro lado, varios antiparasitarios de diferentes familias como los metabolitos del ABZ, el clorsulón y el closantel. Para la realización de estos estudios, se ha llevado a cabo una metodología de trabajo común. En primer lugar, se han realizado estudios *in vitro* utilizando cultivos celulares de la línea celular MDCK-II y sus subclones transducidos con el transportador. El objetivo de dichos estudios *in vitro* fue conocer si ABCG2 participa en el transporte activo de estos fármacos. En segundo lugar, se llevaron a cabo estudios *in vivo* empleando ratones *Abcg2*^{-/-} machos y hembras en lactación con la finalidad de conocer el efecto *in vivo* del transportador en la biodisponibilidad y la secreción a leche de estos fármacos. Finalmente, en aquellos fármacos en los que se observó una secreción activa a leche mediada por ABCG2 se estudió el efecto de la coadministración de inhibidores. En dichos ensayos se utilizaron las lactonas macrocíclicas como inhibidores del transportador en ratones y/o en ganado ovino.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. TRANSPORTADORES DE MEMBRANA ABC

Los transportadores ABC constituyen una de las familias de proteínas más representadas en todos los organismos desde arqueas hasta humanos. Estas proteínas participan en el transporte de una amplia variedad de sustratos a través de las membranas celulares como iones, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas, polisacáridos, lípidos, fármacos y toxinas. Estos transportadores utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para transportar sus sustratos a través de la membrana y se dividen en dos tipos importadores y exportadores (Al-Shawi, 2011; Wilkens, 2015). Mientras que en los organismos procariotas se encuentran tanto los transportadores de captación como los de exportación, en los organismos eucariotas los transportadores ABC presentes tienen una función exportadora (Saurin *et al.*, 1999; Wilkens, 2015). Asimismo, dichos transportadores de exportación en eucariotas están localizados principalmente en la membrana plasmática celular, aunque también puede formar parte de las membranas de orgánulos internos (Beretta *et al.*, 2017).

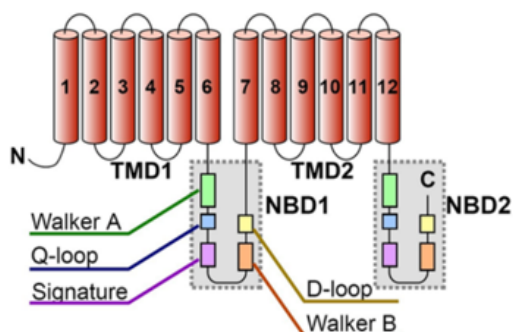
Hasta el momento, se han descrito 58 miembros de la familia ABC, incluidos 49 transportadores ABC en humanos y 9 genes adicionales encontrados en otras especies animales. De esos 58 genes, aproximadamente el 68% está presente en todos los genomas de vertebrados (Ferreira *et al.*, 2014). Las proteínas ABC se agrupan en 7 subfamilias (ABCA-ABCG) en base a su similitud, organización de los dominios proteicos y conservación de secuencias (Velamakanni *et al.*, 2007). Sin embargo, no todas las subfamilias funcionan como exportadores de compuestos; por ejemplo, las subfamilias ABCE y ABCF no son transportadores, sino que están relacionadas con la regulación de la síntesis de proteínas (Thomas *et al.*, 2020). En relación con la estructura, la unidad mínima funcional de los transportadores ABC está constituida por dos dominios de unión a

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

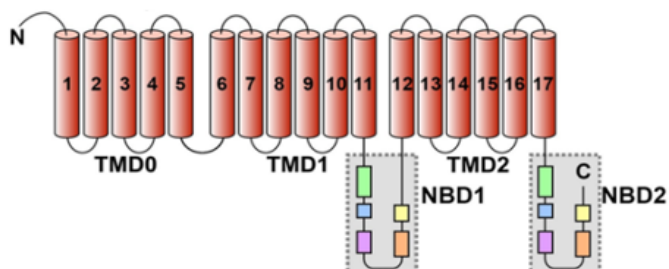
nucleótido (*nucleotide binding domain*, NBD) localizados en el citoplasma y dos dominios transmembrana (*transmembrane domain*, TMD) (Al-Shawi, 2011).

Los dominios NBDs son los responsables de la unión e hidrólisis del ATP y contienen varias secuencias conservadas: los motivos *Walker A* y *Walker B* y una secuencia consenso corta “LSGGQ” denominada *ABC signature* o lazo C (Figura 1).

A) Full-transporter: Glicoproteína P (ABCB1)



B) Full-transporter: MRP1 (ABCC1)



C) Half-transporter: ABCG2

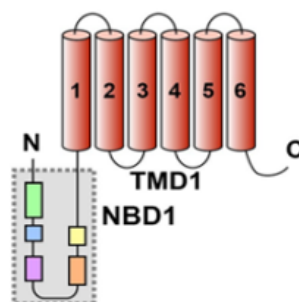


Figura 1. Estructura de los transportadores ABC. Representación esquemática de A y B) *full-transporters* tipo ABCB1 y ABCC1, respectivamente, y C) un *half-transporter* como ABCG2. En todos ellos se muestran los dominios TMD (en rojo) y los dominios NBD (encuadrados en gris) con las secuencias conservadas que los caracterizan (adaptada de Al-Shawi, 2011).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El motivo *Walker A* presenta un residuo de lisina el cual está involucrado en la unión del β - y γ -fosfato del ATP. El motivo *Walker B* posee dos residuos conservados, aspartato y glutamato, implicados en la coordinación y unión del Mg^{2+} y el agua en el proceso catalítico para la hidrólisis del ATP. Finalmente, el sitio catalítico de la proteína lo forma el motivo *ABC signature*, el cual es exclusivo de los transportadores ABC.

Los NBDs presentan otros motivos los cuales también participan en el proceso de unión e hidrólisis del ATP como por ejemplo el lazo A, el lazo D y el lazo Q (Al-Shawi, 2011; ter Beek *et al.*, 2014). Cada NBD se puede dividir en dos subdominios, un dominio catalítico central o *core* el cual contiene los motivos conservados necesarios para la unión e hidrólisis de ATP, el motivo *Walker A* y *Walker B*; y un α -subdominio con la secuencia consenso (Al-Shawi, 2011; Beis, 2015). Además, los transportadores funcionales resultan de la dimerización del NBD el cual forma dos sitios de unión a ATP. Dichos sitios de unión se encuentran constituidos por la unión del *Walker A* de uno de los NBDs con la secuencia consenso del NBD contrario. Los NBDs pueden adoptar diferentes orientaciones entre sí, conformación cerrada (*outward facing*) o conformación abierta (*inward facing*). La unión de ATP promueve la formación de la conformación cerrada y desencadena la dimerización de los NBD debido a que cada molécula de ATP interactúa con motivos de ambos NBDs como se menciona anteriormente, quedando atrapado entre ambos dominios a modo sándwich. Esta dimerización se relaciona con cambios conformacionales en el resto de la proteína provocando la translocación del sustrato al medio extracelular (ter Beek *et al.*, 2014; Wilkens, 2015; Wright *et al.*, 2018). Tras la hidrólisis de ATP a ADP y Pi, el sustrato es liberado al espacio extracelular, separando y promoviendo la conformación abierta de los NBDs (Chen *et al.*, 2016).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Por otro lado, los TMDs se componen generalmente de seis hélices α transmembrana, siendo los responsables de la unión al sustrato y translocación de este. Las hélices α de los dos TMD están empaquetadas de tal manera que forman un poro transmembrana que es accesible desde el citoplasma (*inward facing*) o el exterior de la célula (*outward facing*) (Wilkins, 2015).

En el caso de los ABC exportadores, las hélices α se extienden desde la membrana hacia el citoplasma formando los bucles intracelulares (ICL). Además, se forman hélices α cortas denominadas hélice de acoplamiento 1 (entre las hélices transmembrana 2 y 3) y hélice de acoplamiento 2 (entre las hélices transmembrana 4 y 5). Sin embargo, el número de hélices α varía en el caso de los ABC importadores en procariontes donde fluctúan de cinco a diez por cada TMD (Al-Shawi, 2011). Los TMDs se relacionan con la especificidad del sustrato por el transportador ya que, mientras la secuencia de los dominios NBDs está muy conservada, la de los TMDs presenta mayor variabilidad entre los transportadores (Velamakanni *et al.*, 2007; Lewinson *et al.*, 2020).

En función de la disposición y codificación de ambos dominios dichos transportadores se pueden clasificar como *full-transporters* y *half-transporters*. Los *full-transporters*, como la glicoproteína P (P-gp o ABCB1), están formados por dos unidades, cada una de ellas con un NBD y un TMD, las cuales son codificadas por el mismo polipéptido (**Figura 1A**). Otro ejemplo de *full-transporter* es el transportador ABCC1 (*ATP-binding Cassette C1*) formado por un TMD extra (TMD0) en el extremo amino (**Figura 1B**). Por otro lado, los *half-transporters* están constituidos únicamente por un NBD y un TMD, requiriendo de homodimerización o heterodimerización para ser funcionales, como ABCG2 (**Figura 1C**) (Mo y Zhang, 2012; Wilkins, 2015).

En base a los datos estructurales y bioquímicos, se han propuesto varios modelos de mecanismos de transporte de las proteínas ABC, como el de sitio alternativo (Beis, 2015), el de

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

interruptor y el de contacto constante (Higgins y Linton, 2004; Siarheyeva *et al.*, 2010; George y Jones, 2012). Todos ellos comparten pasos elementales, como la dimerización de NBDs dependiente de ATP y el cambio de TMD entre conformaciones orientadas hacia afuera (*outward facing*) y hacia adentro (*inward-facing*) (Wilkins, 2015).

Como consecuencia del amplio rango de compuestos con los que interaccionan, los transportadores ABC se han asociado con procesos fisiológicos y farmacológicos debido a su distribución en órganos relevantes para la disposición tanto de compuestos endógenos como de diversos xenobióticos. En concreto, dichos transportadores están implicados en la farmacocinética de sus sustratos ya que participan en procesos de absorción, distribución y eliminación de los mismos, y por consiguiente en su biodisponibilidad. De igual modo, los transportadores juegan un importante papel en la protección del organismo frente a la exposición a compuestos tóxicos (Müller y Fromm, 2011; Liu, 2019). Además, los transportadores ABC se han relacionado con el desarrollo de resistencia a fármacos antitumorales, proceso que se ha descrito en P-gp (ABCB1/MDR1), ABCC1/ MRP1 (*Multidrug Resistance Protein*) y ABCG2/BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), entre otros. Dichos transportadores se sobreexpresan en las células tumorales reduciendo la concentración intracelular de los antitumorales y en consecuencia disminuyendo el éxito del tratamiento y favoreciendo el desarrollo de resistencias (Gillet *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2016).

Finalmente, las mutaciones en los genes que codifican para los transportadores ABC humanos se han relacionado con diversas enfermedades o trastornos, como por ejemplo la deficiencia de lipoproteínas de alta densidad o enfermedad de Tangier (ABCA1), la colestasis

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

intrahepática (ABCB11), el síndrome de Dubin-Johnson (ABCC2), la fibrosis quística (ABCC7) y la sitosterolemia (ABCG5 y/o ABCG8) (Velamakanni *et al.*, 2007; Dean *et al.*, 2022).

En especial, ABCG2 es uno de los transportadores más estudiados debido a su implicación en la multirresistencia a fármacos antitumorales (Robey *et al.*, 2007), así como en procesos fisiológicos, farmacológicos y toxicológicos (Riches *et al.*, 2015). Debido a su patrón de distribución, ABCG2 restringe la exposición sistémica y la distribución tisular de sus sustratos ya que participa en la excreción activa de compuestos en el hígado, intestino y riñón; limita la absorción intestinal de compuestos ingeridos por vía oral; y limita la entrada de compuestos tóxicos en las principales barreras protectoras como la hematoencefálica, hemotiplacentaria y hematotesticular (Vlaming *et al.*, 2009). Finalmente, ABCG2 es el único transportador ABC implicado en el paso de compuestos a leche debido a la inducción de su expresión en glándula mamaria durante el periodo de lactación (García-Lino *et al.*, 2019).

3.1.1. ABCG2/BCRP

ABCG2 es una proteína transportadora perteneciente a la subfamilia G de los transportadores ABC, conocida también como proteína asociada a la resistencia a la mitoxantrona (MXR) o transportador ABC de la placenta (ABCP) (Liu, 2019).

Los genes que codifican para el transportador humano y murino se denominan *ABCG2* y *Abcg2*, respectivamente. El gen *ABCG2* humano se localiza en el cromosoma 4 (4q22.1) y consta de 16 exones y 15 intrones. Dicho gen *ABCG2* humano codifica una proteína de 655 aminoácidos y 72 kDa, mientras que el gen *Abcg2* murino codifica una proteína de 657 aminoácidos con un 81% de similitud con el gen humano (Bailey-Dell *et al.*, 2001; Velamakanni *et al.*, 2007; Liu, 2019).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El gen *ABCG2* fue descrito por primera vez en 1998 y se relacionó con el desarrollo de resistencia a fármacos en una línea celular de cáncer de mama humano resistente a doxorrubicina (MCF-7 AdrVp); de ahí que la denominaran proteína resistente al cáncer de mama o BCRP (Doyle *et al.*, 1998). Al mismo tiempo, se clonó un transportador similar con elevada expresión en la placenta, de modo que lo nombraron transportador ABCP (Allikmets *et al.*, 1998). En 1999 este transportador fue clonado de la línea celular de cáncer de colon humano S1-M1-80, que poseía una elevada resistencia a la MXR, designándolo como factor de resistencia a la MXR (Miyake *et al.*, 1999). Finalmente, el Comité de Nomenclatura del Genoma Humano fijó la denominación oficial del transportador como *ABCG2* (Litman *et al.*, 2001; Robey *et al.*, 2007) debido a la similitud estructural y homología de la secuencia con la subfamilia ABCG.

Además de *ABCG2*, la subfamilia G de transportadores está conformada por otros cinco miembros: *ABCG5* y *ABCG8* los cuales están involucrados en el transporte de esteroides, *Abcg3* el cual solo se encuentra en ratones (Dean *et al.*, 2022) y por último, *ABCG4* y *ABCG1* que llevan a cabo un papel importante en el transporte de colesterol (Wang *et al.*, 2004).

A. Estructura y mecanismo de transporte

El transportador *ABCG2* presenta una conformación de *half-transporter* y por lo tanto requiere de homodimerización para ser funcional (Eckenstaler y Benndorf, 2020). Como miembro de la subfamilia G, *ABCG2* tiene una configuración de proteína única ya que el NBD se localiza en el extremo N-terminal y el TMD en el extremo C-terminal (**Figura 2**), a diferencia de otros transportadores ABC como los pertenecientes a las subfamilias ABCB y ABCC, cuya configuración de dominio es opuesto, es decir, el TMD precede al NBD (Ferreira *et al.*, 2014) (**Figura 1**).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

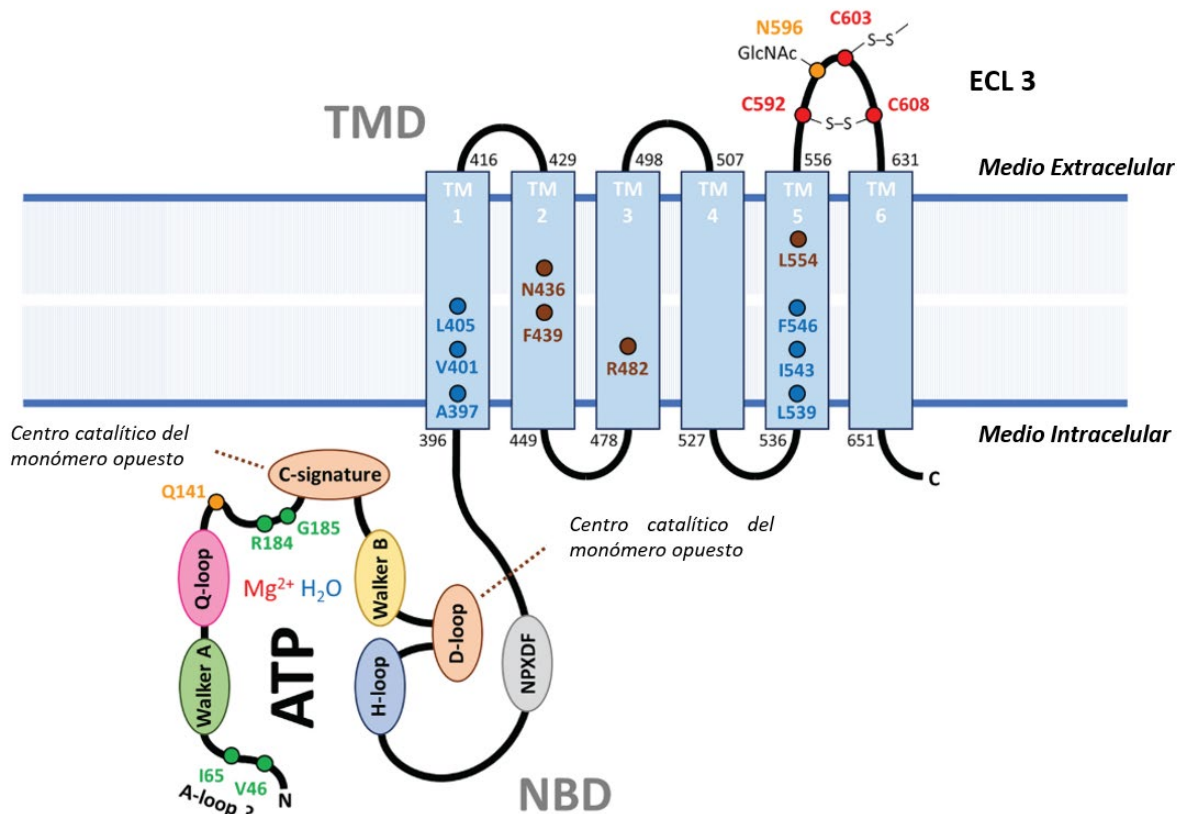


Figura 2. Esquema de la estructura de ABCG2. Este transportador consta de un NBD y un TMD formado por 6 α -hélices transmembrana (TM 1-6). Dentro del TMD, se destacan en azul y marrón los residuos involucrados en la unión del sustrato. En el esquema se destacan el bucle extracelular largo 3 (ECL3) y los motivos de secuencias relevantes en el NBD (Eckenstaler y Benndorf, 2020).

Inicialmente, se utilizaron modelos de homología con otros transportadores ABC, concretamente ABCG5-ABCG8, para investigar la estructura 3D de ABCG2 (László *et al.*, 2016). Estos estudios se basaron en datos estructurales obtenidos por difracción de rayos X del heterodímero ABCG5/G8 pudiendo proporcionar información precisa sobre los NBDs. No obstante, fueron los estudios mediante criomicroscopía electrónica los que comenzaron a proporcionar una visión de alta resolución del transportador ABCG2 humano (Taylor *et al.*, 2017; Jackson *et al.*, 2018).

La primera estructura 3D de alta resolución de ABCG2 fue obtenida por Taylor *et al.* (2017), cuyo estudio utilizó el anticuerpo monoclonal 5D3 Fab específico de ABCG2. La unión de dicho

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

anticuerpo a la superficie extracelular del dímero ABCG2 forma el complejo 5D3-ABCG2, el cual reduce la actividad ATPasa, impidiendo la conformación espacial hacia el exterior y por lo tanto el transporte de los sustratos. El mismo grupo de investigación publicó otro estudio mejorando la resolución obtenida previamente, pero utilizando el MZ29 descrito como derivado del Ko143, inhibidor selectivo de ABCG2 (Jackson *et al.*, 2018). Ambos estudios sugirieron que ABCG2 necesita una conformación muy estricta de sus dominios para llevar a cabo su función.

Por consiguiente, en relación con la estructura de ABCG2 se ha observado que el centro catalítico dentro del NBD está formado por los motivos de secuencia *Walker A*, lazo Q, *Walker B* y lazo H de un monómero, y la secuencia *ABC signature* o lazo C y lazo D del otro monómero (Eckenstaler y Benndorf, 2020) (**Figura 2**). El dominio NBD se une al TMD mediante una región denominada *linker* constituida por una α -hélice en forma de V denominada también hélice codo, hélice conexión o TM1a (**Figura 3**). Tanto los TMDs como los ICL son más cortos que en otras familias de transportadores ABC, lo que permite que los NBDs y la membrana estén más próximos, facilitando el transporte (Taylor *et al.*, 2017; Nagy *et al.*, 2021).

Las hélices transmembrana (TM) que constituyen los TMDs están unidas por ICLs y ECLs. Los ICLs juegan un papel importante en el acoplamiento de los cambios conformacionales entre los NBDs y TMDs (Nagy *et al.*, 2021). Cabe destacar el ICL1, que conecta TM2 y TM3 y rodea la cavidad de unión de los sustratos, contribuyendo al plegamiento, funcionalidad, reconocimiento del sustrato y consumo de ATP durante el ciclo catalítico (Khunweeraphong *et al.*, 2017). Asimismo, los ECLs se caracterizan por ser relativamente cortos, excepto el ECL3. Dicho bucle se localiza entre las hélices TM5 y TM6 y está formado por residuos de cisteína que conforman puentes disulfuro intramoleculares (C592-C608) e intermoleculares (C603-C603'), los cuales son necesarios

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

para la actividad y la estabilidad de la proteína; así como el sitio de N-glicosilación funcional en N596 que provoca desestabilización de la proteína (Taylor *et al.*, 2017; Eckenstaler y Benndorf, 2020) (Figura 3).

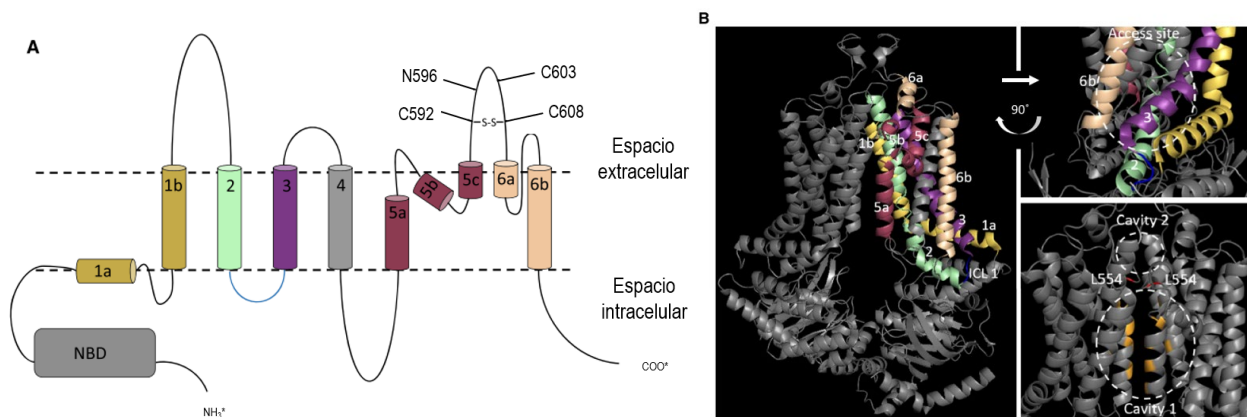


Figura 3. Estructura de ABCG2. A) Representación esquemática de la topología estructural de ABCG2. Se indican los residuos cruciales para la formación de enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares (C592, C608 y C603) y la glicosilación (N596). B) Representación de la estructura terciaria del transportador ABCG2 dimerizado. Las hélices se representan en los mismos colores que en A (Kapoor *et al.*, 2018).

El estudio realizado por Taylor *et al.* (2017) permitió también observar las diferencias entre ABCG2 y los transportadores ABCG5/G8 previamente utilizados en el modelo de homologías. La diferencia fundamental se observó en los TM 2 y 5a de ambos monómeros, los cuales forman una cavidad en el interior que no está presente en los transportadores ABCG5/G8. Asimismo, la estructura del ECL3 es distinta entre dichos transportadores.

El conocimiento de la estructura es clave para conocer el mecanismo de transporte de las diferentes moléculas. Los diversos estudios estructurales realizados han permitido profundizar en el mecanismo de transporte de ABCG2. De modo que inicialmente, se han descritos dos estados

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

conformacionales del transportador fundamentales en su mecanismo de transporte: *inward-facing* y *outward-facing* (Figura 4).

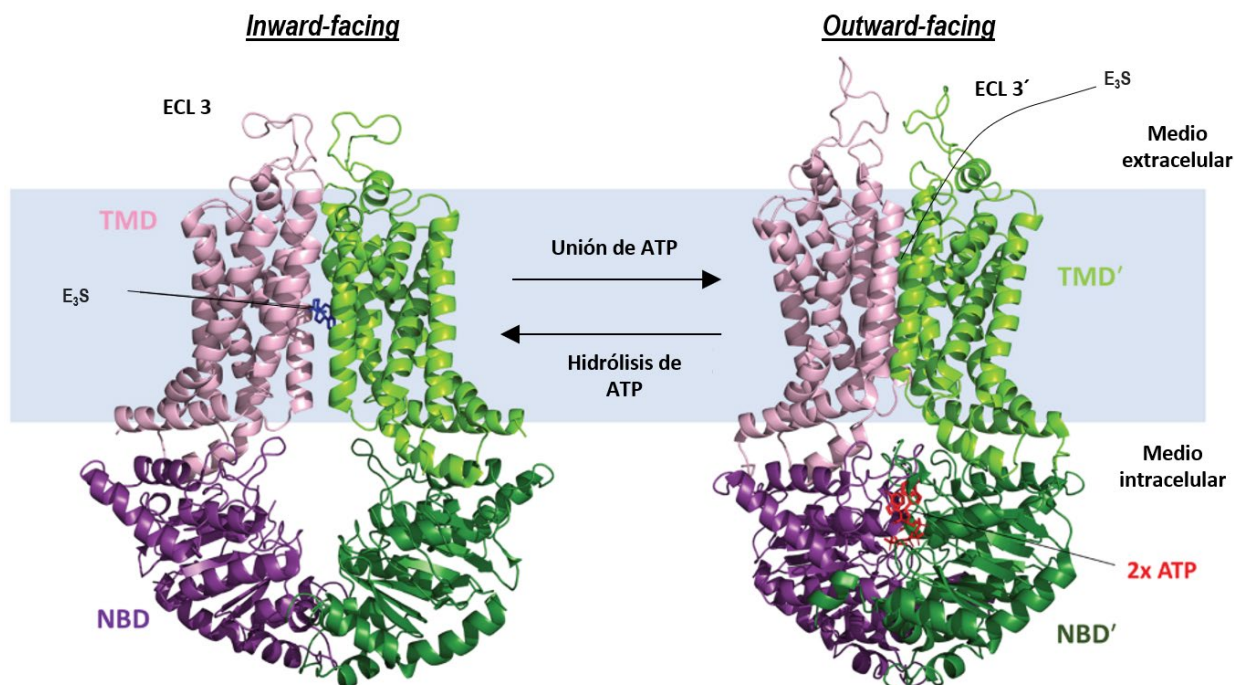


Figura 4. Estructura de ABCG2 unido a sustrato (*inward-facing*) y unido a ATP (*outward-facing*) según Manolaridis *et al.* (2018). ABCG2 se representa como un dímero (púrpura, verde). En la configuración *inward-facing*, la unión de una molécula de sustrato como por ejemplo de estrona-3-sulfato (E₃S) tiene lugar en la cavidad 1 dentro del TMD. En este estado, los NBD están enfrentados entre sí. En la configuración *outward-facing*, la unión de dos moléculas de ATP induce la dimerización de los NBD obligándolos a rotar. Dicha rotación se transmite a los TMD mediante el enlace entre NBD y TM1 que empuja todas las hélices- α de TM y, por lo tanto, no deja espacio para la unión del sustrato. En el espacio extracelular, ECL3 también rota y abre la cavidad 2, permitiendo la liberación del sustrato. Adaptada de Eckenstaler y Benndorf (2020).

Por un lado, en la conformación *inward-facing* se forma la cavidad 1 revestida por los dominios TM2 y TM5a de ambos monómeros, accesible desde el citoplasma y de carácter hidrofóbico. En este estado, los NBD están enfrentados entre sí (Figura 4). Existen unos residuos de leucina (L554 y L555) que separan esta cavidad 1 de otra más pequeña e hidrofílica, la cavidad 2. Esta cavidad 2 está ubicada debajo del ECL3 y es inaccesible para el sustrato en la

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

configuración *inward-facing*. La cavidad 2 conforma el sitio de expulsión de los sustratos ABCG2 y promueve la liberación del sustrato hacia el lado extracelular (Taylor *et al.*, 2017; Eckenstaler y Benndorf, 2020).

El mecanismo de transporte propuesto consiste en la entrada del sustrato desde el citoplasma a la cavidad 1 (**Figura 5A**), quedando atrapado en la cavidad 1 en configuración *inward-facing* (**Figura 5B**). La unión de dos moléculas de ATP a los NBDs permite tanto su dimerización como su rotación (**Figura 5C**). Debido a la unión entre el NBD y el TMD a través de la hélice de conexión o TM1a, la rotación del NBD se transmite al resto de TM y al ECL3, permitiendo el cierre de la cavidad 1 y la apertura de la cavidad 2, así como provocando el cambio de conformación del transportador a configuración *outward-facing* (**Figura 5D**). Dicho cambio provoca el cierre del lado intracelular del transportador y que el sustrato puede moverse desde la cavidad 1 a la cavidad 2 donde es liberado hacia el espacio extracelular (**Figura 5E**). Finalmente, la hidrólisis de ATP se produce tras la liberación del sustrato y proporciona la energía para restaurar la conformación *inward-facing* del transportador (**Figura 5F**) (Taylor *et al.*, 2017; Manolaridis *et al.*, 2018; Eckenstaler y Benndorf, 2020).

Con el fin de analizar en profundidad los cambios conformacionales durante el proceso de transporte, Manolaridis *et al.* (2018) planteó un estudio donde se expresó la mutación E211Q de ABCG2, la cual reduce la actividad catalítica y por tanto la hidrólisis de ATP. En dicho estudio se observó que la unión del sustrato está coordinada principalmente por las cadenas laterales de los residuos N436 y F439. Asimismo, la unión del sustrato impulsó la hidrólisis de ATP en el caso del ABCG2 no mutado; ratificando así que la unión del sustrato se produce antes de la unión del ATP. En relación con esta unión del sustrato y a la hidrólisis de ATP, el modelo de Kapoor *et al.* (2018)

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

propuso también que el sustrato se puede unir a tres sitios distintos durante el proceso de transporte: el sitio de acceso (entre los TM2, 3 y 6), el sitio de unión (correspondiente a la cavidad 1) y el sitio de extrusión (correspondiente a la cavidad 2). La interacción del sustrato con el transportador ocurre inicialmente en el sitio de acceso donde se localiza el residuo R482, el cual podría estar involucrado en la definición de la selectividad de sustrato de ABCG2 (Eckenstaler y Benndorf, 2020).

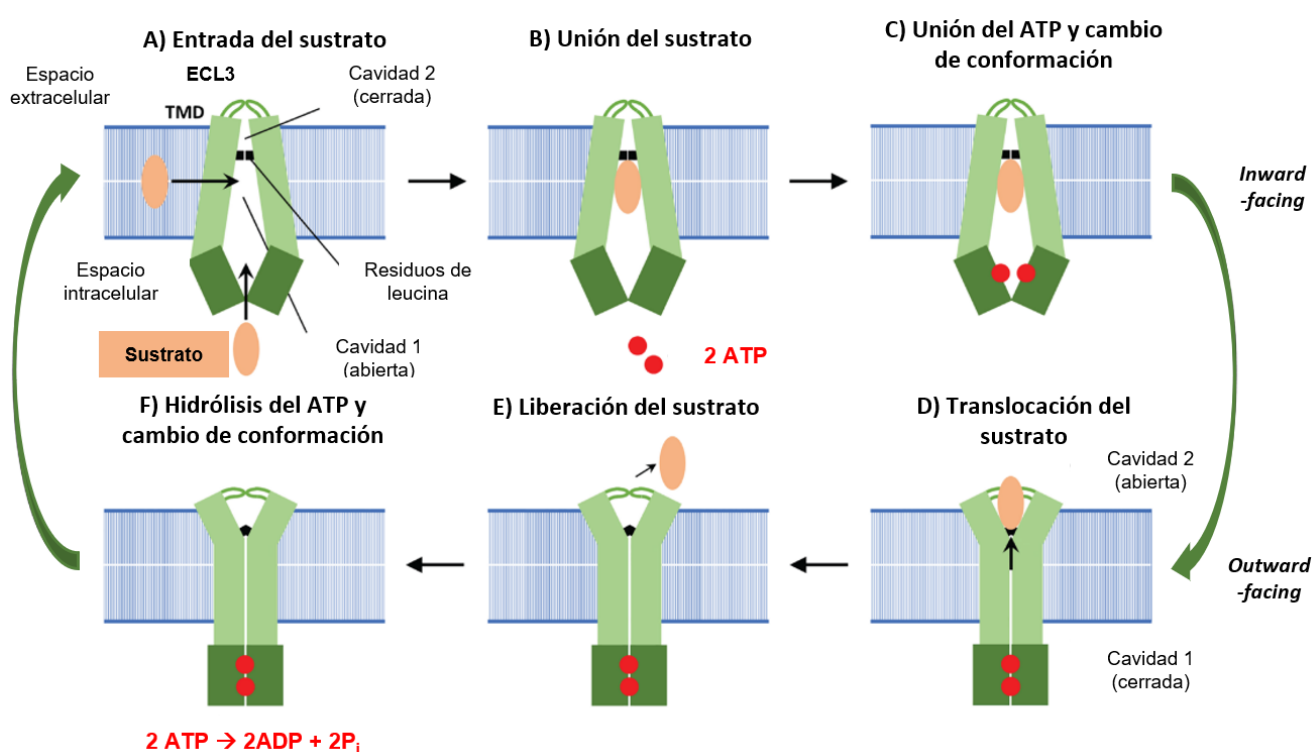


Figura 5. Esquema del mecanismo de transporte de ABCG2. A) En la conformación *inward-facing*, los NBDs se encuentran enfrentados entre sí y los TMDs forman una gran cavidad accesible (cavidad 1 abierta) y una pequeña cavidad inaccesibles (cavidad 2 cerrada), separadas por los residuos de leucina. B) Los sustratos entran desde el citoplasma y se unen a los residuos hidrofóbicos de la cavidad 1. C) La unión de ATP induce una dimerización de ambos NBDs dando lugar a un cambio conformacional de *inward-facing* a *outward-facing*. D) El cierre de los NBDs obliga al sustrato a moverse hacia la cavidad 2, que ahora está abierta debido a la flexión del ECL3. E) Los aminoácidos menos hidrofóbicos en la cavidad 2 ayudan a liberar los sustratos al espacio extracelular. F) La hidrólisis de ATP restaura el estado *inward-facing* del transportador. Adaptada de Eckenstaler y Benndorf (2020).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Finalmente, los modelos propuestos por Khunweeraphong *et al.* (2017, 2019) detallaron algunos aspectos más del proceso de transporte. ABCG2 funcionaría como una bomba en la cual la translocación de los sustratos de la cavidad central a la superior es provocada por un movimiento de compresión. Se observó que los residuos que se localizan en el NBD, el ICL1 y la hélice codo o de conexión (TM1a) son residuos clave para la estructura dinámica de ABCG2, como el residuo E451 del ICL1. Asimismo, se sugiere que el ICL1 funciona como un resorte que permite que el sustrato se introduzca en la cavidad central. En este modelo, la translocación del sustrato estaría controlada por dos barreras; por un lado, por una válvula formada por los residuos de leucina (L554 y L555) que separa la cavidad central de la cavidad superior. Dicha válvula crea un sello hidrofóbico en la parte superior de la cavidad central que evita el flujo entre ambas cavidades en la conformación *inward-facing*. Por el contrario, el cambio de conformación a *outward-facing* debilita el sello hidrofóbico de la válvula y permite que la presión peristáltica empuje los sustratos hacia la cavidad superior. Dicha presión es provocada por la compresión de la cavidad central, lo que requiere del reconocimiento del sustrato, la unión de ATP y la dimerización de NBD (**Figura 6**). Por otro lado, la segunda barrera es una arquitectura similar a un techo formado principalmente por el ELC3 la cual se localiza en el lado extracelular de la cavidad superior. La apertura de dicho techo, promovida por la presión peristáltica, permite la salida del sustrato hacia el exterior y depende también de la interacción entre ICL1 con la hélice codo (**Figura 6**).

Los estudios estructurales han permitido observar que el transportador es capaz de interactuar mayoritariamente con moléculas de naturaleza plana, policíclica y anfipática (Wright *et al.*, 2018), aunque no todos los sustratos del transportador reúnen estas características. De igual

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

modo, estos estudios han permitido mostrar diferencias entre la unión de sustratos e inhibidores con el transportador (Jackson *et al.*, 2018; Kowal *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2021).

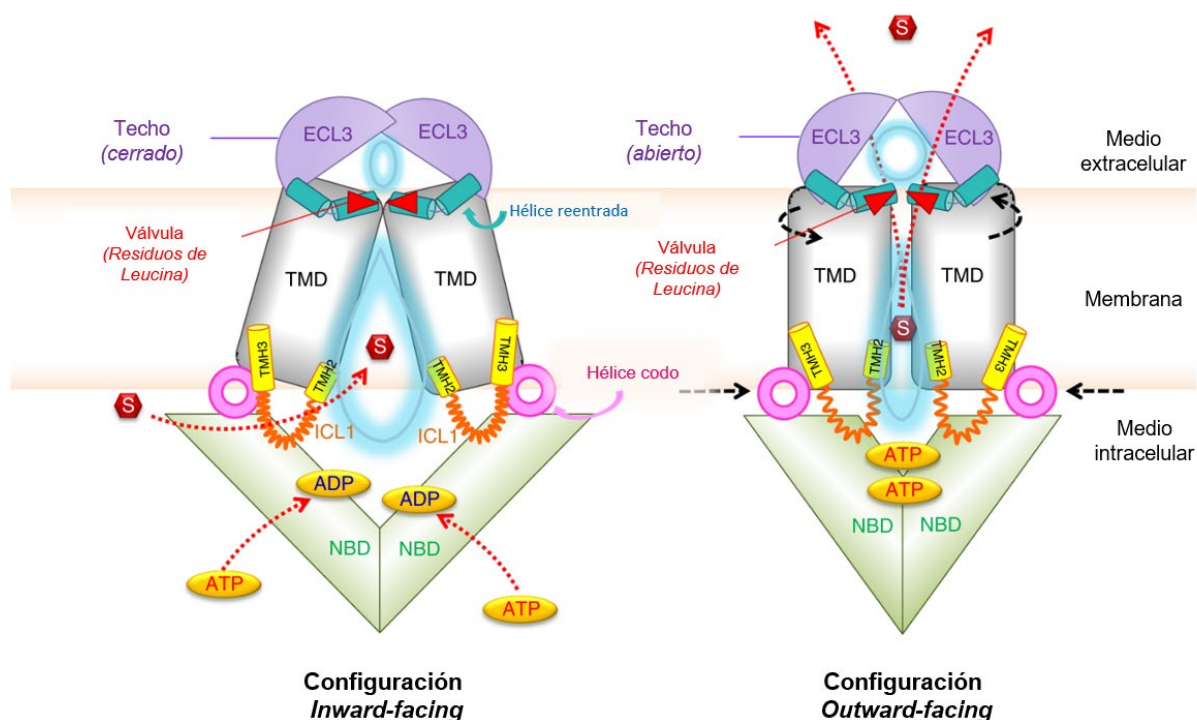


Figura 6. Modelo del ciclo de transporte ABCG2 propuesto por Khunweeraphong (2019). La válvula de leucina (triángulo rojo) y el techo formado por el ECL3 (violeta) desempeñan un papel fundamental en la translocación del sustrato (rojo) desde la cavidad central (gota de agua azul claro) a la cavidad superior (óvalo azul claro). Se representan la hélice codo (rosa), las partes distales de TM2 y TM3 (amarillo) y el ICL1 (naranja) las cuales son esenciales para la interacción entre NBD (verde) y el TMD (gris), ya que transmiten el cambio conformacional, representado por flechas negras. Las flechas rojas indican las direcciones de las translocaciones de sustrato o de ATP. Adaptada de Khunweeraphong *et al.* (2019).

En el caso del modelo propuesto por Kapoor *et al.* (2018), se sugiere que los sustratos del transportador entran en la cavidad 1 a través del sitio de acceso, un paso esencial ya que produce la fuerza necesaria para la apertura del tapón de leucina y el paso a la cavidad 2. Sin embargo, los inhibidores se unirían directamente a la cavidad 1 no logrando la fuerza necesaria para transportarse, inhibiendo la hidrólisis de ATP, así como el transporte de sustratos. Este sitio de acceso tendría un carácter más hidrofóbico, de manera que aquellas moléculas más hidrofílicas

podrían interactuar con el transportador por medio de otras superficies de acceso de sustrato, en localizaciones diferentes de los TMDs. Por consiguiente, la posible existencia de un sitio de unión a múltiples compuestos en la cavidad 1 se propone como hipótesis para la gran variedad de moléculas que interactúan con el transportador (Jackson *et al.*, 2018).

Por ello, aunque los avances en términos de estructura y mecanismo han sido relevantes en los últimos años, los estudios en presencia de sustratos o inhibidores del transportador en las diferentes etapas del proceso de transporte siguen siendo una línea de investigación relevante, ya que permitiría refinar los modelos y conocer en profundidad el mecanismo de interacción de las moléculas con el transportador.

B. Sustratos e inhibidores

Una de las principales características de ABCG2 es su capacidad para interactuar con un amplio espectro de compuestos de distinta naturaleza como por ejemplo diversos tipos de fármacos como antitumorales, antibióticos y antivirales, compuestos naturales o presentes en la dieta, compuestos endógenos y productos tóxicos, entre otros (**Tabla 1**).

Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, como la hidrofobicidad, polaridad y carga eléctrica, son esenciales para determinar la interacción con ABCG2. De ese modo, se ha observado que los compuestos capaces de activar al transportador y actuar como sustratos suelen ser compuestos hidrofílicos, con alta carga iónica, polares y bajo coeficiente de reparto lípido/agua (Egido *et al.*, 2015). Los compuestos conjugados procedentes de la fase II del metabolismo como conjugados de sulfato y glucurónico comparten estas características, siendo transportados por ABCG2 (Mo y Zhang, 2012).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1. Algunos sustratos e inhibidores de ABCG2.

SUSTRATOS	
Agentes antineoplásicos	Topotecan, doxorubicina, mitoxantrona
Antimicrobianos	Ciprofloxacino, danofloxacino, nitrofurantoína, marbofloxacino, orbifloxacino, sarafloxacino, difloxacino, enrofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, eritromicina
Antiparasitarios	Albendazol sulfóxido, moxidectina, oxfendazol, monepantel sulfona
Antivirales	Abacavir, lamivudina, zidovudina
Compuestos naturales o presentes en la dieta	Fitoestrógenos, riboflavina, ácido fólico, vitamina K3, glutatión
Compuestos endógenos	Ácido úrico, 17- β estradiol, estrona 3-sulfato
Contaminantes o toxinas	Aflatoxina B1, PhIP, ocratoxina A
Inhibidores de la tirosin-quinasa	Imatinib, gefitinib
Otros fármacos	Diclofenaco, flunixin, sulfasalazina, metotrexato

INHIBIDORES	
Antifúngicos	Ketoconazol, itraconazol
Antiparasitarios	Ivermectina, doramectina, selamectina, triclabendazol, eprinomectina
Antivirales	Ritonavir, saquinavir, nelfinavir
Compuestos de la dieta	Curcumina, genisteína, quercetina, apigenina
Inhibidores de la tirosin-quinasa	Erlotinib, nilotinib, lapatinib, imatinib
Inhibidores específicos	Fumitremorgina C, Ko143, Ko134
Inmunosupresores	Ciclosporina A
Otros fármacos	Tamoxifeno, pantoprazole, omeprazole

(Polgar *et al.*, 2008; Merino *et al.*, 2009; Robey *et al.*, 2009; Barrera *et al.*, 2012; Mo y Zhang, 2012; González-Lobato *et al.*, 2014; Mao y Unadkat, 2015; Mahnke *et al.*, 2016; Safar *et al.*, 2019; García-Mateos *et al.*, 2019; García-Lino *et al.*, 2021a; Zattoni *et al.*, 2022).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Además de la hidrofobicidad, la unión del sustrato con el transportador ABCG2 aumenta con el número de aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA) presentes en los compuestos, como por ejemplo, con grupos éter, grupos carbonilo, grupos hidroxilo, aminas terciarias, sulfuros o sulfóxidos (Xu *et al.*, 2015). Cabe destacar que muchos de los sustratos descritos para ABCG2 también pueden serlo de otros transportadores ABC como P-gp como el metotrexato, el topotecan o la doxorubicina, reforzando así el papel fundamental de estos transportadores en la protección frente a compuestos tóxicos y en la disponibilidad de sus sustratos (van Herwaarden y Schinkel, 2006; Ni *et al.*, 2010). Por último, mediante los estudios de ultraestructura de alta resolución se ha podido observar que los sustratos como el topotecan o la MXR se unen a la cavidad central o 1, concretamente, debajo del tapón o residuos de leucina, entre TM hélices 1b, 2 y 5 (**Figura 7A y B**) (Kowal *et al.*, 2021).

Por otro lado, los compuestos inhibidores de ABCG2 se han caracterizado por ser moléculas con carácter lipofílico o hidrófobo, de carga iónica baja o neutra y elevado coeficiente de reparto lípido/agua (Egido *et al.*, 2015).

El primer inhibidor específico descrito de ABCG2 fue la fumitremorgina C (FTC) que es una micotoxina aislada de *Aspergillus fumigatus*. Sin embargo, su desarrollo clínico no fue posible debido a su neurotoxicidad. No obstante, se comenzaron a desarrollar y sintetizar análogos de dicho compuesto como el Ko143, ampliamente utilizado como inhibidor de ABCG2 y con menos toxicidad (Rabindran *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2002). El Ko143 también ha sido descrito como inhibidor de P-gp, pero en concentraciones más altas (Weidner *et al.*, 2015). De igual modo, algunos de los inhibidores descritos para P-gp también son inhibidores de ABCG2 como el elacridar o el tariquidar (Polgar *et al.*, 2008).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

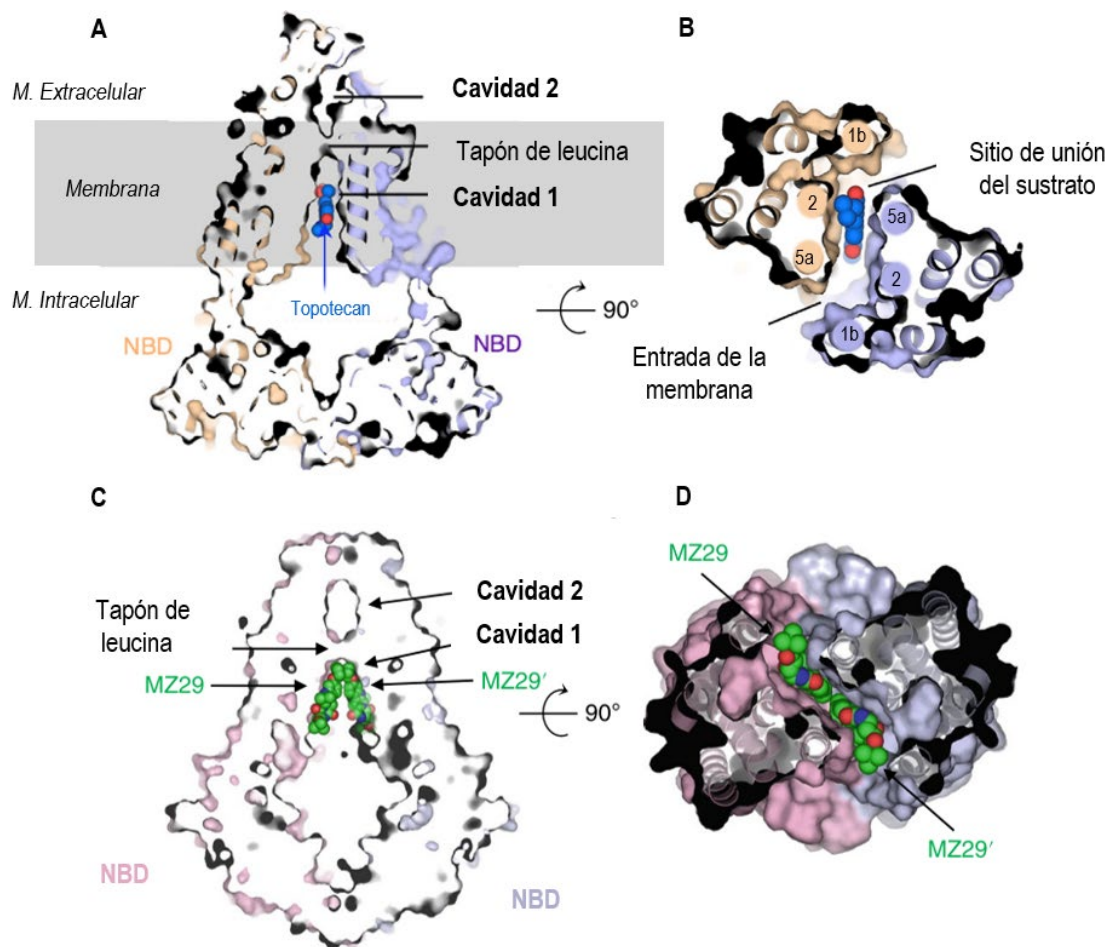


Figura 7. Interacción de compuestos sustratos e inhibidores con ABCG2. A) Corte vertical de una representación de superficie de ABCG2 con el sustrato topotecan unido (azul). B) Cavity 1 vista desde el citoplasma, con los NBD de ABCG2 eliminados. Se han indicado las hélices TM 1b, 2 y 5a. C) Corte vertical de una representación de superficie de ABCG2 con el inhibidor derivado del Ko143 (MZ29) unido (verde). D) Cavity 1 vista desde el citoplasma con los NBD eliminados. Adaptada de Kowal *et al.* (2021) y Jackson *et al.* (2018).

Se han descrito dos clases de inhibidores: los inhibidores dinámicos, los cuales pueden inhibir la actividad de ABCG2, así como inducir su degradación y los inhibidores estáticos, como la FTC, que solo inhiben la función de ABCG2 (Mo y Zhang, 2012). Asimismo, los inhibidores pueden presentar dos mecanismos de acción; por un lado, un mecanismo de inhibición selectivo o general, bloqueando la actividad ATPasa del transportador, como la FTC o el Ko143 y, por otro lado, un mecanismo de inhibición competitivo o dependiente de sustratos, debido a la existencia de

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

sustratos de ABCG2 que también son inhibidores. En este último caso, el inhibidor puede interactuar con ABCG2, o bien en los sitios de unión de una clase de sustratos pero no en otros, y, por lo tanto, solo inhibe la salida de unos sustratos en concreto; o bien en los sitios alostéricos para inducir cambios conformacionales en el sitio de unión, y por consiguiente, afecta al transporte de ciertos sustratos (Mao y Unadkat, 2015; Basseville *et al.*, 2016). Un ejemplo de este caso es el lignano enterolactona el cual fue descrito como un sustrato del transportador ABCG2 (Miguel *et al.*, 2014), aunque también puede actuar como inhibidor competitivo de otros sustratos de ABCG2, como el antimicrobiano danofloxacino (Otero *et al.*, 2018). Estos mecanismos respaldan la hipótesis de que los sustratos interaccionan en múltiples sitios de unión con ABCG2.

Finalmente, los estudios estructurales de alta resolución de las proteínas también han facilitado el conocimiento acerca del modo de inhibición, mediante la utilización de inhibidores de ABCG2. El estudio de Jackson *et al.* (2018) ha permitido conocer el sitio de interacción de compuestos derivados del Ko143 (MZ29) o el tariquidar (MB136) con el transportador ABCG2 (**Figura 7C y D**). Ambos compuestos se unen a la cavidad central o 1 en la configuración *inward-facing*, bloqueando el sitio de unión del sustrato, evitando los cambios conformacionales necesarios para la hidrólisis de ATP y, por lo tanto, inhibiendo la translocación del sustrato. Dicho estudio sugiere que tanto los residuos F431 como L555 son parte de una región de unión de inhibidores. A la vista de estos hallazgos, se sugiere que los sitios de unión de sustratos e inhibidores de ABCG2 se suelen superponer, sin embargo, los inhibidores tienden a ocupar un mayor espacio en dicha cavidad en comparación con los sustratos (Kowal *et al.*, 2021).

C. Distribución y funciones

ABCG2 se expresa en la membrana apical de células de diversos tejidos y órganos, actuando como una bomba que expulsa compuestos, tanto exógenos como endógenos, fuera de la célula (**Figura 8**). Debido a su patrón de distribución, así como a su capacidad de interactuar con un amplio rango de compuestos de diversa naturaleza, ABCG2 desempeña funciones fisiológicas esenciales en el organismo. Por un lado, mantiene la homeostasis de moléculas endógenas, así como actúa de barrera protectora frente a compuestos tóxicos. Por otro lado, ABCG2 está implicado en los procesos de absorción, distribución y eliminación de fármacos, por lo que, afecta a la biodisponibilidad y la eficacia terapéutica de los mismos (Vlaming *et al.*, 2009; Basseville *et al.*, 2016; Kukul *et al.*, 2021).

En primer lugar, ABCG2 se localiza en tejidos u órganos relevantes a nivel farmacológico como son el tracto gastrointestinal, el hígado y el riñón. Concretamente, ABCG2 se expresa en la membrana apical de los enterocitos, principalmente en el duodeno, limitando la absorción oral de sus sustratos y promoviendo su eliminación vía intestinal. Se ha observado que la ausencia de ABCG2 en modelos de ratones *knockout* causa una mejora en biodisponibilidad de sus sustratos como el topotecan (Jonker *et al.*, 2002), la sulfasalazina (Zaher *et al.*, 2006) o la nitrofurantoína (Merino *et al.*, 2005b).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

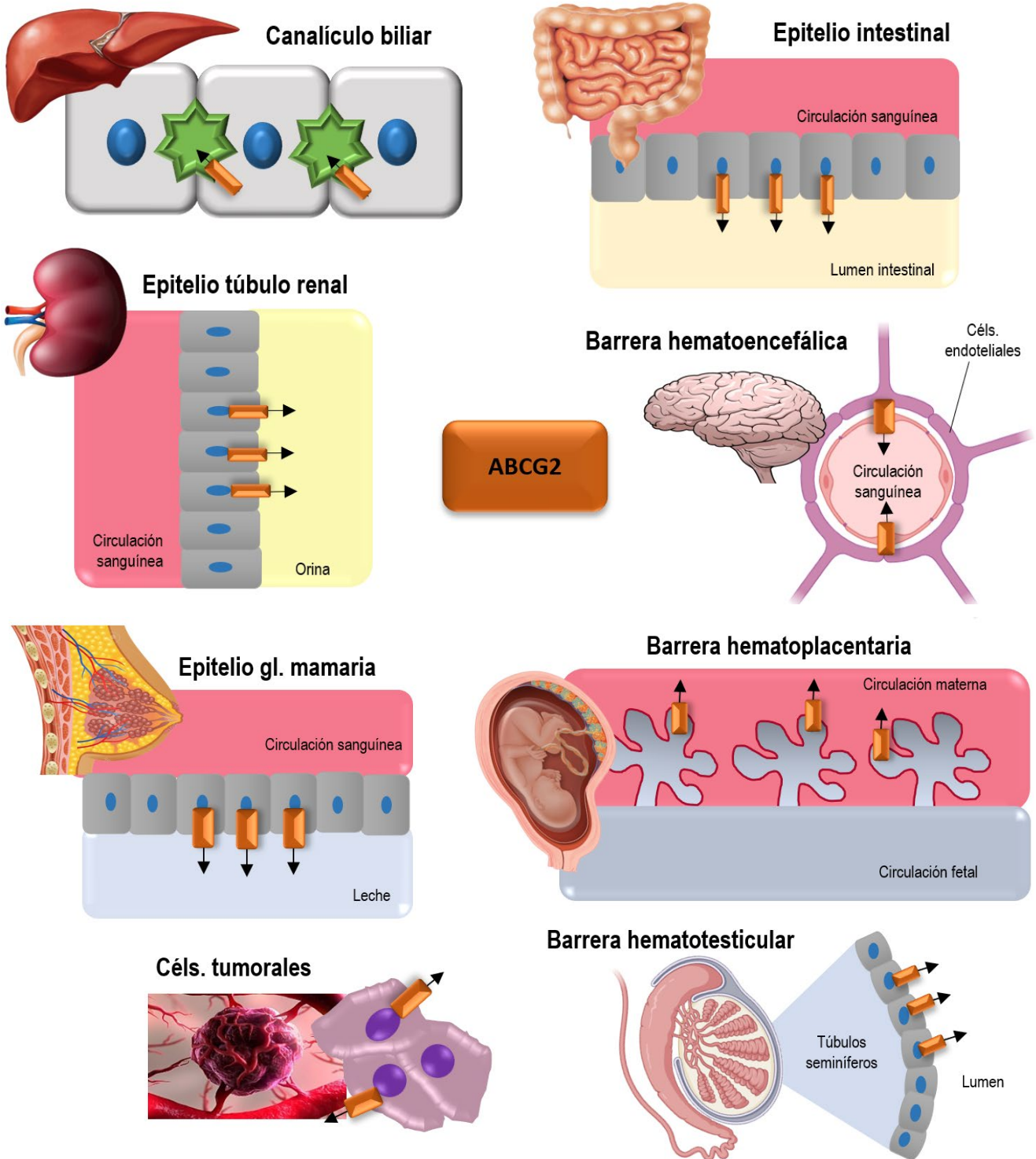


Figura 8. Localización del transportador ABCG2 en el organismo. El transportador se representa con el recuadro naranja y las flechas negras representan la dirección hacia la que son transportados los diferentes sustratos.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Asimismo, se localiza en la membrana apical de los canalículos biliares en los hepatocitos y de las células renales que forman parte de los túbulos proximales del riñón, lo que sugiere que el transportador participa en los procesos de eliminación tanto de compuestos endógenos como fármacos o compuestos tóxicos (Basseville *et al.*, 2016). Diversos estudios han demostrado esta participación de ABCG2 en los procesos de excreción biliar de ciertos fármacos como la nitrofurantoína (Merino *et al.*, 2005b) y algunas fluoroquinolonas (Ando *et al.*, 2007), observando que dicha eliminación disminuye en los ratones *Abcg2*^{-/-} en comparación con ratones *wild-type*. De igual modo, la eliminación por vía renal de compuestos como el benzotiazol conjugado con sulfato (E3040) y metabolitos de la edaravona es inferior en los ratones *Abcg2*^{-/-} (Mizuno *et al.*, 2004, 2007).

El transportador ABCG2 también está involucrado en el proceso de distribución de los fármacos. Por ello y como se ha mencionado anteriormente, se localiza en las principales barreras protectoras como son: la hematoplacentaria, la hematotesticular y la hematoencefálica. En el caso de la placenta, ABCG2 se expresa en la membrana apical de los sincitiotrofoblastos, los cuales forman la barrera principal entre la madre y el feto permitiendo el paso de nutrientes y protegiendo al feto de compuestos tóxicos que estén en la circulación materna. Así pues, se ha sugerido que ABCG2 puede estar involucrado en la regulación de la síntesis de estrógenos en la placenta al modular las concentraciones fetales de moléculas precursoras como el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) y metabolitos como la E₃S, ambos descritos como sustratos del transportador (Grube *et al.*, 2007; Mao, 2008). Asimismo, se ha observado que ABCG2 participa en el transporte de ácidos biliares en la placenta (Blazquez *et al.*, 2012). Estudios en ratones *knockout* para *Abcg2* mostraron que compuestos como el topotecan, la nitrofurantoína, la

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

genisteína y la gliburida presentaron un ratio plasma fetal/plasma materno superior en comparación con los *wild-type* (Vlaming *et al.*, 2009). Asimismo, se ha observado que la expresión de ABCG2 es diferente durante el proceso gestacional, alcanzando su expresión máxima a mitad de gestación y posteriormente disminuyendo ligeramente (Fetsch *et al.*, 2006; Mao, 2008).

En relación con la barrera hematotesticular, ABCG2 se localiza en la membrana apical de las células mioideas que rodean los túbulos seminíferos, en las células de Sertoli y Leydig, así como en las células endoteliales de los capilares sanguíneos. Dichas localizaciones muestran de nuevo el papel protector de ABCG2 ya que transporta compuestos potencialmente tóxicos fuera de los túbulos seminíferos, reduciendo la exposición a dichos compuestos y protegiendo a las células germinales (Fetsch *et al.*, 2006). Un ejemplo son los fármacos dantroleno y prazosina, cuyos niveles fueron superiores en los testículos en ratones *Abcg2^{-/-}* en comparación con los ratones *wild-type* (Enokizono *et al.*, 2008).

ABCG2 también se expresa en las células endoteliales lumbales de los capilares cerebrales formando parte de la barrera hematoencefálica, limitando el paso de sustancias tóxicas al sistema nervioso central (Basseville *et al.*, 2016). Así, la efectividad de algunos tratamientos dirigidos al sistema nervioso central puede verse afectada como consecuencia de la presencia de ABCG2. Igualmente, ABCG2 participa en el transporte de sustratos endógenos como el péptido β -amiloide, cuya acumulación es característica en la enfermedad de Alzheimer (Do *et al.*, 2012). En este sentido, ABCG2 también está involucrado en el transporte de otras moléculas endógenas como son las porfirinas, las cuales se acumulan en los ratones *Abcg2^{-/-}* causando fotosensibilidad (Jonker *et al.*, 2002) o el ácido úrico, cuya alteración del transporte está asociada al trastorno de la gota (Woodward *et al.*, 2009). Asimismo, se ha descrito la presencia de ABCG2 en la membrana

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

plasmática de los glóbulos rojos, desempeñando un papel importante en la prevención de la acumulación de protoporfirina IX (Zhou *et al.*, 2005).

Además, la presencia de ABCG2 se ha descrito en una amplia variedad de células madre incluidas las de origen hematopoyético, sugiriendo un papel protector contra compuestos citotóxicos. Su expresión se ve reducida a medida que se produce la diferenciación celular (Liu, 2019). Debido a dicha expresión en las células madre, estas son capaces de transportar colorantes fluorescentes como la rodamina 123 o el Hoechst 33342, permitiendo identificar y aislar una pequeña fracción de células de la médula ósea denominadas *side population* (SP) la cual está compuesta principalmente por células madre hematopoyéticas, de manera que se ha observado una reducción en el número de células SP en los ratones *Abcg2^{-/-}* (Zhou *et al.*, 2002; van Herwaarden y Schinkel, 2006).

En menor medida se ha descrito la expresión de ABCG2 en otros órganos o tejidos como el pulmón (neumocitos alveolares), la próstata, las glándulas sebáceas, el epitelio de transición de la vejiga, el útero (células endocervicales), el páncreas (islotos pancreáticos y células acinares), el corazón y la retina (capilares retinianos), entre otros (Fetsch *et al.*, 2006; Higashikuni *et al.*, 2010; Mealey, 2013; Basseville *et al.*, 2016).

El transportador también está involucrado en el desarrollo de resistencias a fármacos antitumorales y por lo tanto es responsable de un peor pronóstico en el cáncer. Dicha resistencia se asocia al aumento en la expresión del transportador ABCG2 en las células tumorales que limita la acumulación intracelular de los agentes antitumorales descritos como sustratos del mismo, causando el fracaso del tratamiento (Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2021). Dicha expresión de ABCG2 puede verse incrementada en células cancerosas tras el tratamiento con antitumorales ya

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

sean estos sustratos o no de ABCG2 (Sarkadi *et al.*, 2020). Si bien es difícil conocer con precisión los mecanismos por los cuales estos agentes citotóxicos inducen la expresión de ABCG2, se sugiere que tanto el estrés celular como la liberación de especies reactivas de oxígeno pueden asociarse a dicha inducción (Kovacsics *et al.*, 2020). Asimismo, su expresión en células tumorales puede aumentar debido a respuestas hormonales (Sarkadi *et al.*, 2020). Así pues, se ha observado que los estrógenos inducen la expresión de ABCG2 en cáncer de mama (Chang *et al.*, 2017). La expresión de ABCG2 en leucemias humanas y tumores sólidos ha sido demostrada en diversos estudios (Austin Doyle y Ross, 2003; Benderra *et al.*, 2004; Liu, 2019). Recientemente, también se ha relacionado los ARN no codificantes (ncRNA) con la resistencia a los antitumorales mediada por transportadores ABC ya que están involucrados en la regulación de la expresión de los mismos (Wang *et al.*, 2021). Con respecto a ABCG2, se ha observado que ciertos tipos de ncRNA están vinculados al desarrollo de resistencias a antitumorales en algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, de hígado o la leucemia, debido a que aumentan la expresión de ABCG2 (Kaehler *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021).

Como consecuencia del papel de ABCG2 en el desarrollo de resistencias, una de las estrategias postuladas para combatir este fenómeno es la utilización de inhibidores del transportador que impidan la salida de los fármacos antitumorales y por lo tanto, que potencien su efecto y mejoren el tratamiento de los cánceres (Zattoni *et al.*, 2022). Un ejemplo es el elacridar, un inhibidor del transportador, el cual mejora la disponibilidad de fármacos citotóxicos como el topotecan en modelos preclínicos (Breedveld *et al.*, 2006). Resultados similares se obtuvieron para el venetoclax, un inhibidor potente y selectivo de Bcl-2 (proteína de linfoma de células B), aprobado para el tratamiento de pacientes con leucemia linfocítica crónica, y el cual aumenta la acumulación

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

intracelular de MXR (Catalano *et al.*, 2022). Finalmente, y en vista de la participación de los ncRNA en la resistencia a antitumorales, estos se han convertido en un foco de interés como estrategia terapéutica contra la quimioresistencia que busca obtener células cancerosas más susceptibles a los tratamientos. Un caso que ejemplifica esto es el estudio de Wang *et al.* (2014) donde se mostró como la isoliquiritigenina, un flavonoide natural aislado de la raíz de regaliz, inhibe la expresión de un ncRNA específico (microRNA-25), causando la disminución de la expresión de ABCG2 y, por tanto, aumentando la acumulación del antitumoral epirrubicina en células tumorales de cáncer de mama.

Actualmente, se han descrito aproximadamente 80 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) para el gen que codifica el transportador ABCG2 en la especie humana. Uno de los más estudiados por su relevancia clínica es el Q141K, un SNP caracterizado por la sustitución de una glutamina por una lisina en la posición 141 (Hira y Terada, 2018). Dicho SNP provoca una alteración en el plegamiento de la proteína, causando tanto una disminución en los niveles de expresión del transportador como una reducción en su actividad (Taylor *et al.*, 2017; Heyes *et al.*, 2018). Así pues, se le conoce como un polimorfismo de pérdida de función. En relación con su incidencia étnica, la población asiática presenta la más elevada, entorno al 30%, mientras que la incidencia en la población caucásica y afroamericana es de un 5 a un 10% (Mao y Unadkat, 2015; Heyes *et al.*, 2018). Con respecto a su relevancia clínica, el SNP se asocia con un incremento en las concentraciones plasmáticas de diversos sustratos de ABCG2 debido a una disminución en su aclaramiento (Heyes *et al.*, 2018). Así pues, la presencia del polimorfismo se relaciona con altos niveles de ácido úrico en sangre (hiperuricemia), lo que aumenta el riesgo de padecer gota (Cleophas *et al.*, 2017; Sarkadi *et al.*, 2020). Asimismo, se ha observado que en mujeres lactantes

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

hipertensas que portan el polimorfismo, las concentraciones de nifedipina en leche son más elevadas que en las mujeres no portadoras (Malfará *et al.*, 2019). Además de su efecto sobre la farmacocinética, el polimorfismo también puede modular la eficacia de los fármacos antitumorales, asociándose con un bajo nivel de resistencias. Así pues, se ha observado que la presencia del polimorfismo Q141K mejora la supervivencia en pacientes con tumores gastrointestinal debido a una mayor retención intracelular del imatinib (Koo *et al.*, 2015), así como en pacientes con cáncer de mama los cuales responden mejor a los fármacos antitumorales (Ghafouri *et al.*, 2016). No obstante, la presencia del polimorfismo puede contribuir al aumento de la toxicidad de los antitumorales. El estudio de Low *et al.* (2016) mostró que la presencia de dicho polimorfismo se asocia al aumento de trombocitopenia inducida por sunitinib en pacientes con carcinoma avanzado de células renales.

Otro de los polimorfismos más comunes de ABCG2 es el V12M, caracterizado por la sustitución de una valina por una metionina y cuya frecuencia también es mayor en la población asiática. Este SNP afecta a la inserción del transportador en la membrana plasmática causando, de nuevo, una reducción en su expresión (Heyes *et al.*, 2018).

D. Expresión en glándula mamaria

El transportador ABCG2 se expresa en la membrana apical del epitelio alveolar de la glándula mamaria durante el periodo de lactación (**Figura 9**). Esta inducción de la expresión de ABCG2 en lactación se ha descrito tanto en ratones y humanos como en diferentes especies de producción lechera: vacuno, ovino y caprino (Jonker *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008). En concreto, se han reportado diferencias significativas en la expresión de ABCG2 entre

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

especies ruminantes en lactación y no lactantes, observando un aumento en la expresión casi 10 veces superior en vacas y ovejas y 20 veces superior en cabras (Lindner *et al.*, 2013).

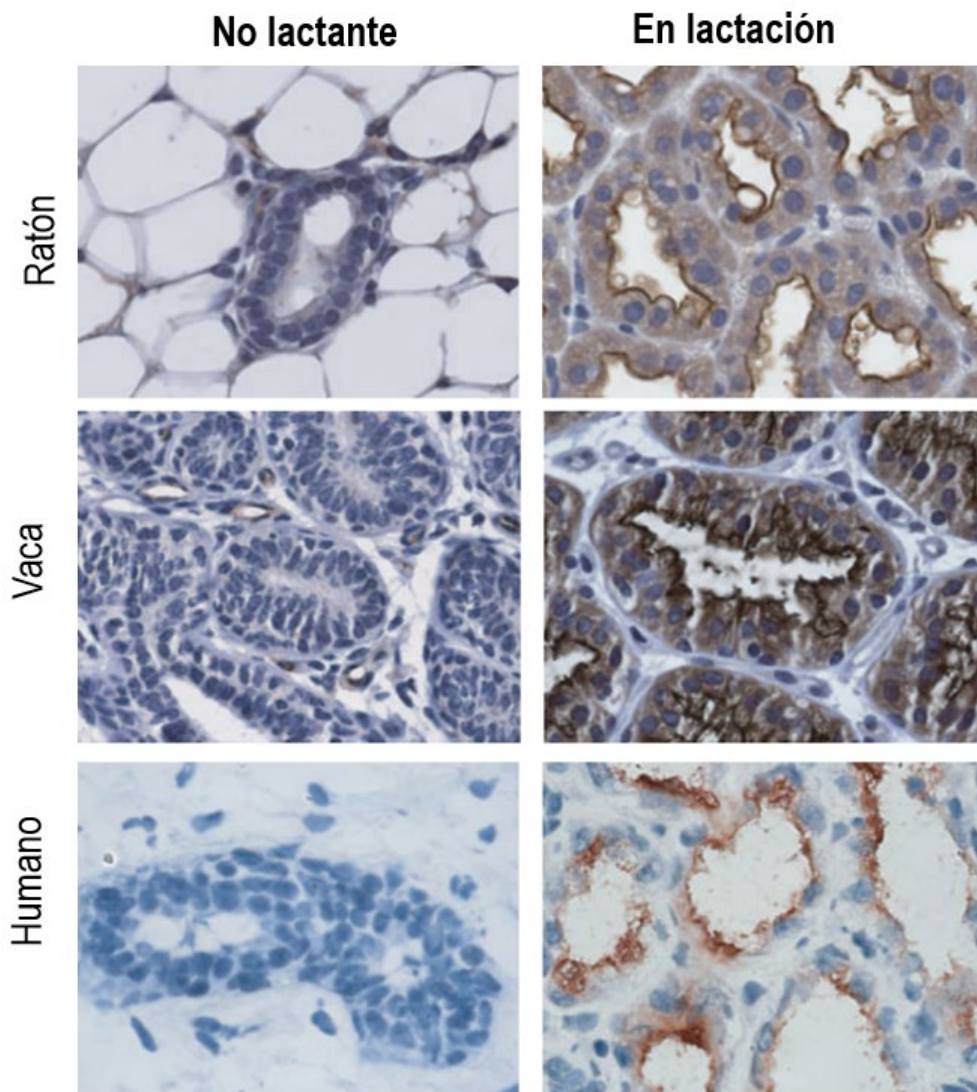


Figura 9. Expresión de ABCG2 en la glándula mamaria. Diferencias en la expresión de ABCG2 en glándula mamaria en hembras no lactantes y lactantes de diferentes especies como el ratón, la vaca y la especie humana, observadas mediante técnicas inmunohistoquímicas (ampliación x100) (Jonker *et al.*, 2005).

Cabe destacar que no se observó inducción de la expresión de otros transportadores ABC como por ejemplo P-gp, ABCC2 o ABCC4 durante el periodo de lactación en ratones y ratas, sugiriendo que ABCG2 es el único transportador de la familia ABC involucrado en la secreción

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

activa de compuestos a la leche (van Herwaarden y Schinkel, 2006; Wang *et al.*, 2008; Garcia-Lino *et al.*, 2019).

Como consecuencia de su expresión en glándula mamaria, los sustratos de ABCG2 que se encuentren en la circulación materna pueden ser transferidos a la leche, exponiendo a los lactantes y los consumidores de productos lácteos a diversos xenobióticos. Por un lado, el transportador está involucrado en el transporte de vitaminas a leche como la vitamina B2 o riboflavina y vitamina H o biotina (van Herwaarden *et al.*, 2007), de modo que la concentración de estas vitaminas en la leche de los ratones *wild-type* es mayor que en los ratones *knockout* para *Abcg2*. A pesar de la disminución de los niveles de algunas vitaminas en leche en ratones *Abcg2^{-/-}*, no se observaron anomalías o deficiencias en las crías alimentadas con esa leche, lo que sugiere la posibilidad de otros mecanismos de secreción de nutrientes a la leche. En el caso de la riboflavina, el mecanismo compensatorio se relaciona con la obtención de riboflavina en las crías a través de uno de sus precursores, el flavín adenín dinucleótido (FAD). Asimismo, en este estudio también se demostró *in vitro* la interacción entre la riboflavina y el ABCG2 humano, por lo que este transportador podría tener un papel en la transferencia de riboflavina de la madre al recién nacido en humanos (van Herwaarden *et al.*, 2007). Además, ABCG2 también participa en la secreción activa de compuestos naturales presentes en la dieta como la enterolactona y el enterodiol, productos derivados del metabolismo microbiano de los lignanos los cuales presentan actividad estrogénica y antioxidante (Miguel *et al.*, 2014; García-Mateos *et al.*, 2017).

Por otra parte, no se puede obviar que la secreción de compuestos a la leche mediada por ABCG2 puede resultar en una contaminación indeseable de la misma. La presencia de residuos farmacológicos en leche se asocia a posibles efectos perjudiciales tanto para los lactantes, como

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

para los consumidores de productos lácteos en el caso de la ganadería. Estudios previos han demostrado la participación de la proteína ABCG2 en el paso a leche de diversos fármacos como el topotecan, la cimetidina (Jonker *et al.*, 2005), la nitrofurantoína (Merino *et al.*, 2005b), el ciprofloxacino (Merino *et al.*, 2006), la moxidectina (Pérez *et al.*, 2009a), el danofloxacino (Real *et al.*, 2011a) y el flunixin (García-Mateos *et al.*, 2019). Asimismo, ABCG2 está involucrado en el paso a leche de compuestos carcinógenos como las aminas heterocíclicas PhIP, IQ y Trp-P-1 y la aflatoxina B1 (Jonker *et al.*, 2005; van Herwaarden *et al.*, 2006). La presencia de estos residuos en la leche constituye un problema de salud pública para los consumidores debido a la posibilidad de desarrollar resistencias, carcinogenicidad, hipersensibilidad o alteraciones en la microbiota intestinal (Rana *et al.*, 2019).

Aun cuando todos estos estudios demuestran la participación del transportador en la secreción activa de diversos compuestos a leche, la explicación de su inducción en glándula mamaria durante el periodo de lactación sigue siendo una paradoja para la cual se plantean y se debaten diversas hipótesis. Por un lado, se sugiere que ABCG2 se induciría tanto para favorecer el paso de nutrientes a la leche como para transportar pequeñas cantidades de alérgenos y sustancias tóxicas a fin de sensibilizar e inmunizar a las crías y reducir el desarrollo de alergias en su vida adulta (Vlaming *et al.*, 2009). Por otro lado, y en relación con la aparición de fármacos o sus metabolitos en leche, cabría pensar que se trata de un efecto colateral a su administración y asociado al amplio rango de compuestos que pueden ser transportados por la proteína.

En relación con los polimorfismos y su efecto sobre el paso de compuestos a leche, cabe destacar que se ha descrito un SNP no sinónimo de ABCG2 en ganado bovino, el Y581S, que se caracteriza por la sustitución de tirosina por serina en posición 581 y se detectó por primera vez en

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

poblaciones de vacas lecheras Holstein (Cohen-Zinder *et al.*, 2005). En concreto, las razas que presentan una mayor frecuencia de este polimorfismo son la Holstein Israelí (20%) y la Holstein americana (5%) (Ron *et al.*, 2006). La presencia del polimorfismo en los animales provoca una disminución en la producción de leche, pero un incremento en el contenido en grasa y proteína presentes en la misma (Cohen-Zinder *et al.*, 2005). Asimismo, diversos estudios han evaluado las implicaciones del polimorfismo en el transporte de algunos compuestos, demostrando que la variante bovina polimórfica presenta una mayor capacidad de transportar sustratos en comparación con la variante *wild-type*, y por lo tanto, este polimorfismo es de ganancia de función (Merino *et al.*, 2009; Real *et al.*, 2011b). En concreto, estos resultados se han observado en algunos antibióticos como la nitrofurantoína, el danofloxacino, el enrofloxacino, el difloxacino o el marbofloxacino, en compuestos endógenos como la riboflavina y la quinurenina o en antiinflamatorios como el flunixin (Real *et al.*, 2011b; González-Lobato *et al.*, 2014; Otero *et al.*, 2016b; García-Mateos *et al.*, 2019; Garcia-Lino *et al.*, 2021b).

Por todo ello, la administración de medicamentos veterinarios está estrictamente regulada por autoridades institucionales como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o la Agencia Americana de Alimentos y Fármacos (FDA). Con el fin de evitar el riesgo de exposición a los residuos de fármacos en productos de origen animal destinados a consumo como la leche, se establecen los límites máximos de residuos (LMRs), los cuales se recogen en el Reglamento (UE) N° 37/2010 (*The European Commission*, 2010). Dicho reglamento también recoge la lista de sustancias prohibidas para su uso en animales de producción. Además de los LMRs, se establece el periodo de espera o de retiro el cual se define como el intervalo de tiempo desde la última administración de un fármaco hasta el momento en que se pueden obtener alimentos, derivados de

dichos animales tratados, seguros para el consumo; es decir, cuando los niveles del producto administrado no excedan los LMRs (Daeseleire *et al.*, 2017). Aunque, los periodos de retiro son establecidos por las autoridades reguladoras, su cumplimiento es responsabilidad de los veterinarios y ganaderos.

E. Modelos animales para el estudio de ABCG2

Tal y como se ha expuesto brevemente en el apartado anterior, el papel del transportador en la protección de las principales barreras del organismo, así como en la absorción y eliminación de compuestos exógenos y endógenos ha podido ser caracterizado gracias a la utilización de modelos animales de ratones y ratas *knockout* para dicho transportador. Cuando se generaron los ratones *Abcg2^{-/-}*, mostraron una sorprendente falta de fenotipo característico. De hecho, son ratones fértiles, con esperanza de vida y peso corporal similar a los ratones *wild-type*. No obstante, estos ratones presentaban cierta fotosensibilidad (Jonker *et al.*, 2002). Asimismo, el estudio de Dankers *et al.* (2012) corroboró la presencia y localización de *Abcg2* en los principales órganos utilizando ratones *wild-type* y *Abcg2^{-/-}* (**Figura 10**).

Este modelo se basa en que los ratones o ratas que carecen de la expresión del transportador (*Abcg2^{-/-}*) presentan una menor capacidad para eliminar los fármacos que son sustratos. Asimismo, estos animales generalmente muestran una mayor captación por vía oral de fármacos que son también sustratos. Por todo ello, la falta de expresión del transportador se va a traducir en alteraciones en la farmacocinética plasmática, ocasionado un aumento en la biodisponibilidad y la exposición a los sustratos en los animales *knockout* (Sissung *et al.*, 2014). La ausencia del transportador también puede ocasionar la acumulación en tejidos de compuestos que son normalmente expulsados por el transportador. Por ello, en los animales *Abcg2^{-/-}* se puede

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

observar una acumulación de aquellos compuestos descritos como sustratos en comparación con los animales *wild-type* (Figura 11).

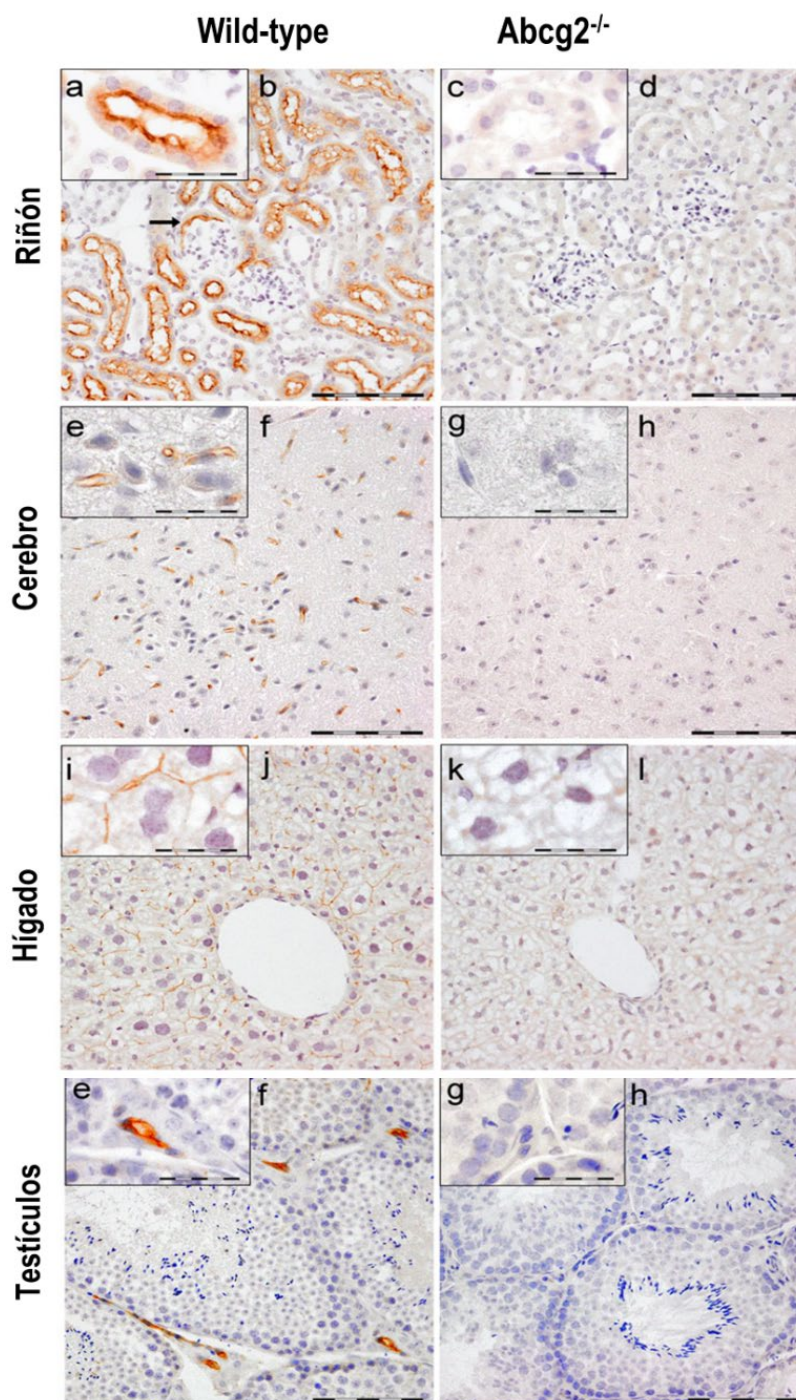


Figura 10. Detección inmunohistoquímica de la expresión de *Abcg2* en ratones *Abcg2^{-/-}* y *wild-type* en riñón, cerebro, hígado y testículos (Dankers *et al.*, 2012).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

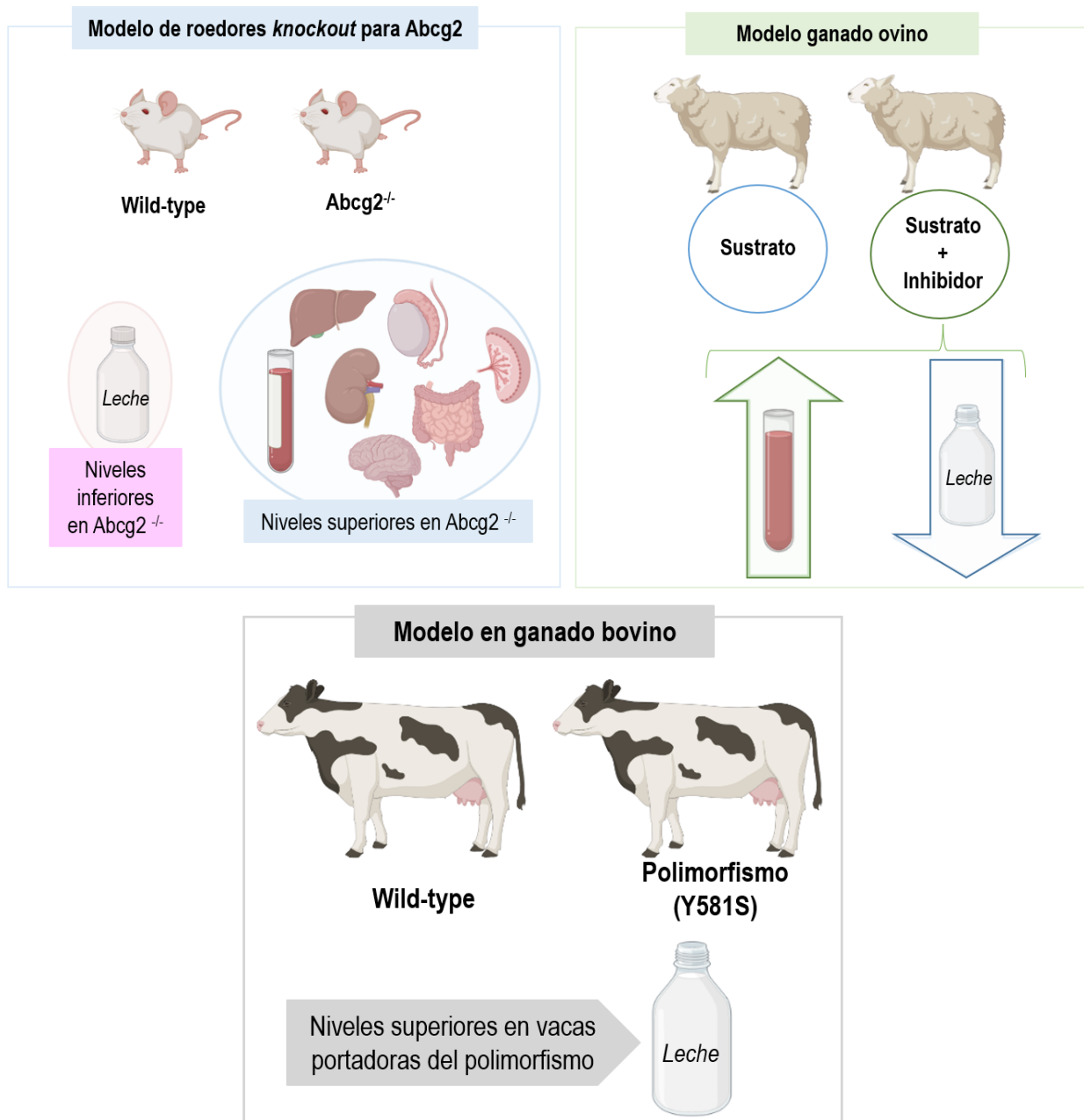


Figura 11. Representación esquemática de los diferentes modelos de animales para estudiar la interacción con ABCG2. Se indican las posibles alteraciones en los niveles plasmáticos o en leche cuando un compuesto es sustrato de ABCG2.

No obstante, diversos factores pueden influir en los resultados obtenidos como pueden ser la cepa, el sexo, las condiciones de alojamiento, la dieta o los mecanismos compensatorios, por lo que la extrapolación a otras especies debe considerarse con cautela (Giacomini *et al.*, 2010). En

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

relación con los mecanismos compensatorios, que consisten en la alteración de la expresión de otros transportadores o enzimas involucradas en los procesos ADME para compensar la ausencia de ABCG2, los modelos *knockout* para *Abcg2* no mostraron cambios relevantes, por lo que son perfectamente asumibles los estudios farmacocinéticos en este modelo para evaluar la participación del transportador (Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2013). Sin embargo, en relación con el sexo, se han observado diferencias en la expresión de *Abcg2* la cual es mayor en el hígado de los ratones macho. Estas diferencias también se han observado en humanos, donde la expresión de ABCG2 en hígado es mayor en hombres en comparación con mujeres (Merino *et al.*, 2005a).

Los estudios con ratones *knockouts* para *Abcg2* han permitido demostrar la participación del transportador en la biodisponibilidad oral de fármacos como el topotecan, la sulfasalazina y el larotrectinib, los cuales presentaron un área bajo la curva de concentración plasmática (AUC) 6, 111 y 1,7 veces superior, respectivamente, en los ratones *Abcg2*^{-/-} en comparación con los ratones *wild-type* (Jonker *et al.*, 2002; Zaher *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2020). Resultados similares se observaron en la biodisponibilidad de la nitrofurantoína, el ciprofloxacino (Merino *et al.*, 2005b; Merino *et al.*, 2006), el imatinib (Oostendorp *et al.*, 2009) y el afatinib (van Hoppe *et al.*, 2017), mostrando el papel relevante de *Abcg2* en la biodisponibilidad plasmática de dichos fármacos. Además, el aumento en la biodisponibilidad de compuestos naturales como el resveratrol, concretamente, su metabolito sulfato y los lignanos como la enterolactona y el enterodiol se ha observado también en ratones *Abcg2*^{-/-} en comparación con los ratones *wild-type* (Alfaras *et al.*, 2010; García-Mateos *et al.*, 2017, 2018). Asimismo, la participación del transportador en la biodisponibilidad oral de fármacos, como la sulfasalazina, también ha sido observada en modelos

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de ratas *knockouts* para *Abcg2*, donde el valor de AUC plasmático fue 21 veces superior en las ratas *Abcg2*^{-/-} en comparación con las *wild-type* (Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2012).

No solamente la disponibilidad plasmática se ve afectada en los roedores *Abcg2*^{-/-}, sino también en algunos casos la excreción biliar. Por ejemplo, en los ratones *Abcg2*^{-/-} se observó una reducción en la eliminación de los metabolitos sulfato y glucurónico del acetaminofeno o la nitrofurantoína (Merino *et al.*, 2005b; Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006). De igual forma, la excreción biliar de sulfasalazina y nitrofurantoína también se vio reducida en ratas *Abcg2*^{-/-} (Huang *et al.*, 2012). Asimismo, la participación de *Abcg2* en la excreción intestinal directa se observó en ratones para la riboflavina. En este caso, los niveles de la riboflavina en el contenido intestinal fueron inferiores en los ratones *Abcg2*^{-/-} en comparación con los ratones *wild-type*, como consecuencia de la ausencia de la proteína exportadora (van Herwaarden *et al.*, 2007).

La función de ABCG2 en las principales barreras protectoras como la hematoencefálica, hematotesticular o la hematoplacentaria han sido determinada también gracias a la utilización de modelos de roedores *knockouts* para *Abcg2* (**Figura 11**). Así, por ejemplo, en los ratones *Abcg2*^{-/-} se han observado concentraciones 2,5, 4,4 y 4,3 veces superiores de imatinib, regorafenib y sorafenib en cerebro en comparación con los ratones *wild-type* (Breedveld *et al.*, 2005; Lagas *et al.*, 2010b; Kort *et al.*, 2015), mostrando como *Abcg2* limita la penetración cerebral de dichos fármacos.

Además, el estudio llevado a cabo por Enokizono *et al.* (2008) mostró la acumulación en cerebro de ratones *Abcg2*^{-/-} de compuestos carcinógenos como PhIP y MeIQx, así como de los fármacos dantroleno y prazosina. De igual manera, los fitoestrógenos, daidzeína, genisteína y cumestrol presentaron concentraciones significativamente superiores en el cerebro de ratones *Abcg2*^{-/-} en comparación con los ratones *wild-type* (Enokizono *et al.*, 2007). Estas diferencias

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

también fueron observadas en ratones tras la administración de riboflavina, alcanzando niveles superiores no solo en cerebro en los ratones *Abcg2^{-/-}*, sino también en hígado y riñón (van Herwaarden *et al.*, 2007). En relación con el modelo de ratas *Abcg2^{-/-}*, también se ha observado una mayor exposición a dantroleno en cerebro de las ratas *knockout* en comparación con las ratas *wild-type* (Huang *et al.*, 2015).

De igual modo, diversos estudios mostraron la participación del transportador ABCG2 en la barrera hematotesticular, en los cuales el ratio testículo/plasma fue superior en los ratones *Abcg2^{-/-}* de los compuestos PhIP, MeIQx, dantroleno, prazosina, daidzeína, genisteína, cumestrol, erlotinib, flavopiridol y MXR en comparación con los ratones *wild-type*, revelando el papel de *Abcg2* en la reducción de la exposición de los testículos a compuestos xenobióticos (Enokizono *et al.*, 2007, 2008; Kodaira *et al.*, 2010).

En relación con la barrera hemato-placentaria, estudios en ratones *knockout* para *Abcg2* mostraron que compuestos como el topotecan (Jonker *et al.*, 2002), la nitrofurantoína (Zhang *et al.*, 2007), la genisteína (Enokizono *et al.*, 2007) y la gliburida (Zhou *et al.*, 2008) presentaron un ratio plasma fetal/plasma materno superior en comparación con los *wild-type*; y por lo tanto, el transportador estaría limitando la transferencia estos compuestos de la circulación materna al feto y/o eliminando el compuesto ya presente en el feto de regreso a la circulación materna. Resultados similares se obtuvieron para los ácidos biliares en ratones *Abcg2^{-/-}*, donde sus niveles fueron superiores en el plasma fetal en contraste con los ratones *wild-type* (Blazquez *et al.*, 2012).

Aunque aparentemente la eficacia del tratamiento pueda verse aumentada en estos ratones *knockouts* como consecuencia de una mayor exposición al fármaco, este efecto se ve contrarrestado por las posibles toxicidades asociadas al aumento de las concentraciones

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

plasmáticas y tisulares de los fármacos (Sissung *et al.*, 2014). Un ejemplo son los fitoestrógenos, ampliamente descritos como sustratos, cuya exposición puede influir en las funciones reproductivas reduciendo el conteo de espermatozoides (Vlaming *et al.*, 2009). Asimismo, se ha asociado la degeneración de la retina y la ceguera con la exposición a fluoroquinolonas (Mealey, 2013), la toxicidad cardíaca con la acumulación del donepezilo (Takeuchi *et al.*, 2015), así como la neurotoxicidad con el acúmulo en ratones *knockout* de mesaconitina e hipaconitina, principales alcaloides de la planta *Aconitum carmichaelii* (Li *et al.*, 2020).

Además, los modelos de ratones *Abcg2^{-/-}* han sido utilizados para investigar la participación del transportador en la secreción activa de sustratos a la leche. Generalmente, la distribución de los sustratos a la leche se expresa como el ratio leche/plasma (van Herwaarden y Schinkel, 2006; Imperiale y Lanusse, 2021). En este caso, los ratones *Abcg2^{-/-}* muestran unos niveles en leche, así como un ratio leche/plasma inferiores en comparación con los ratones *wild-type* (**Tabla 2 y Figura 11**). Gracias a este modelo, diversos estudios demostraron que ABCG2 está implicado en el transporte a la leche de fármacos como el topotecan, la cimetidina (Jonker *et al.*, 2005), la nitrofurantoina (Merino *et al.*, 2005b), el ciprofloxacino (Merino *et al.*, 2006), el danofloxacino (Real *et al.*, 2011a) o el flunixin (García-Mateos *et al.*, 2019). Además, la participación del transportador en la secreción activa a leche también se ha demostrado en compuestos cancerígenos como PhIP, IQ, Trp-P-1 y aflatoxina B1 (Jonker *et al.*, 2005; van Herwaarden *et al.*, 2006), así como en compuestos endógenos y presentes en la dieta como la riboflavina (van Herwaarden *et al.*, 2007), la enterolactona (Miguel *et al.*, 2014), los metabolitos del triptófano, ácido quinurénico, quinurenina, ácido antranílico y ácido xanturénico (García-Lino *et al.*, 2021b) o metabolitos de la melatonina como la 2-hidroximelatonina (Álvarez-Fernández *et al.*, 2023) (**Tabla 2**).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 2. Secreción activa de compuestos a leche de ratón mediada por Abcg2, expresada como ratio leche/plasma (L/P).

Compuesto	L/P Wild-type	L/P Abcg2 ^{-/-}	Ratio L/P Wild-type: Abcg2 ^{-/-}	Compuesto	L/P Wild-type	L/P Abcg2 ^{-/-}	Ratio L/P Wild-type: Abcg2 ^{-/-}
Topotecan	6,7	0,7	10,1	Aflatoxina B1	0,7	0,2	3,8
Cimetidina	13,7	2,3	6,0	Riboflavina	10,9	0,5	22
Nitrofurantoína	45,7	0,6	76,2	Enterolactona	6,4	0,4	16
Ciprofloxacino	3,1	1,6	1,9	Ac. quinurénico	6,9	1,5	4,6
Danofloxacino	5,5	3,1	1,7	Quinurenina	0,02	0,01	2
Flunixin	0,4	0,1	3	Ac. antranílico	0,2	0,1	2
PhIP	12,8	0,5	28,1	Ac. xanturénico	0,9	0,2	4,4
IQ	0,9	0,3	3,4	2-hidroxi-melatonina	3,7	1,7	2,1
Trp-P-1	1,1	0,4	2,6				

Como se menciona anteriormente, la diferencia entre las distintas especies debe tenerse en cuenta a la hora de la extrapolación de los datos. Así pues y debido al importante papel que juega el transportador en la aparición de residuos farmacológicos en leche, algunos estudios utilizan animales vinculados a la producción láctea como vacas y ovejas, los cuales permiten caracterizar tanto la interacción del transportador ABCG2 como, en el caso de las vacas Holstein, el polimorfismo genético Y581S. Teniendo en cuenta que la actividad de ABCG2 puede variar

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ampliamente debido al uso intencional o coincidente de fármacos o compuestos de la dieta que inhiben ABCG2, así como a polimorfismos genéticos (Barrera *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2016a; Otero *et al.*, 2018), estos modelos son utilizados para evaluar las consecuencias de la diferente actividad del transportador, principalmente a nivel de disponibilidad plasmática y residuos en leche.

En primer lugar, los modelos en ganado ovino están enfocados al estudio de la modulación de la secreción a leche de sustratos del transportador mediante la utilización de inhibidores del mismo (**Figura 11**). Este tema será tratado con más detalle en el siguiente apartado. Algunos de los compuestos exógenos que se ha demostrado que son transportados activamente por ABCG2 a la leche ovina incluyen los agentes antimicrobianos nitrofurantoína (Pérez *et al.*, 2009b) y enrofloxacino (Pulido *et al.*, 2006). Estos estudios suelen ir precedidos de modelos *in vitro* en los cuales se usan células que sobreexpresan la variante ovina del transportador (González-Lobato *et al.*, 2014).

En relación con el ganado bovino, la investigación se ha centrado en evaluar la participación del polimorfismo de ABCG2 Y581S en la secreción a leche de diversos compuestos. Varios estudios han observado que la presencia del polimorfismo causa una mayor secreción a leche de los sustratos del transportador como el enrofloxacino, el ciprofloxacino (Otero *et al.*, 2016a), el danofloxacino (Otero *et al.*, 2013, 2015), el ácido úrico, la enterolactona (Otero *et al.*, 2016b), el flunixin (García-Mateos *et al.*, 2019) y la quinurenina (García-Lino *et al.*, 2021b) (**Figura 11**). Todos estos resultados apoyan la necesidad de considerar factores genéticos como este tipo de polimorfismo al diseñar terapias veterinarias apropiadas ya que pueden alterar la presencia de residuos en leche.

F. Interacciones farmacocinéticas mediadas por ABCG2

Como se ha mencionado previamente, ABCG2 desempeña un papel relevante en la disponibilidad de los fármacos ya que participa en los procesos de absorción, distribución y excreción de los mismos, así como en la secreción activa de sus sustratos a la leche (Mealey, 2012; Garcia-Lino *et al.*, 2019). En consecuencia, ABCG2 es considerado, por la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), uno de los transportadores a tener en cuenta en las interacciones farmacológicas o *drug-drug interaction* (DDI) debido a sus implicaciones terapéuticas (Hillgren *et al.*, 2013). Las interacciones farmacológicas se definen como el efecto de la administración conjunta de múltiples fármacos que puede resultar en niveles alterados de los mismos en comparación con la administración de los fármacos solos. En relación con los transportadores, estos fenómenos de DDI ocurren cuando el transporte de un compuesto descrito como sustrato se ve modificado por la acción de otros compuestos que pueden inhibir o inducir la acción del mismo (Giacomini *et al.*, 2010).

En concreto, las interacciones farmacológicas relacionadas con transportadores como ABCG2 pueden ocurrir principalmente por dos mecanismos: una competencia entre fármacos por el sitio de unión del transportador, lo que puede dificultar o inhibir el transporte de uno de los fármacos que interactúan; o un cambio en la expresión del transportador que puede afectar al transporte de cualquier otro fármaco descrito como sustrato (Marquez y Van Bambeke, 2011). Asimismo, y con respecto a los cambios en la expresión de ABCG2, se ha observado que un aumento en su expresión en las células tumorales se asocia al desarrollo de resistencia a fármacos antitumorales (Sarkadi *et al.*, 2020), así como su expresión en los parásitos puede ser responsable del desarrollo de resistencias a los fármacos antihelmínticos (Kumkate *et al.*, 2008).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el caso de la limitación de la absorción intestinal de fármacos, la inhibición farmacológica de ABCG2 se relaciona con la mejora de la biodisponibilidad oral del fármaco sustrato. Asimismo, si la inhibición tiene lugar a nivel de los principales órganos de eliminación como el riñón o el hígado, se va a producir una alteración de la excreción de sus sustratos, retardando su eliminación e incrementando sus niveles plasmáticos (Müller y Fromm, 2011). Por todo ello, la inhibición de ABCG2 generalmente da como resultado un valor de AUC plasmática superior del sustrato en comparación con el tratamiento solo. Aunque la inhibición del transportador es una herramienta farmacológica útil para aumentar la exposición sistémica y por tanto, la eficacia del tratamiento, también puede causar efectos adversos o tóxicos en el organismo en función del compuesto que quede acumulado, como por ejemplo fármacos citotóxicos, tóxicos ambientales o compuestos endógenos (Glavinas *et al.*, 2004). Por el contrario, la inducción del transportador se traduce en una disminución significativa en el AUC del fármaco descrito como sustrato como consecuencia de la limitación de su absorción y del aumento de su eliminación. Cabe destacar que no solamente se producen los fenómenos de interacción tras la coadministración de fármacos, sino también las interacciones fármaco-nutriente son procesos bastante frecuentes debido al amplio rango de sustratos del transportador ABCG2 (Müller y Fromm, 2011).

Dichas modificaciones en la exposición plasmática han sido observadas mediante estudios *in vivo*. La coadministración oral del elacridar, inhibidor de ABCG2, junto con topotecan a ratones *wild-type* causó un aumento significativo en el AUC plasmático del topotecan (Jonker *et al.*, 2000). Estos resultados fueron corroborados en humanos donde se observó un aumento de la disponibilidad oral de topotecan en combinación con elacridar, viéndose reflejado tanto en el valor de AUC como en la concentración máxima alcanzada (C_{max}) (Kruijtzter *et al.*, 2002). Resultados

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

similares se obtuvieron tras la administración conjunta de sulfasalazina junto con el inhibidor de ABCG2 gefitinib, obteniendo un valor de AUC de la sulfasalazina 13 veces superior en los ratones *wild-type* con inhibidor en comparación con aquellos sin inhibidor (Zaher *et al.*, 2006). Dicho aumento en la concentración plasmática de sulfasalazina en ratones *wild-type* también se observó tras la coadministración junto con el triclabendazol sulfóxido, metabolito del triclabendazol o el febuxostat (Barrera *et al.*, 2012; Miyata *et al.*, 2016). Además, la coadministración del inhibidor pantoprazol junto con metotrexato resultó en un aumento en las concentraciones plasmáticas del antitumoral metotrexato en los ratones *wild-type* (Breedveld *et al.*, 2004), así como la coadministración de pantoprazol o elacridar redujo significativamente la eliminación del imatinib en ratones *wild-type*, aumentando la disponibilidad plasmática del mismo (Breedveld *et al.*, 2005). Efectos similares también se han observado en ratas, donde tras la coadministración de sulfasalazina junto con un derivado del inhibidor de ABCG2 Ko143, se observó una mayor disponibilidad plasmática de la sulfasalazina en comparación con las ratas *wild-type* que solo habían sido administradas con sulfasalazina (Liao *et al.*, 2018).

La alteración de la disponibilidad plasmática como consecuencia de la coadministración de inhibidores de ABCG2 también se ha observado en ganado ovino. Así pues, tras la administración conjunta de ABZ junto con ivermectina, se ha observado un aumento en el valor de AUC del ABZSO en comparación con el tratamiento solo de ABZ (Merino *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2008). De igual forma, la disponibilidad plasmática de los metabolitos del triclabendazol aumentó tras la coadministración de triclabendazol e ivermectina en comparación con el tratamiento solo de triclabendazol (Lifschitz *et al.*, 2009). Asimismo, se ha observado que la coadministración de eprinomectina, la cual se describe como un inhibidor de ABCG2, alteró la farmacocinética del

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

danofloxacino, aumentando su biodisponibilidad plasmática (Garcia-Lino *et al.*, 2021a). Resultados similares se obtuvieron tras la administración conjunta de oxiclozanida y oxfendazol en ovejas, donde tanto el valor de AUC como la C_{max} de oxiclozanida fueron superiores después de la coadministración en comparación con el tratamiento solo de oxiclozanida (Ozdemir Kutahya *et al.*, 2023).

La distribución tisular de los fármacos también puede verse alterada por las interacciones farmacológicas con los transportadores. Así pues, la coadministración de inhibidores como el pantoprazol o el elacridar en ratones *wild-type* aumentó la concentración en cerebro del imatinib y la zonisamida (Breedveld *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2021). Asimismo, la acumulación en el cerebro del sorafenib fue superior cuando los ratones *wild-type* se trataron con sorafenib en combinación con elacridar, alcanzando niveles similares a los ratones *knockouts* (Lagas *et al.*, 2010b). Estos resultados sugirieron que la administración de inhibidores del transportador podría mejorar la administración de fármacos relacionados con el tratamiento de los tumores cerebrales. En algunas ocasiones esta interacción se produce en ciertos tejidos (DDI local) sin ningún cambio aparente en la concentración plasmática (DDI sistémica); por ejemplo, tras la coadministración del inhibidor cilostazol junto con el sustrato donepezilo no se observaron diferencias en plasma entre ratas con o sin inhibidor. Sin embargo, la coadministración de cilostazol aumentó significativamente las concentraciones de donepezilo en corazón y cerebro (Takeuchi *et al.*, 2015).

La interacción con ABCG2 no solo afecta a la biodisponibilidad sino también a la secreción de sus sustratos a la leche como consecuencia de la inducción de su expresión en glándula mamaria durante el periodo de lactación. Este paso de sustratos a leche es de gran relevancia en la industria ganadera ya que el uso de fármacos es habitual para garantizar el bienestar animal. La

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

alteración de la actividad del transportador de membrana ABCG2 mediante la coadministración de inhibidores del mismo y su efecto sobre la presencia de los residuos farmacológicos en leche es una línea de investigación de gran interés (García-Lino *et al.*, 2019), la cual ha sido estudiada tanto en modelos de ratones como en ganado ovino. El interés de estos estudios en los ratones normalmente se circunscribe a la extrapolación a las especies de rumiantes, con el objetivo de modular su actividad utilizando inhibidores del transportador en ganado ovino.

En primer lugar, los ensayos realizados empleando ratones *Abcg2^{-/-}* y *wild-type* mostraron que la secreción de topotecan a la leche en ratones *wild-type* se redujo tras la coadministración del inhibidor elacridar (Jonker *et al.*, 2005). De igual modo, se observó una disminución de la secreción a leche, reflejándose tanto en los niveles en leche como en el ratio leche/plasma, de la nitrofurantoína en los ratones *wild-type* después de la coadministración de genisteína y daidzeína, isoflavonas procedentes de la soja descritas como inhibidores de ABCG2 (Merino *et al.*, 2010), así como tras la coadministración con triclabendazol sulfóxido (Barrera *et al.*, 2012). En todos estos estudios no se observan diferencias entre los tratamientos con o sin inhibidores en los ratones *Abcg2^{-/-}*, lo que indica que la inhibición del transportador es específica.

Investigaciones previas demostraron que la administración directa a ovejas en lactación de compuestos derivados de soja o a través de una dieta enriquecida suponía una reducción en la secreción a leche de diversos fármacos sustratos de ABCG2, como enrofloxacin, nitrofurantoína, danofloxacin o monepantel sulfona (Pulido *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2009b; Pérez *et al.*, 2013; Gunes *et al.*, 2023). De igual modo, una dieta enriquecida en lignanos disminuyó la secreción a leche del antimicrobiano danofloxacin en ovejas (Otero *et al.*, 2018). Otros compuestos descritos como inhibidores de ABCG2, como los metabolitos de triclabendazol, provocaron una reducción

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

similar de los niveles en la leche del antiparasitario moxidectina, sustrato conocido de ABCG2 (Barrera *et al.*, 2013). Finalmente, cabe destacar el uso de los antiparasitarios pertenecientes al grupo de las lactonas macrocíclicas como inhibidores de ABCG2 en las interacciones farmacológicas. La secreción a leche de danofloxacino, sustrato de ABCG2, se vio reducida tras la coadministración con ivermectina en ganado ovino (Real *et al.*, 2011a).

Por todo ello, continuar investigando la interacción del transportador ABCG2 con otro tipo de fármacos como los AINEs o los antiparasitarios, ampliamente utilizados tanto en medicina veterinaria como humana y, por consiguiente, la participación de ABCG2 en su secreción a leche cobra un interés relevante. Dichas investigaciones nos permiten conocer más en profundidad los mecanismos implicados en la aparición de residuos farmacológicos en leche, proporcionándonos la posibilidad de modular, controlar y predecir dichos residuos en relación con las posibles interacciones farmacológicas, a fin de mejorar y garantizar la seguridad alimentaria.

3.2. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Desde que se aisló el ácido acetilsalicílico de la corteza de sauce alrededor de 1830, seguido de la síntesis de la aspirina por los laboratorios Bayer, en 1897, diversos nuevos compuestos han sido desarrollados e introducidos en la práctica clínica con actividad antiinflamatoria, convirtiendo a los AINEs en uno de los fármacos más relevantes de la industria farmacéutica. Estos fármacos abarcan un grupo diverso de compuestos en su mayoría ácidos orgánicos que se caracterizan por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas (Kowalski y Makowska, 2015; Bindu *et al.*, 2020). En los últimos años, se ha incrementado también la investigación para su uso en el tratamiento y la prevención del cáncer (Wong, 2019).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los AINEs actúan inhibiendo las enzimas ciclooxigenasas (COXs) las cuales están involucradas en la síntesis de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs). Estos compuestos se sintetizan a partir del ácido araquidónico formado por hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana plasmática mediante la fosfolipasa A₂, la cual es activada por diversos estímulos (inflamatorios, físicos, químicos y mitógenos). El ácido araquidónico se transforma en PGs por acción de las COXs en dos pasos. Primero una actividad dioxigenasa actúa sobre el ácido araquidónico para producir el endoperóxido de prostaglandina G₂ (PGG₂) y posteriormente, se reduce a endoperóxido de prostaglandina H₂ (PGH₂) por la actividad peroxidasa. Ambos compuestos constituyen intermediarios inestables, de manera que son convertidos por enzimas sintasa específicas de tejido en las principales PGs entre las que se encuentran la PGD₂, PGE₂, PGI₂ y PGF_{2α}, así como el TXA₂ (**Figura 12**). En dicho proceso intervienen principalmente dos isoformas de la COX, COX-1 y COX-2, las cuales comparten más del 60% de su secuencia y catalizan la misma reacción (Tomić *et al.*, 2017). Sin embargo, difieren en los tejidos donde se expresan y sus funciones.

Por un lado, la COX-1 es la forma constitutiva de la enzima expresada en la mayoría de los tejidos, incluida la mucosa gastrointestinal, las plaquetas, el endotelio y los riñones. Esta isoforma participa en la síntesis de PGs como la PGE₂, la cual tiene un papel relevante en la protección de la mucosa estomacal a través de la secreción de moco gástrico y bicarbonato. Por todo ello, su inhibición se relaciona con uno de los efectos adversos más frecuentes de los AINEs como es la toxicidad a nivel gastrointestinal. En las plaquetas, COX-1 participa la producción de TXA₂ que estimula la agregación plaquetaria y la vasoconstricción, mientras que, en el endotelio, COX-1 conduce a la producción de PGI₂ que inhibe la agregación plaquetaria y ejerce una acción

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

vasodilatadora. Asimismo, las PGE_2 y PGI_2 participan en el mantenimiento de la homeostasis renal, y junto con la $PGF_{2\alpha}$ se relacionan con la menstruación y la iniciación del parto.

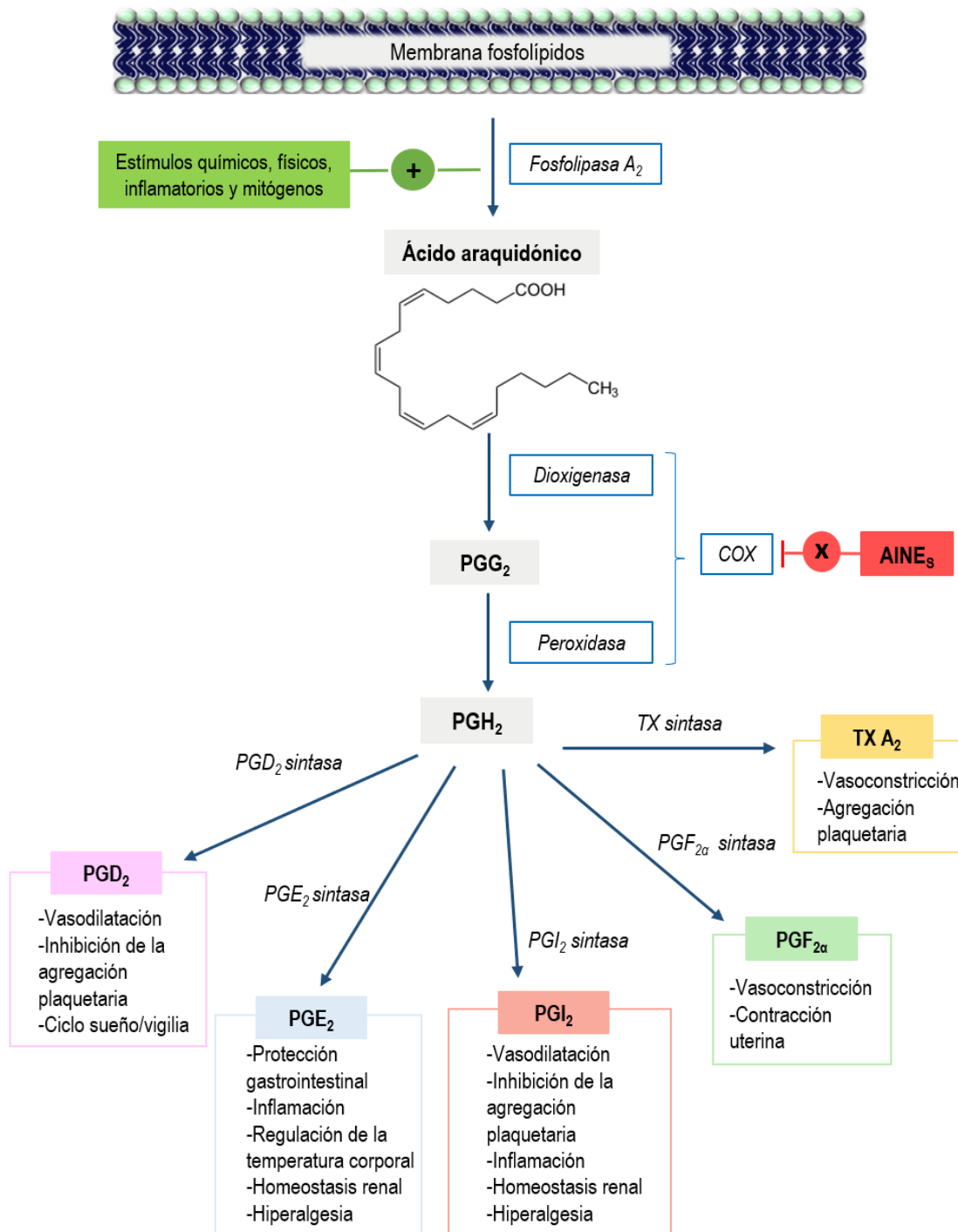


Figura 12. Ruta de síntesis de las prostaglandinas. Se indica el sitio de acción de los AINEs sobre las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), así como algunas de las funciones de cada prostaglandina (PG) (Budsberg, 2015; Tomić *et al.*, 2017; Wong, 2019).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Por otro lado, la COX-2 es la forma inducida de la enzima en presencia de inflamación. Esta isoenzima participa en la síntesis de PGE₂ y PGI₂, las cuales están implicadas en el dolor, la inflamación y la fiebre. La inhibición de COX-2 es la responsable de las propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas de los AINEs, es decir, de su efecto terapéutico (Simmons *et al.*, 2004; Tomić *et al.*, 2017; Monteiro y Steagall, 2019; Bindu *et al.*, 2020). Finalmente, diversos estudios han descrito una tercera isoforma de esta enzima a la que han denominado COX-3 la cual parece ser una variante de la COX-1 y se relaciona con la biosíntesis de prostanoïdes (Schwab *et al.*, 2003; Budsberg, 2015).

Con respecto a la clasificación de los AINEs, tradicionalmente se clasifican en función de su estructura química. La estructura general de un AINE consta de un resto ácido (ácido carboxílico, enoles) unido a un grupo funcional aromático plano. Por ello, se diferencian distintos grupos en función de dicha estructura, como los derivados del ácido salicílico (aspirina y sulfasalazina), del ácido acético (indometacina y diclofenaco), del ácido propiónico (ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno), del ácido antranílico o fenamatos (ácido tolfenámico y ácido mefenámico), del ácido nicotínico (flunixin) y del ácido enólico u oxicams (meloxicam) (Daeseleire *et al.*, 2017; Tomić *et al.*, 2017; Bindu *et al.*, 2020). Otra manera de clasificarlos es en base a su selectividad para inhibir las isoenzimas COX, así pues, la determinación *in vitro* de la IC₅₀ junto con el ratio inhibitorio (COX-1 IC₅₀/ COX-2 IC₅₀) permiten clasificarlos de la siguiente manera. Un ratio de 1 indica que el fármaco inhibe de igual manera la COX-1 y la COX-2. Un ratio mayor a 1 indica que el fármaco es preferentemente selectivo hacia la COX-2, mientras que una relación menor a 1 indica que el fármaco es más selectivo hacia la COX-1 (Wong, 2019). Teniendo en cuenta esto, los AINEs se pueden dividir en tres categorías: inhibidores no selectivos de COX-1 y COX-2,

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

inhibidores completos de COX-1 y COX-2, aunque con preferencia específica por COX-2 e inhibidores selectivos de la COX-2. Los inhibidores no selectivos de COX pueden inhibir tanto COX-1 como COX-2. En este grupo se incluyen casi todos los AINES clásicos como aspirina, indometacina, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y ácido tolfenámico, entre otros. De manera más específica, algunos de ellos se diferencian en otra categoría ya que han mostrado tener mayor selectividad para inhibir a la COX-2, como el diclofenaco y el meloxicam. Por último, los inhibidores selectivos de la COX-2 presentan una acción específica sobre dicha isoenzima, sin afectar a la acción de la COX-1. Coloquialmente, se los conoce como coxibs, como el celecoxib, y se asocian con una reducción en la toxicidad intestinal, aunque con ciertos efectos adversos en el sistema cardiovascular (Tomić *et al.*, 2017; Bindu *et al.*, 2020).

Asimismo, la COX, en el caso de inhibidores no selectivos, también se puede utilizar para su clasificación de manera que se diferencian fármacos con una interacción libremente reversible (ibuprofeno), lentamente reversible (indometacina y diclofenaco) e irreversible (aspirina) (Tacconelli *et al.*, 2017). Finalmente, los AINEs se pueden clasificar también en función de su vida media plasmática ($T_{1/2}$) en dos grupos: compuestos con una $T_{1/2}$ corta (< 6 h) entre los que se incluyen el diclofenaco y el ibuprofeno, y por otro lado, compuestos con una $T_{1/2}$ más larga (> 10 h) como el naproxeno y el celecoxib (Bindu *et al.*, 2020).

A pesar de su diversidad a nivel estructural, los AINEs comparten ciertas propiedades farmacocinéticas. Los AINEs son principalmente ácidos débiles lo que permite que tengan una buena biodisponibilidad oral en animales monogástricos, mientras que en los rumiantes se ha observado una biodisponibilidad oral menor. Asimismo, dichos fármacos presentan una buena disponibilidad tras su administración subcutánea o intramuscular. Con respecto a su distribución,

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

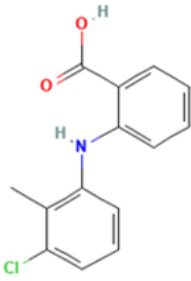
se caracterizan por presentar un volumen de distribución bajo debido a su elevada afinidad por las proteínas plasmáticas. La mayoría de los AINEs se metabolizan en hígado mediante reacciones de fase I y fase II formando metabolitos generalmente inactivos. No obstante, algunos fármacos se transforman en metabolitos activos como la aspirina que se convierte en ácido salicílico. Finalmente, su principal ruta de eliminación es la vía renal, aunque pueden existir otras como la biliar (Stock y Coetzee, 2015; Lees, 2018). Aun con su efecto beneficioso, la inhibición de la síntesis de PG mediada por los AINEs se relaciona con diversas reacciones adversas como por ejemplo alteraciones gastrointestinales (úlceras y hemorragias), hepatotoxicidad, alteraciones a nivel renal, alteraciones hematológicas o alteraciones cardiovasculares (Budsberg, 2015).

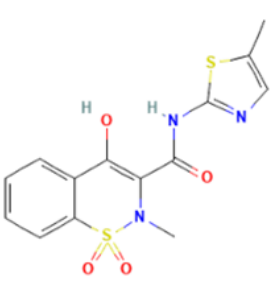
Los AINEs son fármacos ampliamente usados en medicina humana, pero también en el ámbito veterinario para tratar la inflamación, el dolor y la fiebre. Además, en veterinaria, los AINEs son utilizados en combinación con antibióticos para tratar las enfermedades respiratorias (Gallo *et al.*, 2010; Stock y Coetzee, 2015). Entre los AINES autorizados para el uso en animales productores de alimentos se encuentran el ácido tolfenámico y el meloxicam, para los cuales se establecen sus LMRs a fin de garantizar su seguridad alimentaria (**Tabla 3**).

Aunque los principales compuestos detectados como residuos farmacológicos en la leche son del grupo de los antibióticos, también se ha reportado la presencia de residuos de AINEs (Daeseleire *et al.*, 2017; Ergen y Yalçın, 2019; Yalçın *et al.*, 2020). Las posibles causas de la aparición de estos residuos son diversas entre ellas el incumplimiento de las instrucciones recomendadas en la etiqueta y de los tiempos de retiro, las interacciones químicas entre fármacos (Beyene, 2015) o las interacciones con transportadores (Zhang *et al.*, 2010).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 3. Estructura química y límites máximos de residuos (LMR) de los AINEs ácido tolfenámico (ganado bovino) y del meloxicam (ganado bovino y caprino) (*The European Commission, 2010*).

Ácido tolfenámico		
Estructura química	LMR	
	Músculo	50 µg/Kg
	Hígado	400 µg/Kg
	Riñón	100 µg/Kg
	Leche	50 µg/Kg

Meloxicam		
Estructura química	LMR	
	Músculo	20 µg/Kg
	Hígado	65 µg/Kg
	Riñón	65 µg/Kg
	Leche	15 µg/Kg

En relación con este último, la interacción de algunos AINEs y ABCG2 ha sido descrita previamente. Un ejemplo es el diclofenaco, el cual fue descrito como sustrato *in vitro* del transportador murino y humano de ABCG2 (Lagas *et al.*, 2009). Además, estudios con ratones *knockout* mostraron que *Abcg2* y *Abcc2* afectan a los niveles plasmáticos y a la excreción biliar del principal metabolito glucurónico del diclofenaco (Lagas *et al.*, 2010a). De igual modo, el flunixin y su metabolito fueron descritos como sustratos *in vitro* de la variante murina y bovina del transportador; así como también fue descrita la participación del transportador *Abcg2* en su secreción a leche mediante modelos de ratones hembra lactantes *Abcg2*^{-/-} (García-Mateos *et al.*, 2019). Por otra parte, también se ha descrito al ácido salicílico como inhibidor *in vitro* del transportador ABCG2 (Wassermann *et al.*, 2013).

3.2.1. Ácido tolfenámico

El ácido tolfenámico es un AINE que pertenece al grupo de los derivados del ácido antranílico, comúnmente conocidos como fenamatos, así como a los inhibidores no selectivos de COX. Es un fármaco utilizado en humanos y animales para el tratamiento de inflamaciones agudas, migrañas, artritis reumatoide y dolores postquirúrgicos debido a sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas (Patel *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2018). Debido a estas propiedades, se suele administrar en combinación con antimicrobianos para tratar enfermedades respiratorias y mastitis en ganado (European Medicines Agency, 1999; Sidhu *et al.*, 2006, 2011).

Las últimas investigaciones se han enfocado en el estudio de la acción antitumoral del ácido tolfenámico en diversos tipos de cáncer como el de mama (Kim *et al.*, 2013), de colon (Ha *et al.*, 2016) o de páncreas (Sankpal *et al.*, 2017). Dicha acción tumoral se asocia principalmente a la degradación del factor de transcripción de la proteína específica (Sp1) en presencia del ácido tolfenámico (Feldman *et al.*, 2018). Las células tumorales sobreexpresan proteínas Sp las cuales regulan la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es decir, Sp1 regula genes que están implicados en la proliferación celular, metástasis y en la apoptosis, asociándose a un mal pronóstico del cáncer. De modo que, el ácido tolfenámico disminuye la expresión de dichas proteínas, disminuyendo así el crecimiento tumoral y la metástasis (Abdelrahim *et al.*, 2006; Sankpal *et al.*, 2017). Estudios recientes han sintetizado el complejo formado por cobre y ácido tolfenámico (Cu-TA) para combatir el crecimiento de células tumorales, ya que combina las propiedades antitumorales del fármaco y el papel del cobre en funciones como el crecimiento y el metabolismo celular. Dicho complejo muestra una actividad antitumoral superior a la del ácido tolfenámico solo (Hurtado *et al.*, 2019). De igual modo, el ácido tolfenámico se considera una diana

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

terapéutica en la enfermedad de Alzheimer como consecuencia de la degradación de Sp1, la cual es también responsable de regular los niveles de la proteína precursora de β -amiloide y sus intermediarios, involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Subaiea *et al.*, 2013; Adwan *et al.*, 2015).

La farmacocinética del ácido tolfenámico se ha estudiado tanto en humanos como en ganado bovino, ovino, caprino, perros, caballos y ratas (Jausaud *et al.*, 1992; McKellar *et al.*, 1994; Pedersen, 1994; Sidhu *et al.*, 2005, 2006; Patel *et al.*, 2011; Corum *et al.*, 2018; Turk *et al.*, 2021). Como AINE, el ácido tolfenámico se caracteriza por una rápida absorción tras su administración por vía oral, una elevada unión a proteínas, rápida distribución y aclaramiento. Las vías de administración varían entre especies; así pues, existen formulaciones inyectables para uso en bovinos y formulaciones orales para caballos, siendo la vía oral, la vía exclusiva de administración en humanos. En ganado bovino, el ácido tolfenámico puede administrarse por vía i.v. o i.m. a una dosis de 2 mg/kg durante dos días, o mediante una inyección única de 4 mg/kg (European Medicines Agency, 1999). Tras la administración oral de ácido tolfenámico en humanos, la C_{max} (1,9 $\mu\text{g/ml}$) se alcanza entre los 60 y 90 min, la $T_{1/2}$ es de entre 2-3 h y el aclaramiento plasmático es de alrededor de 2,5 ml/min/kg (Pedersen, 1994; Ahmed *et al.*, 2018). En el caso del ganado bovino, la $T_{1/2}$ es ligeramente más larga, 8-10 h (Sidhu *et al.*, 2005). Esta farmacocinética puede verse alterada por la coadministración de antimicrobianos. Así pues, Patel *et al.* (2011) estudió el efecto de la coadministración del ácido tolfenámico junto con moxifloxacino en ratas, observando que el moxifloxacino modifica parámetros del AINE como la C_{max} y el volumen de distribución, pero no la $T_{1/2}$ o el AUC, tanto en ratas macho como hembra. Resultados similares también se obtienen al coadministrar el ácido tolfenámico junto con marbofloxacino en terneros y

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

cabras, aunque las diferencias no fueron en todos los casos significativas (Sidhu *et al.*, 2005, 2006, 2011).

El ácido tolfenámico se metaboliza en hígado dando lugar a diversos metabolitos (**Figura 13**) y solo un 10% es eliminado sin ser metabolizado. Los principales metabolitos se forman mediante hidroxilaciones del anillo de benceno en el caso del metabolito 1 (ácido N-[(2-metil-3-cloro-4-hidroxifenil)-amino]benzoico) y del grupo metilo en el metabolito 2 (ácido N-[(2-hidroximetil-3-clorofenil) amino]benzoico).

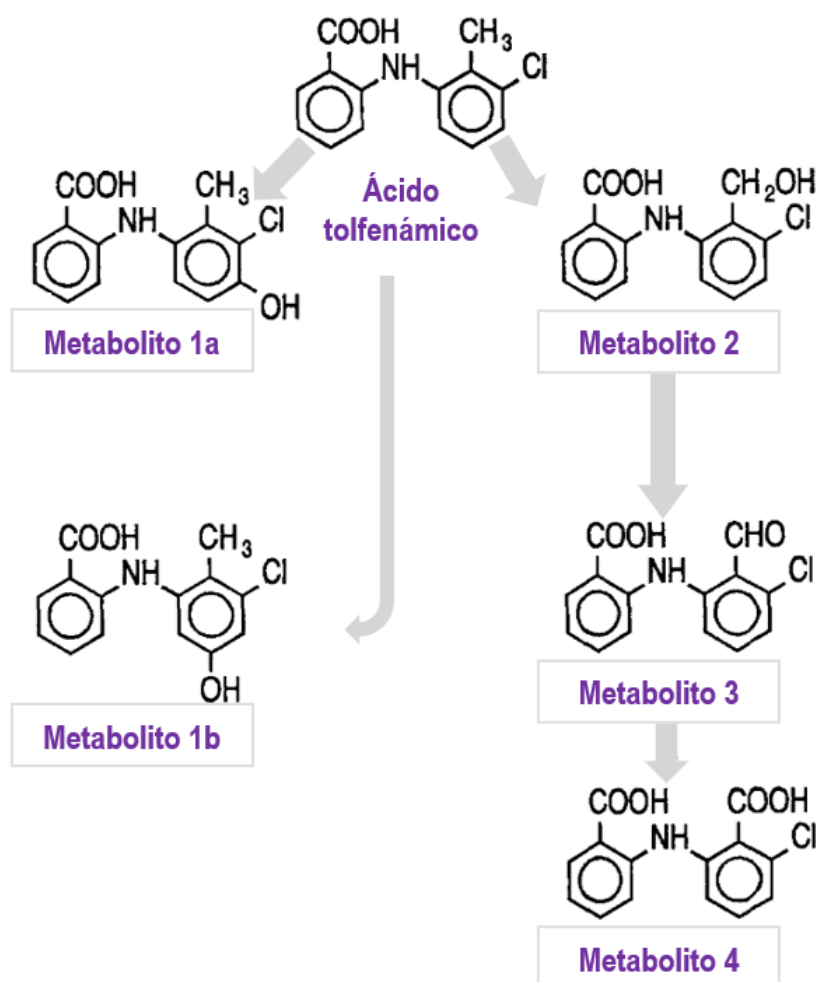


Figura 13. Esquema del metabolismo del ácido tolfenámico (Adaptado de Pedersen (1994)).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

No obstante, estos metabolitos presentan una actividad menor que el compuesto parental en términos de actividad antiinflamatoria y analgésica (*European Medicines Agency*, 1999). A partir del metabolito 2 por oxidación en el grupo aldehído, se forma el metabolito 3, el cual mediante la adición del ácido carboxílico genera el metabolito 4. Asimismo, se forman metabolitos conjugados con ácido glucurónico. Alrededor del 90% del ácido tolfenámico se excreta por la orina después de su administración oral, mientras que el fármaco restante es eliminado por bilis y heces (Pedersen, 1994; Ahmed *et al.*, 2018).

Como AINE, los principales efectos secundarios del ácido tolfenámico son los problemas a nivel gastrointestinal (náuseas, diarrea, sangrado ocasional y ulceración). Asimismo, induce hepatotoxicidad y está contraindicado en pacientes con insuficiencia hepática o renal. No obstante, se ha observado que el ácido tolfenámico es mejor tolerado y muestra menos efectos secundarios en comparación con otros AINEs (Ahmed *et al.*, 2018; Turk *et al.*, 2021).

En relación con los residuos farmacológicos, el propio ácido tolfenámico es utilizado como residuo marcador. Basándose en los LMRs establecidos para el ácido tolfenámico en ganado bovino (**Tabla 3**), el periodo de retiro aprobado para la carne tras una inyección s.c. de 2 mg/kg es de 7 días, mientras que para la leche se ha establecido un periodo de retiro de 24 horas tras una administración i.v. de 4 mg/kg (Smith *et al.*, 2008). A pesar de ello, varios estudios han detectado la presencia de residuos de AINEs en madres lactantes, siendo el ácido tolfenámico el más abundante (Ergen y Yalçın, 2019; Yalçın *et al.*, 2020).

3.2.2. Meloxicam

El meloxicam es un AINE perteneciente al grupo de los oxicams, derivados del ácido enólico. Asimismo, se clasifica dentro de los inhibidores no selectivos de COX, con preferencia por COX-2 (Bindu *et al.*, 2020; Khalil y Aldosari, 2020). Además, el meloxicam tiene un segundo mecanismo de acción ya que está involucrado en la vía del óxido nítrico-GMP cíclico la cual juega un papel importante en el efecto analgésico. De esta forma, se sugiere que el meloxicam activa dicha vía permitiendo la apertura de los canales de potasio, lo que generaría un efecto antinociceptivo periférico (Ortiz *et al.*, 2005).

Debido a sus propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas, el empleo de este AINE se encuentra muy extendido tanto en medicina humana como en veterinaria. Por un lado, en medicina humana es usado para el tratamiento de la artritis reumatoide, la osteoartritis, la ciática, el lumbago y los dolores postoperatorios (Borghini *et al.*, 2013; Nagy *et al.*, 2017; Bekker *et al.*, 2018). Además, se ha observado un papel protector del meloxicam en los procesos de neuroinflamación (Haile *et al.*, 2016), reduciendo tanto dicha neuroinflamación como el estrés oxidativo en la médula espinal y en el cerebro (Kantha *et al.*, 2018; Dik *et al.*, 2019). Por ello, el meloxicam podría ser una prometedora diana terapéutica en enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Manoharan *et al.*, 2016). De hecho, se ha observado una mejora en los síntomas de la enfermedad de Alzheimer en ratones tratados con meloxicam (Janiski *et al.*, 2016).

Por otro lado, en ganado vacuno el meloxicam se usa frecuentemente en combinación con antibióticos para el tratamiento de procesos respiratorios y diarreas (Daeseleire *et al.*, 2017; Khalil y Aldosari, 2020), así como en patologías relacionadas con la lactación, como la mastitis, en las

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

cuales se ha observado que la combinación presenta ventajas económicas para el ganadero (Fitzpatrick *et al.*, 2013; van Soest *et al.*, 2018). El meloxicam es usado también en cerdos para trastornos del aparato locomotor o dolores postoperatorios, así como en caballos para los dolores por cólicos y trastornos musculoesqueléticos. Además, el meloxicam es ampliamente utilizado en animales domésticos como perros y gatos para reducir la inflamación y los dolores postoperatorios y musculares (Budsberg, 2015; *European Medicines Agency*, 2018).

El meloxicam está disponible como suspensión oral o solución inyectable. La formulación y dosis utilizada depende de la especie y la patología a tratar (*European Medicines Agency*, 2018). Así pues, la dosis oral recomendada en humanos es de entre 7,5 -15 mg/kg mientras que, en el ganado bovino, el meloxicam se administra como una dosis única i.v. o s.c de 0,5 mg/kg (Smith *et al.*, 2008; Khalil y Aldosari, 2020).

En relación con su farmacocinética, el meloxicam se caracteriza por presentar una biodisponibilidad del 90% tras su administración oral. Los parámetros farmacocinéticos del meloxicam han sido descritos como lineales o independientes de la dosis en el rango entre 7,5 a 30 mg, mostrando bioequivalencia para varias formulaciones diferentes. En el caso de la absorción, esta se puede ver modificada por la ingesta de alimentos, observándose en humanos que en ayunas la C_{max} se alcanzó a las 10 h, mientras que tras la ingesta de alimento la C_{max} se alcanzó entre las 5-6 h (Bekker *et al.*, 2018; Christensen *et al.*, 2018; Khalil y Aldosari, 2020). Debido a ese pico plasmático retrasado, las preparaciones orales de meloxicam son poco utilizadas para el tratamiento del dolor agudo como el postoperatorio, para lo cual se han desarrollado otras formulaciones como las intravenosas (Singla *et al.*, 2018). Como fármaco perteneciente a los AINEs se caracteriza por presentar una elevada unión a proteínas plasmáticas, restringiendo el

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

volumen de distribución. De igual modo, el meloxicam se metaboliza en hígado dando lugar a cuatro metabolitos biológicamente inactivos. Entre ellos, los dos más importantes son el metabolito formado por hidroxilación del grupo 5-metilo del anillo tiazol, el 5-hidroximetilo meloxicam, y posteriormente por oxidación, el 5-carboxi meloxicam (**Figura 14**). El citocromo P-450 2C9 (CYP2C9) juega un papel importante en esta vía metabólica, así como el CYP3A4, aunque en menor medida (Miyamoto *et al.*, 2017; Khalil y Aldosari, 2020).

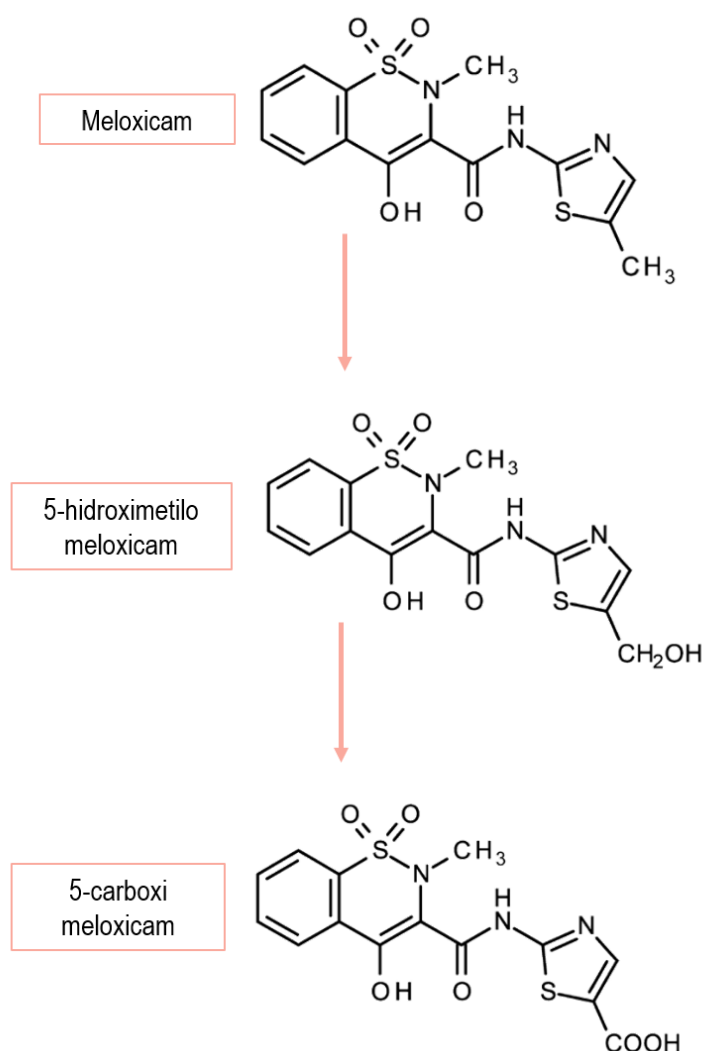


Figura 14. Principales metabolitos del meloxicam, 5-hidroximetilo meloxicam y 5-carboxi meloxicam (Miyamoto *et al.*, 2017).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El estudio de Miyamoto *et al.* (2017) mostró la farmacocinética del meloxicam y sus metabolitos en plasma de rata tras su administración oral (2 mg/kg), observando que el meloxicam fue detectado en todos los puntos muestreados pero sus metabolitos presentaron concentraciones significativamente inferiores, siendo en ocasiones inferiores al límite de cuantificación (LOQ). Estos metabolitos son eliminados a través de la orina y las heces, encontrándose menos de un 1% del compuesto parental. La $T_{1/2}$ de meloxicam es constante, aproximadamente 20 h, lo que indica un metabolismo lineal dentro del rango de dosis terapéutica (Bekker *et al.*, 2018; Khalil y Aldosari, 2020).

Como se ha mencionado anteriormente, la toxicidad a nivel gastrointestinal es uno de los efectos secundarios más comunes en los AINEs. No obstante, se ha observado que la tolerabilidad gastrointestinal en humanos del meloxicam es superior en comparación con otros AINEs (Zeidler *et al.*, 2002), posiblemente por su preferencia en la inhibición por la COX-2. A nivel renal, no se observaron efectos adversos significativos tras la coadministración de meloxicam, así como tampoco diferencias en la farmacocinética entre pacientes sanos y pacientes con insuficiencia renal, para los cuales suelen estar desaconsejados la mayoría de los AINEs. Asimismo, tampoco se observaron efectos adversos importantes a nivel cardiovascular o hepático del meloxicam en comparación con otros AINEs (Lapeyre-Mestre *et al.*, 2013; Bekker *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta que el meloxicam es un fármaco regulado para su uso veterinario en animales productores de alimentos, se han establecido LMRs de este compuesto en carne y leche, usando el compuesto parental como residuo marcador (**Tabla 3**). Asimismo, se han establecido los tiempos de espera o retiro para la carne y la leche en 15 y 5 días respectivamente, en ganado bovino (*The European Commission*, 2010; *European Medicines Agency*, 2018). Finalmente, un

estudio reciente sugiere la importancia de la etapa de la lactación en la que se encuentren los animales para establecer el período de espera en leche, ya que se observaron diferencias en la biodisponibilidad del meloxicam entre ganado tras el parto y aquel que se encontraba en medio del periodo de lactación. En concreto, se observó una mayor exposición a meloxicam, reflejada en un mayor valor de AUC y una disminución del aclaramiento, en las vacas tras el parto (Warner *et al.*, 2020).

3.3. ANTIPARASITARIOS

Las infecciones provocadas por parásitos como la fascioliasis representan un grave problema no solo en la ganadería, produciendo pérdidas económicas asociadas a la disminución de la producción lechera y del bienestar animal, sino también en la salud humana. La fascioliasis es una trematodiasis causada por dos especies, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. Aunque es una enfermedad que afecta principalmente a los animales herbívoros, estos parásitos pueden ser transmitidos por los alimentos y el agua a los humanos (**Figura 15**). En los últimos años se ha observado que la fascioliasis puede verse afectada por el cambio climático ya que dichos parásitos son susceptibles a las condiciones ambientales; de hecho, se ha reportado que la frecuencia de casos en humanos está aumentando (Mas-Coma *et al.*, 2018; Siles-Lucas *et al.*, 2021).

Cabe destacar que la prevalencia de la fascioliasis humana no siempre se correlaciona con la prevalencia en animales. En general, en áreas endémicas, la alta prevalencia humana se relaciona con zonas con medidas de saneamiento e higiene deficientes (Mas-Coma *et al.*, 2019; Siles-Lucas *et al.*, 2021).

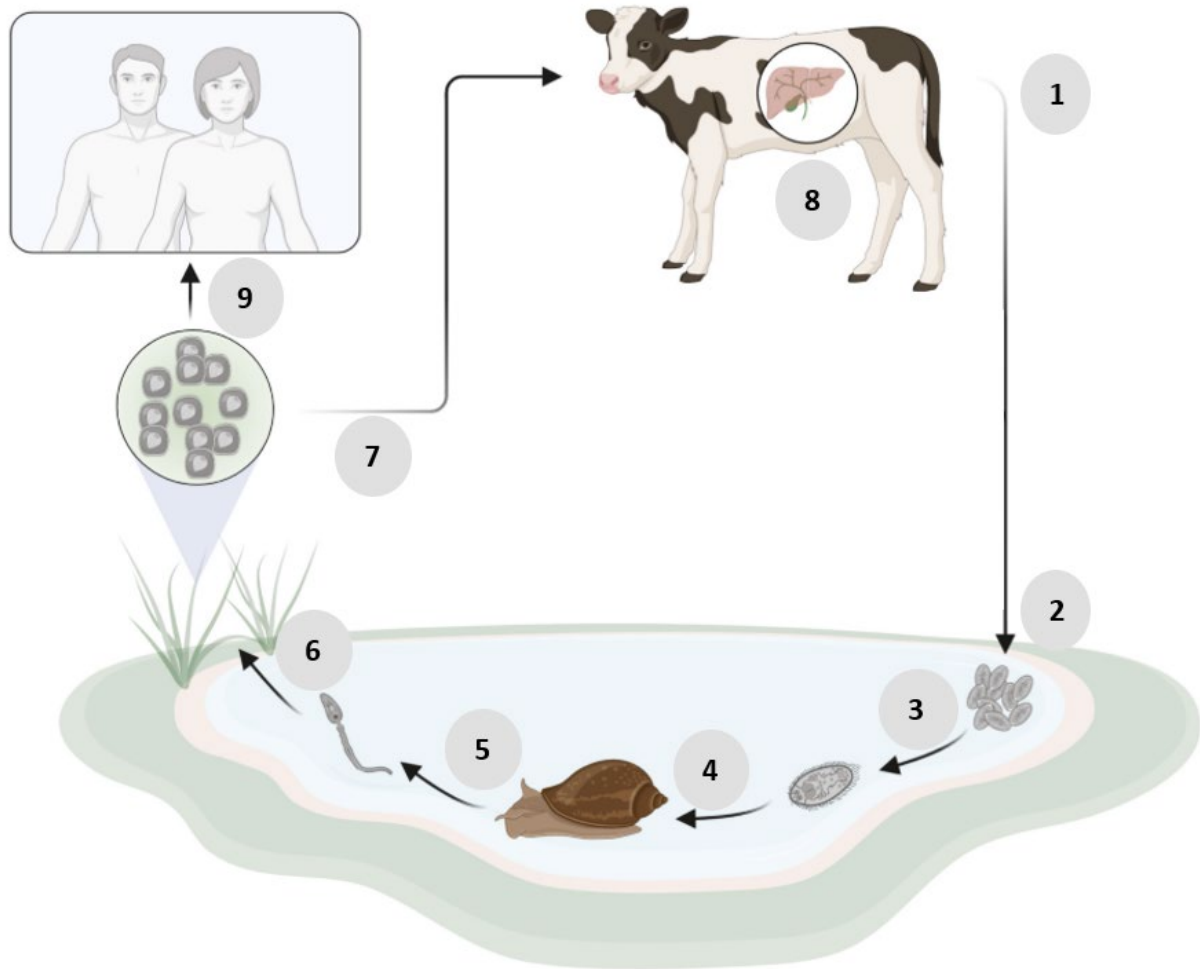


Figura 15. Esquema del ciclo de vida de *Fasciola sp.* Los huevos del parásito se eliminan en las heces de los animales infectados (1). Dichos huevos se depositan en el agua (2) donde eclosionan y liberan el miracidio (3), el cual se pone en contacto con el hospedador intermediario (caracol) (4). En el interior del caracol, el miracidio se divide produciendo cercarias que son liberadas al agua (5), donde se enquistan generalmente adheridas a las plantas acuáticas, formando las metacercarias (6). Dichas metacercarias (etapa infectiva) son ingeridas por el hospedador final, los animales herbívoros (7), liberando las formas juveniles del parásito en el intestino delgado, las cuales migran hasta los conductos biliares del huésped (8). La transmisión a los humanos se basa en el consumo de plantas acuáticas y agua contaminadas (9) (Adaptado de Siles-Lucas *et al.* (2021)).

Se pueden distinguir cuatro periodos clínicos en la fascioliasis: el periodo de incubación comprendido desde la ingestión de las metacercarias hasta la aparición de los primeros síntomas, el período invasivo o agudo cuando los parásitos migran hasta los conductos biliares, el periodo de latencia en el cual los parásitos se convierten en adultos y finalmente, el periodo crónico u

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

obstructivo tras meses o años de infección. Los principales síntomas aparecen en el periodo invasivo y entre ellos se incluyen fiebre, dolor abdominal, trastornos gastrointestinales, náuseas y diarrea. Asimismo, durante el periodo crónico, los parásitos pueden causar inflamación en los conductos y en la vesícula biliar, resultando en colangitis y colecistitis. En las infecciones más graves, dichos procesos inflamatorios junto con el tamaño de los parásitos adultos pueden provocar la obstrucción de las vías biliares (Mas-Coma *et al.*, 2019).

El tratamiento de estas infecciones se basa en el uso de diversos fármacos antihelmínticos como ABZ, clorsulón y closantel, entre otros (Keiser y Utzinger, 2009; Vercruysse *et al.*, 2018; Siles-Lucas *et al.*, 2021). Sin embargo, el uso exhaustivo de estos fármacos se ha asociado con el desarrollo de resistencias (Lanusse *et al.*, 2018). La resistencia puede surgir debido a dos mecanismos diferentes, dependiendo de si afecta a la farmacodinámica o a la farmacocinética. En el primer caso, se producen cambios en los lugares donde los antihelmínticos ejercen su acción, lo que conduce a una disminución en su eficacia. Por otro lado, los mecanismos que afectan a la farmacocinética están asociados a la reducción de las concentraciones del fármaco en los parásitos, ya sea por una reducción en su captación o un aumento en su eliminación (Stuchlíková *et al.*, 2018). En este último caso, la expresión de transportadores ABC en los parásitos juega un papel relevante en el desarrollo de resistencias (Leprohon *et al.*, 2011; Raza *et al.*, 2016; Kelleroová *et al.*, 2020). Así pues, diversos estudios han observado la sobreexpresión de P-gp en nematodos resistentes inducida por la exposición a diversos antihelmínticos (Raza *et al.*, 2016; Maté *et al.*, 2018; Kelleroová *et al.*, 2019, 2020). En relación con ABCG2, no existe tanta información sobre su expresión en parásitos aunque si se ha detectado en el trematodo *Fasciola hepatica* (Kumkate *et al.*, 2008).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Una de las principales estrategias para combatir dicha resistencia es el uso de combinaciones de fármacos antihelmínticos (Lanusse *et al.*, 2018; Fissiha y Kinde, 2021; Canton *et al.*, 2023). Así pues, estudios previos han descrito que la administración conjunta de fármacos contra nematodos y trematodos, como la ivermectina y el clorsulón, mejora la eficacia, amplía el espectro de actividad antihelmíntica y limita la aparición de resistencias (Dupuy *et al.*, 2010). De igual forma, otras combinaciones de antiparasitarios han sido testadas contra las geohelmintiasis como el ABZ junto con ivermectina y la tribendimidina con ivermectina (Moser *et al.*, 2019). Estas combinaciones de fármacos no solo mejoran la eficacia antihelmíntica, sino que también ayudan a ralentizar el desarrollo de resistencias. Por un lado, los parásitos muestran una menor resistencia cuando se enfrentan a una formulación que contiene múltiples compuestos activos con diferentes mecanismos de acción, en comparación con los tratamientos que emplean únicamente un antiparasitario (Lanusse *et al.*, 2018). Además, las combinaciones retrasan el desarrollo de una población de parásitos resistentes al reducir el número de genotipos resistentes que sobreviven al tratamiento, ya que múltiples alelos que confieran resistencia a todas las clases de antihelmínticos que componen la combinación deben estar presentes en el parásito para sobrevivir (Bartram *et al.*, 2012).

No obstante, el uso de combinaciones de fármacos tampoco está exento de riesgos y puede conducir a interacciones farmacológicas que deben evaluarse cuidadosamente, como la interferencia con transportadores ABC (Lanusse *et al.*, 2018; Virkel *et al.*, 2019). Asimismo, la farmacoterapia con antiparasitarios en ganado de producción lechera constituye un problema de salud pública debido a la presencia de residuos de dichos fármacos en la leche y sus productos

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

derivados (Statham, 2015). Por lo tanto, el estudio de los factores que puedan afectar la aparición de residuos en leche y, en consecuencia, en los productos lácteos es de gran relevancia.

Debido a lo expuesto anteriormente, se ha considerado que el transportador de membrana ABCG2 puede ser uno de estos factores ya que juega un papel importante en la secreción activa de compuestos a la leche (García-Lino *et al.*, 2019); afectando a su calidad y seguridad. Asimismo y como se ha mencionado previamente, la inhibición de ABCG2 a través de interacciones farmacológicas afecta no solo a la secreción a leche de sus sustratos, sino también, a su biodisponibilidad plasmática (Real *et al.*, 2011a; Barrera *et al.*, 2013; García-Lino *et al.*, 2021a).

La interacción entre ABCG2 y algunos antiparasitarios ha sido estudiada previamente como por ejemplo con el oxfendazol y la moxidectina, los cuales fueron descritos como sustratos *in vitro* de la variante murina del transportador (Merino *et al.*, 2005c; Pérez *et al.*, 2009a). Asimismo, el metabolito principal del monepantel, monepantel sulfona, ha sido descrito como sustrato de la variante bovina del transportador (Mahnke *et al.*, 2016). En relación con el ABZ y su interacción con ABCG2, estudios previos han observado que el compuesto parental no es sustrato *in vitro* de la variante murina del transportador, pero sí lo es uno de sus metabolitos, el ABZSO (Merino *et al.*, 2005c).

Por el contrario, los metabolitos del triclabendazol y algunas lactonas macrocíclicas fueron descritos como inhibidores del transportador (Merino *et al.*, 2009; Barrera *et al.*, 2012; González-Lobato *et al.*, 2014; García-Lino *et al.*, 2021a). Con respecto a estas últimas, cabe destacar que son compuestos producidos por la fermentación de *Streptomyces* y son ampliamente utilizados en medicina veterinaria debido a su actividad contra nematodos y artrópodos a dosis bajas (El-Saber Batiha *et al.*, 2020; Junco *et al.*, 2021). En concreto, la ivermectina, la selamectina, la doramectina

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

y la eprinomectina fueron descritas como inhibidores del transportador ABCG2 mediante la utilización de estudios *in vitro* de acumulación del sustrato fluorescente MXR (Merino *et al.*, 2009; González-Lobato *et al.*, 2014; Garcia-Lino *et al.*, 2021a). En el caso de la ivermectina y la eprinomectina, su efecto inhibitor fue corroborado utilizando ensayos de transporte *in vitro* con sustratos conocidos de ABCG2 como el danofloxacino (Real *et al.*, 2011a; Garcia-Lino *et al.*, 2021a) y el ABZSO (Muenster *et al.*, 2008). No obstante, la relación que existe entre el resto de los metabolitos del ABZ, el clorsulón y el closantel con ABCG2 no ha sido descrita.

3.3.1. Albendazol

El ABZ es un antiparasitario perteneciente a la familia de los benzimidazoles, hidrocarburos aromáticos heterocíclicos, utilizado ampliamente en medicina veterinaria y humana contra infecciones gastrointestinales causadas por nematodos, trematodos y cestodos (*European Medicines Agency*, 2004; Siles-Lucas *et al.*, 2018). El ABZ fue aprobado por primera vez como antihelmíntico para uso en humanos en 1982 contra helmintiasis transmitidas por el suelo o geohelmintiasis debido a su seguridad y eficacia. Estas parasitosis son las más comunes en el mundo, afectando al 24% de la población, principalmente en países del continente africano, sudamericano y asiático en mujeres y niños (Schulz *et al.*, 2019; *World Health Organization*, 2022). En concreto, el ABZ es usado de forma preventiva en mujeres en edad reproductiva, incluidas mujeres embarazadas y lactantes, debido al alto riesgo de ser infectadas con dichas geohelmintiasis, las cuales causan malabsorción de nutrientes, pérdida de apetito, pérdida crónica de sangre y anemia (Mofid *et al.*, 2021). El ABZ es también el fármaco de elección para tratar la filarisis linfática (Abdel-Tawab *et al.*, 2009). De igual modo, es uno de los fármacos antihelmínticos más utilizados en rumiantes debido a su baja toxicidad y bajo coste (Jaeger y Carvalho-Costa,

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2017; Diez *et al.*, 2022). Así pues, el ABZ es utilizado contra la equinococosis o hidatidosis, enfermedad causada por parásitos del género *Echinococcus*. Esta parasitosis afecta tanto a humanos como ganado vacuno y ovino tras la ingestión de los huevos del parásito, los cuales se encuentran en las heces de los hospedadores definitivos, los cánidos (Siles-Lucas *et al.*, 2018). El tratamiento con ABZ es también la principal herramienta para el control del trematodos adultos de *Fasciola hepatica*, que afectan tanto a ganado como a humanos (Alvarez *et al.*, 2020).

Sin embargo, como hemos indicado anteriormente, el uso frecuente e indiscriminado de los antihelmínticos en el ganado ha causado la aparición de parásitos resistentes a ellos y por consiguiente, la eficacia del tratamiento se ve reducida; por ejemplo, se ha observado resistencia al ABZ en ovejas infectadas por nematodos (Borgsteede *et al.*, 2007; Veríssimo *et al.*, 2012), así como por *Fasciola hepatica* (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006; Sanabria *et al.*, 2013; Martínez-Valladares *et al.*, 2014; Novobilský *et al.*, 2016).

Como benzimidazol, el mecanismo de acción del ABZ consiste en su unión a la β -tubulina del parásito, interfiriendo en la formación de los microtúbulos y por lo tanto, inhibiendo todos los procesos celulares mediados por dichos microtúbulos como la división celular (Siles-Lucas *et al.*, 2018). Debido a este modo de acción, se ha observado que el ABZ presenta actividad antitumoral ya que inhibe la proliferación celular e induciendo la apoptosis en diversos tipos de cáncer. Su actividad antitumoral también se relaciona con su efecto inhibitor sobre el VEGF y la angiogénesis tumoral (Pourgholami *et al.*, 2006, 2010). Estudios recientes continúan investigando dicho potencial del ABZ como antitumoral (Movahedi *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020).

Con respecto a su farmacocinética, el ABZ se caracteriza por ser relativamente insoluble en agua lo cual limita su absorción intestinal y compromete su eficacia terapéutica (Hong, 2018).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Diversas estrategias han sido desarrolladas para mejorar la biodisponibilidad del fármaco como por ejemplo, la administración del ABZ junto con comidas ricas en grasas la cual aumentó su disponibilidad plasmática en comparación con la administración en ayunas (Siles-Lucas *et al.*, 2018). En este sentido, se ha observado que la solubilidad y disponibilidad del ABZ mejora con emulsiones de aceite de soja (Shuhua *et al.*, 2002), incorporación a liposomas (Dvorožňáková *et al.*, 2004) o nanocápsulas de lípidos (Pensel *et al.*, 2015). Dicho problema de solubilidad limita las vías de administración del ABZ a oral o intrarruminal en ganado y oral en humanos (Moreno *et al.*, 2005; Siles-Lucas *et al.*, 2018). En ganado bovino y ovino, se administra a dosis entre 5 a 10 mg/kg mientras que en humanos se recomienda una dosis de 400 mg/persona (Dayan, 2003).

Tras su administración oral y absorción intestinal, el ABZ se metaboliza mayoritariamente en hígado a través de reacciones de oxidación dando lugar al ABZSO y ABZSO₂, y posteriormente, por acción de deacetilasas se forma el ABZSO₂-NH₂ (**Figura 16**) (European Medicines Agency, 2004; Siles-Lucas *et al.*, 2018). Asimismo, se ha observado que el ABZ también puede metabolizarse a nivel intestinal (Merino *et al.*, 2003). Estas oxidaciones sucesivas de ABZ conducen a metabolitos más polares (Alvarez *et al.*, 1999). El metabolismo hepático e intestinal del ABZ se produce principalmente por dos sistemas enzimáticos, la flavin-monooxigenasa (FMO) y el CYP450. En concreto, ambos mecanismos están involucrados en la conversión de ABZ a ABZSO, mientras que solo el CYP450 está involucrado en la formación de ABZSO₂ (Merino *et al.*, 2003) (**Figura 16**). Además, el ABZSO puede ser reducido a ABZ por la microflora del tracto gastrointestinal, funcionando como un reservorio de ABZ el cual presenta una mayor afinidad por la β -tubulina del parásito y, por lo tanto, una mayor eficacia (Alvarez *et al.*, 1999; Diez *et al.*, 2022). Cabe destacar que un aumento en la actividad o expresión de las enzimas metabólicas se ha

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

relacionado con la aparición de resistencias a los benzimidazoles como el ABZ (Lanusse *et al.*, 2018; Stuchlíková *et al.*, 2018). Los metabolitos del ABZ son detectados en plasma mientras que el compuesto parental es generalmente indetectable (Siles-Lucas *et al.*, 2018). Finalmente, la vía renal y biliar se consideran las rutas de eliminación del ABZ debido a la presencia del ABZSO y ABZSO₂ en la orina y bilis (Alvarez *et al.*, 1999; Dayan, 2003).

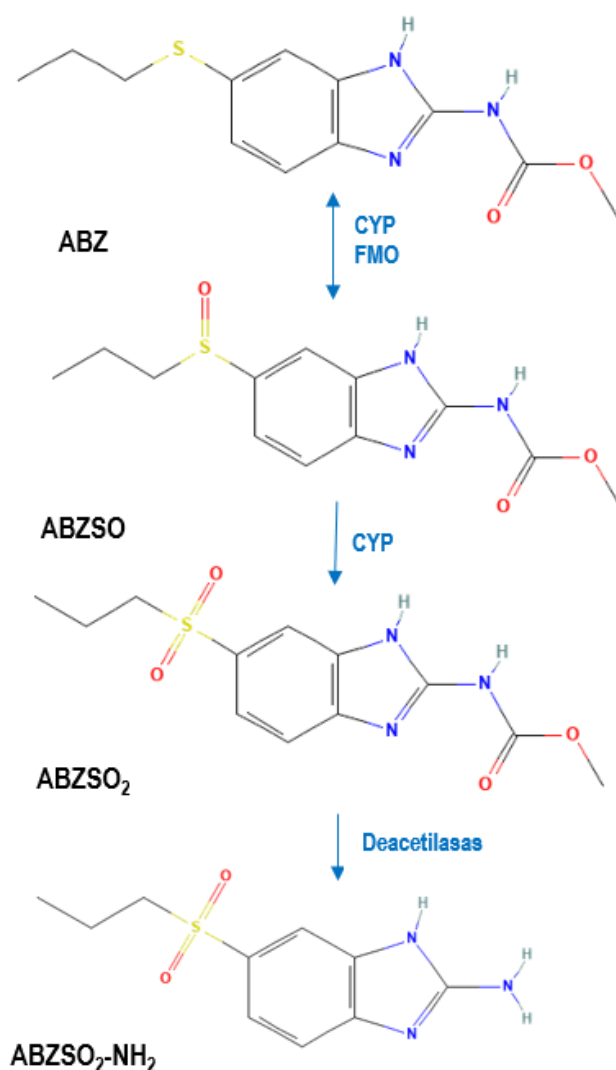


Figura 16. Metabolismo del albendazol. Se muestran las estructuras del albendazol (ABZ) y sus metabolitos: albendazol sulfóxido (ABZSO), albendazol sulfona (ABZSO₂) y albendazol 2-aminosulfona (ABZSO₂-NH₂). FMO, flavin-monooxigenasa; CYP, citocromo P-450 (basada en Rawden *et al.*, 2000).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Con respecto a la actividad antihelmíntica, se ha observado que tanto el ABZ como el ABZSO son compuestos activos, mientras que el ABZSO₂-NH₂ ha sido considerado biológicamente inactivo (Batzias y Delis, 2004). En el caso del ABZSO₂ hay estudios contradictorios ya que inicialmente se sugirió que carecía de actividad antihelmíntica; sin embargo, estudios posteriores demuestran que esta actividad existe (Ingold *et al.*, 1999; Rawden *et al.*, 2000; Stettler *et al.*, 2001; Adas *et al.*, 2009). Se ha observado que el tratamiento con ABZ detiene el crecimiento del parásito pero no lo elimina, de manera que no es efectivo en todos los casos y la recurrencia es alta (Siles-Lucas *et al.*, 2018). Por ello, la actividad antihelmíntica del ABZ ha sido mejorada mediante la combinación con otros fármacos, las cuales modifican los perfiles farmacocinéticos causando un efecto sinérgico y mejorando su eficacia terapéutica. Así pues, la coadministración de ABZ junto con ivermectina incrementa la disponibilidad plasmática del ABZ en corderos (Alvarez *et al.*, 2008). La eficacia de dicha combinación ha sido evaluada en diversos estudios clínicos (Knopp *et al.*, 2010; Matamoros *et al.*, 2021; Krolewiecki *et al.*, 2022). De igual modo, la combinación de ABZ y nitazoxanida fue más eficaz que el tratamiento solo de ABZ en ratones infectados con *Echinococcus multilocularis* debido a un aumento en la disponibilidad de ABZSO en plasma (Stettler *et al.*, 2004). No obstante, estas alteraciones en la disponibilidad pueden asociarse a posibles toxicidades (Viviani *et al.*, 2019).

El ABZ se considera un fármaco relativamente seguro ya que la frecuencia de efectos secundarios indeseables osciló entre el 3% y el 5%. No obstante, en estudios con ratas, se han observado malformaciones externas y esqueléticas en fetos tras la administración de ABZSO en dosis elevadas a las madres gestantes (Capece *et al.*, 2003; Teruel *et al.*, 2009). En humanos, algunas de las reacciones adversas descritas fueron ictericia, cefalea, alteración de las

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

transaminasas séricas, vértigo, caída del cabello y prurito (Siles-Lucas *et al.*, 2018). Generalmente, la aparición de efectos adversos se relaciona con la administración de ABZ a dosis más altas de las recomendadas durante períodos prolongados (Hong, 2018).

En último lugar, el ABZ es un fármaco regulado para su uso en animales destinados a la producción de alimentos, por lo tanto, las autoridades han determinado sus LMRs. Los residuos marcadores de benzimidazoles se definen como la suma del fármaco original y sus metabolitos principales o más persistentes. Por consiguiente, el residuo marcador para el ABZ es la suma de ABZSO, ABZSO₂ y ABZSO₂-NH₂ (*The European Commission*, 2010; Bustamante-Rangel *et al.*, 2022) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos para el ABZ por el Reglamento (EU) N°37/2010 para los alimentos de origen animal.

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie	LMR	Tejido diana
Albendazol	Suma de albendazol sulfóxido, albendazol sulfona y albendazol 2-amino sulfona, expresada como albendazol	Todos los rumiantes	100 µg/Kg	Músculo
			100 µg/Kg	Grasa
			1000 µg/Kg	Hígado
			500 µg/Kg	Riñón
			100 µg/Kg	Leche

En base a estos LMRs, se ha establecido el periodo de retiro en leche de 3 días en ganado bovino (Moreno *et al.*, 2005). Tras la administración de ABZ, los tres metabolitos han sido detectados en leche en ganado bovino, ovino y caprino (Liguoro *et al.*, 1996; Fletouris *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2017). Estos residuos fueron también detectados en muestras

de leche que procedían de explotaciones ganaderas las cuales suministran leche a productores de derivados lácteos. Aunque los niveles no excedieron los LMR o la ingesta diaria admisible (IDA), se destaca la importancia de vigilar los niveles de dichos residuos tras los procesos de elaboración de derivados lácteos como el queso (Tsioukias *et al.*, 2010, 2013). En el caso de mujeres lactantes, se ha detectado mayoritariamente el ABZSO 36 horas después de la administración de ABZ. No obstante, los niveles alcanzados en la leche materna no se consideran dañinos para el lactante (Abdel-Tawab *et al.*, 2009).

3.3.2. Clorsulón

El clorsulón es un antiparasitario perteneciente a la familia de las bencenosulfonamidas y es usado en ganado ovino y bovino contra trematodos adultos (*Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*), aunque también posee una eficacia moderada contra estadios inmaduros (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006; European Medicines Agency, 2008). Además, el clorsulón ha sido utilizado con éxito en corderos infectados con *Fasciola hepatica* resistentes al antiparasitario triclabendazol (Coles y Stafford, 2001). Un estudio reciente ha propuesto también su uso en el tratamiento contra la esquistosomiasis (Ferraroni *et al.*, 2022), enfermedad parasitaria causada por trematodos del género *Schistosoma* y que afecta principalmente a las poblaciones humanas más pobres del mundo (Biendl *et al.*, 2022). La actividad antihelmíntica del clorsulón también ha sido evaluada *in vitro* contra parásitos del género *Echinococcus* responsables de enfermedades zoonóticas como la echinococcosis en humanos, aunque los resultados de los estudios son contradictorios (Richter *et al.*, 2013; Xin *et al.*, 2019).

El clorsulón se comercializa en combinación con la lactona macrocíclica ivermectina dando lugar a una formulación antihelmíntica de amplio espectro gracias a la asociación de un fármaco

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

contra nematodos (ivermectina) y un fármaco contra trematodos (clorsulón) (Meaney *et al.*, 2003; *European Medicines Agency*, 2008). Diversos estudios han evaluado la eficacia de dicha combinación contra infecciones causadas por nematodos gastrointestinales en ovejas (Heredia *et al.*, 2016) y por *Fasciola hepatica* en ovejas, vacas y ratas (Sibille *et al.*, 2000; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2012; Zárate-Rendón *et al.*, 2023); así como para el tratamiento simultáneo contra nematodos y trematodos (Ibarra-Velarde *et al.*, 2001). De igual modo, se ha observado una notable eficacia de la combinación de clorsulón junto con ivermectina y nitroxinil en ganado bovino para el tratamiento contra *Fasciola hepatica* (Hutchinson *et al.*, 2009). En relación con el tratamiento exclusivo con clorsulón, solamente se ha identificado su resistencia en un rebaño de ovejas infectadas con *Fasciola hepatica* en España (Martínez-Valladares *et al.*, 2014).

Con respecto a su modo de acción, el clorsulón inhibe las enzimas implicadas en la vía glucolítica descrita como la principal fuente de energía de los trematodos. En concreto, es un inhibidor competitivo y selectivo de la 3-fosfoglicerato quinasa y de la fosfogliceromutasa de los parásitos, reduciendo los niveles de ATP (*European Medicines Agency*, 2008; Timson, 2016; Xin *et al.*, 2019). Asimismo, el clorsulón entra al parásito a través de dos rutas, por un lado, se une a la anhidrasa carbónica de los eritrocitos entrando por vía oral a través de ellos y, por otro lado, a través de la superficie tegumental del parásito. En ambos casos, se ha observado que el clorsulón induce cambios morfológicos en el intestino y en la superficie tegumentaria de *Fasciola hepatica* en ratas (Meaney *et al.*, 2003, 2004, 2005).

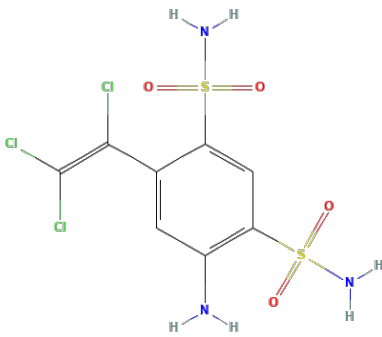
En relación con su posología y farmacocinética, el clorsulón es comercializado en suspensión para su administración oral (oveja y vacas) o en inyectable para su administración s.c. (vacas), siendo las dosis recomendadas 7 y 2 mg/kg, respectivamente (*European Medicines*

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Agency, 2008; Imperiale y Lanusse, 2021). El clorsulón es rápidamente absorbido y se elimina tanto por vía renal como en heces sin ser metabolizado (European Medicines Agency, 2008; Richter *et al.*, 2013). La farmacocinética de clorsulón ha sido descrita en ovejas y cabras tras su administración oral (Sundlof y Whitlock, 1992), así como en ganado bovino tras su administración s.c. (European Medicines Agency, 2008).

Con respecto a sus residuos en productos de origen animal, el fármaco inalterado es utilizado como residuo marcador para establecer los LMRs (Tabla 5). En concreto, se ha establecido un LMR en leche de ganado bovino de 16 µg/Kg y un tiempo de espera en combinación con la ivermectina de 66 días (Escribano *et al.*, 2012; European Medicines Agency, 2014b).

Tabla 5. Límites máximos de residuos (LMRs) y estructura química del antihelmíntico clorsulón (European Medicines Agency, 2014b).

Estructura química	Residuo marcador	Especie	LMR	Tejido diana
	Clorsulón	Bovino	35 µg/Kg 100 µg/Kg 200 µg/Kg 16 µg/Kg	Músculo Hígado Riñón Leche

En ganado bovino, se detectaron residuos de clorsulón en la leche tras la administración s.c. de clorsulón junto con ivermectina, donde la C_{max} del clorsulón (0,853 µg/ml) se alcanzó a las 7

horas tras la administración y su $T_{1/2}$ fue de 31 horas (*European Medicines Agency*, 2014a; Imperiale y Lanusse, 2021). En último lugar y en relación con la estabilidad de los residuos de fármacos antihelmínticos en los alimentos, se ha observado que el clorsulón es estable tras ciertos procesos de cocción (*Cooper et al.*, 2011).

3.3.3. Closantel

El closantel es un fármaco antihelmíntico derivado de la salicilanilida (**Figura 17**), utilizado en ganado bovino y ovino contra estadios inmaduros y adultos de trematodos (*Fasciola hepatica*), así como de algunos nematodos y ectoparásitos. El closantel se puede utilizar como tratamiento solo o en combinación con otros antihelmínticos como la ivermectina para ampliar su espectro de actividad (*Cromie et al.*, 2006; *European Medicines Agency*, 2012; *Power et al.*, 2013b).

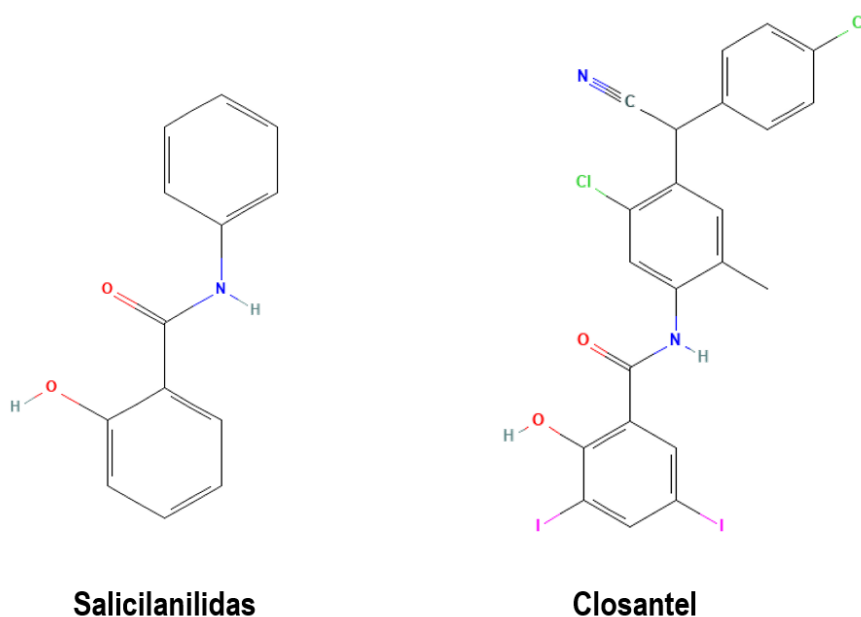


Figura 17. Estructura química de las salicilanilidas y del antiparasitario closantel.

Además, la eficacia de tratamiento con closantel ha sido demostrada en rebaños de ovejas y en ganado bovino infectados con *Fasciola hepatica* y resistentes al antiparasitario triclabendazol

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

(Coles *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2012; Hanna *et al.*, 2015). Por lo tanto, se ha convertido en un fármaco de segunda línea contra trematodos resistentes. Además, el closantel es utilizado de manera *extra-label* en otras especies como en cabras o en caballos (Iezzi *et al.*, 2014; Gokbulut y McKellar, 2018). Hasta el momento, solo se ha reportado el fracaso del tratamiento con closantel contra *Haemonchus contortus* en ovejas (Rolfe *et al.*, 1990) y contra *Fasciola hepatica* en bovinos (Novobilský y Höglund, 2015). Finalmente, en los últimos años se ha investigado la posible acción antitumoral del closantel ya que presenta actividad antiangiogénica en modelo de peces cebra, reduciendo el crecimiento de distintos tipos de cáncer (Zhu *et al.*, 2016). Asimismo, el closantel es descrito como inhibidor de la enzima Taspase1 en humanos cuya sobreexpresión está relacionada con la progresión del cáncer y la metástasis (Luciano *et al.*, 2021).

En relación con su mecanismo de acción, el closantel interfiere en la ruta de obtención de energía del parásito actuando como desacoplador de la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, reduciendo la síntesis de ATP. Además, el closantel actúa sobre los mecanismos responsables del mantenimiento de la homeostasis del pH e induce parálisis espástica en los parásitos (Ceballos *et al.*, 2017).

El closantel se administra por vía s.c. en un rango de dosis de 2,5 a 5 mg/kg, así como por vía oral a una dosis de 10 mg/kg. Además, en ganado bovino puede ser administrado por vía tópica a una dosis de 20 mg/kg (European Medicines Agency, 2012). La farmacocinética del closantel se caracteriza por una prolongada persistencia tanto en plasma como en leche. Al igual que otras salicilanilidas, el closantel se une ampliamente a las proteínas plasmáticas (> 99%) lo que alarga sus niveles en plasma y limita la distribución tisular. En concreto, se han observado ratios plasma/tejido del closantel de aproximadamente 6:1 para pulmón y riñón y de 9:1 para corazón e

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

hígado (Cromie *et al.*, 2006). La unión a proteínas plasmáticas también juega un papel importante en la acumulación del fármaco en el parásito ya que la principal ruta de entrada del closantel es la vía oral a través de la ingesta de sangre, de hecho, se ha observado que el patrón de acumulación del closantel en *Fasciola hepatica* coincide con su disponibilidad plasmática (Ceballos *et al.*, 2017; Lifschitz *et al.*, 2017). De modo que la persistencia de closantel en plasma durante periodos prolongados asegura la exposición de los parásitos hematófagos al fármaco. Finalmente, el closantel presenta bajo metabolismo en hígado por lo que se excreta como compuesto parental principalmente en heces aunque también se puede detectar en orina (Imperiale y Lanusse, 2021).

La farmacocinética plasmática del closantel ha sido estudiada en ganado ovino, bovino y caprino (Michiels *et al.*, 1987; Hennessy *et al.*, 1993; Swan *et al.*, 1999; Iezzi *et al.*, 2014; Ceballos *et al.*, 2017; Saleh *et al.*, 2022), donde se ha observado que la $T_{1/2}$ del closantel es de entre 14-21 días en ovejas y vacas y aproximadamente 9 días en cabras, corroborando así su larga persistencia en plasma. De igual modo, diversos estudios en ganado bovino y caprino han estudiado los niveles en leche del closantel, mostrando un valor de $T_{1/2}$ entre 10 y 17 días en vacas y alrededor de 10 días en las cabras (European Medicines Agency, 2012; Power *et al.*, 2013b; Iezzi *et al.*, 2014). Dicha persistencia prolongada de residuos en la leche también se ha observado para otros antiparasitarios del mismo grupo como la rafoxanida (Power *et al.*, 2013a) o de otros grupos como el nitroxinil (Whelan *et al.*, 2011). En último lugar, cabe destacar que las concentraciones de closantel alcanzadas en plasma son casi 50 veces superiores que las alcanzadas en leche (European Medicines Agency, 2012; Iezzi *et al.*, 2014). Este efecto podría estar relacionado tanto con su alta unión a proteínas como con las propiedades fisicoquímicas del compuesto, influyendo

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

en el proceso de distribución desde la sangre hasta la glándula mamaria (Imperiale y Lanusse, 2021).

En la actualidad, no todos los antihelmínticos derivados de la salicilanilida están registrados para su uso en animales de producción lechera. En el caso del closantel, el compuesto parental se utiliza como residuo marcador en ganado bovino y ovino para establecer los LMR. En concreto, se ha establecido un LMR de 45 µg/kg en leche en especies bovinas y ovinas (*European Medicines Agency*, 2014c; Daeseleire *et al.*, 2017; Imperiale y Lanusse, 2021) (**Tabla 6**) y los periodos de retiro en leche entre 39-43 en cabras y aproximadamente de 52 días en ganado bovino (Power *et al.*, 2013b; Iezzi *et al.*, 2014).

Tabla 6. Límites máximos de residuos (LMRs) en ganado bovino y ovino del antihelmíntico closantel (*European Medicines Agency*, 2014c).

Residuo marcador	Especie	LMRs	Tejido diana
Closantel	Ganado bovino	1000 µg/Kg	Músculo
		3000 µg/Kg	Grasa
		1000 µg/Kg	Hígado
		3000 µg/Kg	Riñón
		45 µg/Kg	Leche
	Ganado ovino	1500 µg/Kg	Músculo
		2000 µg/Kg	Grasa
		1500 µg/Kg	Hígado
		5000 µg/Kg	Riñón
		45 µg/Kg	Leche

Finalmente y con respecto a la toxicidad del closantel, varios estudios mostraron los efectos adversos del closantel en el sistema nervioso central, el nervio óptico y la retina en ovejas y

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

cabras después de una sobredosis accidental (van der Lugt y Venter, 2007; Oliveira et al., 2022). Asimismo, estos efectos adversos se han observado en humanos tras una exposición accidental al closantel donde la agudeza visual se vio afectada como consecuencia de una alteración en las capas externas de la retina (Tabatabaei et al., 2016; Khalili y Zareei, 2021; Leary et al., 2023).

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Estos antecedentes han puesto de manifiesto la importancia del transportador de membrana ABCG2 en la aparición de residuos de fármacos en leche y, por consiguiente, en su influencia en la calidad y seguridad de la leche. Por ello, la presente memoria tiene como objetivo general estudiar la interacción entre el transportador de membrana ABCG2 y dos grupos de fármacos ampliamente utilizados como son los AINEs ácido tolfenámico y meloxicam, y los antiparasitarios tales como los metabolitos del ABZ, el clorsulón y el closantel. Este objetivo general se desarrollará en los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la interacción *in vitro* del ácido tolfenámico con el transportador ABCG2 utilizando células que sobreexpresan el transportador; así como su implicación en su disponibilidad plasmática, secreción a leche y distribución tisular utilizando ratones *wild-type* y *Abcg2^{-/-}*.
- Determinar tanto *in vitro* como *in vivo* si el AINE meloxicam es sustrato de ABCG2 utilizando células que sobreexpresan distintas variantes de transportador y ratones *wild-type* y *knockout* para *Abcg2*.
- Estudiar el efecto de un inhibidor de ABCG2, como la lactona macrocíclica ivermectina, sobre el transporte *in vitro*, los niveles plasmáticos y la secreción a leche del AINE meloxicam en ovejas.
- Caracterizar la interacción *in vitro* de los principales metabolitos del ABZ, $ABZSO_2$ y $ABZSO_2-NH_2$ con ABCG2 utilizando células que sobreexpresan el transportador, así como estudiar el efecto *in vivo* de *Abcg2* en su secreción activa a leche utilizando ratones *Abcg2^{-/-}*.

4. OBJETIVOS

- Determinar el efecto de la coadministración de ABZ con lactonas macrocíclicas como ivermectina, doramectina y abamectina sobre los niveles plasmáticos y la secreción a leche de los principales metabolitos del ABZ en ganado ovino.
- Caracterizar la interacción *in vitro* del antiparasitario clorsulón con el transportador de membrana ABCG2, así como determinar la implicación de este transportador en su secreción a leche y evaluar el efecto de las lactonas macrocíclicas como inhibidores del transportador sobre estos procesos tanto en ovejas como en ratones.
- Examinar la implicación de ABCG2 en la disponibilidad plasmática y la secreción a leche del antiparasitario closantel utilizando ratones *wild-type* y *Abcg2^{-/-}* y estudiar las posibles interacciones farmacológicas en estos procesos de las lactonas macrocíclicas en ganado ovino.

5. RESULTADOS

5.1. PARTE I: ANTIINFLAMATORIOS

Artículo I

Role of the ABCG2 transporter in plasma levels and tissue accumulation of the anti-inflammatory tolfenamic acid in mice.

Blanco-Paniagua E, García-Lino AM, García-Mateos D, Álvarez AI, and Merino G.

Chemico-Biological Interactions (2021) 345:109537 doi: 10.1016/j.cbi.2021.109537

❖ Role of the ABCG2 transporter in plasma levels and tissue accumulation of the anti-inflammatory tolfenamic acid in mice.

Esther Blanco-Paniagua^a, Alba M. García-Lino^a, Dafne García-Mateos^a, Ana I. Álvarez^a and Gracia Merino^{a*}.

DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109537

^a Department of Biomedical Sciences-Physiology, Veterinary Faculty, Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL), Universidad de León, 24071, Campus de Vegazana, León, Spain

*Corresponding author: Dr. Gracia Merino. Department of Biomedical Sciences-Physiology, Veterinary Faculty, University of Leon 24071, Campus de Vegazana, Leon, Spain. Phone: +34-987291263; Fax +34-987291267; E-mail: gmerp@unileon.es

ABSTRACT

The Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) is an ATP-binding cassette efflux transporter that is expressed in the apical membrane of cells from relevant tissues involved in drug pharmacokinetics such as liver, intestine, kidney, testis, brain and mammary gland, among others. Tolfenamic acid is an anti-inflammatory drug used as an analgesic and antipyretic in humans and animals. Recently, tolfenamic acid has been repurposed as an antitumoral drug and for use in chronic human diseases such as Alzheimer. The aim of this work was to study whether tolfenamic acid is an *in vitro* Abcg2 substrate, and to investigate the potential role of Abcg2 in plasma exposure, secretion into milk and tissue accumulation of this drug. Using *in vitro* transepithelial assays with cells transduced with Abcg2, we showed that tolfenamic acid is an *in vitro* substrate of Abcg2. The *in vivo* effect of this transporter was tested using wild-type and Abcg2^{-/-} mice, showing that after oral and intravenous administration of tolfenamic acid, its area under the plasma concentration-time curve in Abcg2^{-/-} mice was between 1.7 and 1.8-fold higher compared to wild-type mice. Abcg2^{-/-} mice also showed higher liver and testis accumulation of tolfenamic acid after intravenous administration. In this study, we demonstrate that tolfenamic acid is transported *in vitro* by Abcg2 and that its plasma levels as well as its tissue distribution are affected by Abcg2, with potential pharmacological and toxicological consequences.

Artículo II

Abcg2 transporter affects plasma, milk and tissue levels of meloxicam.

García-Lino AM, Blanco-Paniagua E, Astorga-Simón EN, Álvarez-Fernández L, García-Mateos D, Álvarez-Fernández I, Álvarez AI, and Merino G. *Biochemical Pharmacology* (2020) 175:113924 doi: 10.1016/j.bcp.2020.113924

❖ **Abcg2 transporter affects plasma, milk and tissue levels of meloxicam.**

Alba M. García-Lino ^a, Esther Blanco-Paniagua ^a, Elsa N. Astorga-Simón ^a, Laura Álvarez-Fernández ^a, Dafne García-Mateos ^a, Indira Álvarez-Fernández ^a, Ana I. Álvarez ^a, Gracia Merino ^{a*}

DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113924

^a Department of Biomedical Sciences-Physiology, Veterinary Faculty, Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL), Universidad de León, Campus de Vegazana, León, Spain

Corresponding author: Dr. Gracia Merino. Department of Biomedical Sciences-Physiology, Veterinary Faculty, University of Leon 24071, Campus de Vegazana, Leon, Spain. Phone: +34-987291263; Fax +34-987291267; E-mail: gmerp@unileon.es

ABSTRACT

ATP-binding cassette (ABCG2) is an efflux transporter that extrudes xenotoxins from cells in liver, intestine, mammary gland, brain and other organs, affecting the pharmacokinetics, brain accumulation and secretion into milk of several compounds, including antitumoral, antimicrobial and anti-inflammatory drugs. The aim of this study was to investigate whether the widely used anti-inflammatory drug meloxicam is an Abcg2 substrate, and how this transporter affects its systemic distribution. Using polarized ABCG2-transduced cell lines, we found that meloxicam is efficiently transported by murine Abcg2 and human ABCG2. After oral administration of meloxicam, the area under the plasma concentration–time curve in Abcg2^{-/-} mice was 2-fold higher than in wild-type mice (146.06 ± 10.57 µg·h/ml versus 73.80 ± 10.00 µg·h/ml). Differences in meloxicam distribution were reported for several tissues after oral and intravenous administration, with a 20-fold higher concentration in the brain of Abcg2^{-/-} after oral administration. Meloxicam secretion into milk was also affected by the transporter, with a 2-fold higher milk-to-plasma ratio in wild-type compared with Abcg2^{-/-} lactating female mice after oral and intravenous administration. We conclude that Abcg2 is an important determinant of the plasma and brain distribution of meloxicam and is clearly involved in its secretion into milk.

Artículo III

Ivermectin inhibits ovine ABCG2-mediated in vitro transport of meloxicam and reduces its secretion into milk in sheep.

Blanco-Paniagua E, García-Lino AM, Álvarez-Fernández L, Álvarez AI, and Merino G.

Research in Veterinary Science (2022) 153:88-91 doi: 10.1016/j.rvsc.2022.10.019

❖ Ivermectin inhibits ovine ABCG2-mediated *in vitro* transport of meloxicam and reduces its secretion into milk in sheep.

Esther Blanco-Paniagua ^{a, b, 1}, Alba M. García-Lino ^{a, b, 1}, Laura Álvarez-Fernández ^{a, b}, Ana I. Álvarez ^{a, b}, Gracia Merino ^{a, b, *}

DOI: 10.1016/j.rvsc.2022.10.019

^a Departamento de Ciencias Biomédicas-Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

^b Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL), Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071 León Spain.

¹ Both authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Dr. Gracia Merino Phone: +34-987291263; E-mail: gmerp@unileon.es

ABSTRACT

The ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) is an efflux protein involved in the bioavailability and secretion into milk of several compounds including anti-inflammatory drugs. The aim of this work was to determine the effect in sheep of an ABCG2 inhibitor, such as the macrocyclic lactone ivermectin, on the secretion into milk of meloxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug widely used in veterinary medicine, and recently reported as an ABCG2 substrate. *In vitro* meloxicam transport assays in ovine ABCG2-transduced cells have shown that ivermectin is an efficient inhibitor of *in vitro* transport of meloxicam mediated by ovine ABCG2, with a 75% inhibition in the transport ratio (24.85 ± 4.62 in controls vs 6.31 ± 1.37 in presence of ivermectin). In addition, the role of ovine ABCG2 in secretion into milk of meloxicam was corroborated using Assaf lactating sheep coadministered with ivermectin. Animals were administered subcutaneously with meloxicam (0.5 mg/kg) with or without ivermectin (0.2 mg/kg). No difference in plasma pharmacokinetic parameters was found between treatments. In the case of milk, a significant reduction in the area under concentration-time curve (AUC) (3.92 ± 0.66 vs 2.26 ± 1.52 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) and the AUC milk-to-plasma ratio (0.17 ± 0.03 vs 0.09 ± 0.06) was reported for ivermectin-treated animals compared to controls.

5.2. PARTE II: ANTIPARASITARIOS

5.2.1. ALBENDAZOL

Artículo IV

Secretion into milk of the main metabolites of the anthelmintic albendazole is mediated by the ABCG2/BCRP transporter.

Blanco-Paniagua E, Álvarez-Fernández L, García-Lino AM, Álvarez AI, and Merino G.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2022) 66: e00062-22 doi: 10.1128/aac.00062-22

❖ **Secretion into milk of the main metabolites of the anthelmintic albendazole is mediated by the ABCG2/BCRP transporter.**

Esther Blanco-Paniagua ^{a, b}, Laura Álvarez-Fernández ^{a, b}, Alba M. García-Lino ^{a, b}, Ana I. Álvarez ^{a, b}, Gracia Merino ^{a, b, #}

DOI: 10.1128/aac.00062-22

^a Departamento de Ciencias Biomédicas-Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

^b Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL), Universidad de León

Address correspondence to Dr. Gracia Merino. Phone: +34-987291263; Fax +34-987291267; E-mail: gmerp@unileon.es

ABSTRACT

Albendazole (ABZ) is an anthelmintic with a broad-spectrum activity, widely used in human and veterinary medicine. ABZ is metabolized in all mammalian species to albendazole sulfoxide (ABZSO), albendazole sulfone (ABZSO₂) and albendazole 2-aminosulphone (ABZSO₂-NH₂). ABZSO and ABZSO₂ are the main metabolites detected in plasma and all three are detected in milk. The ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) is an efflux transporter that is involved in the active secretion of several compounds into milk. Previous studies have reported that ABZSO was *in vitro* transported by ABCG2. The aim of this work is to correlate the *in vitro* interaction between ABCG2 and the other ABZ metabolites with their secretion into milk by this transporter. Using *in vitro* transepithelial assays with cells transduced with murine *Abcg2* and human ABCG2, we show that ABZSO₂ and ABZSO₂-NH₂ are *in vitro* substrates of both. *In vivo* assays carried out with wild-type and *Abcg2*^{-/-} lactating female mice demonstrated that secretion into milk of these ABZ metabolite was mediated by *Abcg2*. Milk concentrations and milk-to-plasma ratio were higher in wild-type compared to *Abcg2*^{-/-} mice for all the metabolites tested. We conclude that ABZ metabolites are undoubtedly *in vitro* substrates of ABCG2 and actively secreted into milk by ABCG2.

Artículo V

Effect of coadministration of macrocyclic lactones on the milk residues of the metabolites of the anthelmintic albendazole in sheep.

Manuscript in preparation

❖ **Effect of coadministration of macrocyclic lactones on the milk residues of the metabolites of the anthelmintic albendazole in sheep.**

Manuscript in preparation

ABSTRACT

Albendazole (ABZ) is an anthelmintic drug commonly used in the veterinary field which is metabolized to albendazole sulphoxide (ABZSO) and albendazole sulphone (ABZSO₂), the main marker residues in milk. Macrocyclic lactones are also important antiparasitic drugs reported to interact with other drugs, including anthelmintics. The purpose of this study was to determine the effect of the coadministration of macrocyclic lactones on the secretion into milk of the main metabolites of ABZ, ABZSO and ABZSO₂, in sheep. Assaf lactating sheep were administered orally albendazole at 7.5 mg/kg with or without a subcutaneous administration of ivermectin, doramectin or abamectin at 0.2 mg/kg. Higher concentrations of ABZSO in milk were detected after ivermectin, doramectin and abamectin were coadministered. However, no relevant differences were observed in ABZSO₂ concentrations in milk after coadministration of macrocyclic lactones. These results revealed that the coadministration of macrocyclic lactones affects milk levels of the main metabolite of ABZ and consequently its milk residues.

5.2.2. CLORSULÓN

Artículo VI

Role of the Abcg2 transporter in the secretion into milk of the anthelmintic clorsulon: interaction with ivermectin.

Blanco-Paniagua E, Álvarez-Fernández L, Rodríguez- Alonso A, Millán-García A, Álvarez AI, and Merino G. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2023) 67(5): e00095-23 doi: 10.1128/aac.00095-23

❖ **Role of the Abcg2 transporter in secretion into milk of the anthelmintic clorsulon: interaction with ivermectin.**

Esther Blanco-Paniagua ^{a,b}, Laura Álvarez-Fernández ^{a,b}, Andrea Rodríguez-Alonso ^b, Alicia Millán-García ^{a,b}, Ana I. Álvarez ^{a,b}, Gracia Merino ^{a,b,*}

DOI: 10.1128/aac.00095-23

^a Departamento de Ciencias Biomédicas-Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

^b Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL), Universidad de León.

Address correspondence to Dr. Gracia Merino. Phone: +34-987291263; Fax +34-987291267; E-mail: gmerp@unileon.es

ABSTRACT

Clorsulon is a benzenesulfonamide drug that is effective in treating helminthic zoonoses such as fascioliasis. When used in combination with the macrocyclic lactone ivermectin, it provides high broad-spectrum antiparasitic efficacy. The safety and efficacy of clorsulon should be studied by considering several factors such as drug-drug interactions mediated by ATP-binding cassette (ABC) transporters due to their potential effects on the pharmacokinetics and drug secretion into milk. The aim of this work was to determine the role of ABC transporter G2 (ABCG2) in clorsulon secretion into milk and the effect of ivermectin, a known ABCG2 inhibitor, on this process. Using *in vitro* transepithelial assays with cells transduced with murine Abcg2 and human ABCG2, we report that clorsulon was transported *in vitro* by both transporter variants and that ivermectin inhibited its transport mediated by murine Abcg2 and human ABCG2. Wild-type and Abcg2^{-/-} lactating female mice were used to carry out *in vivo* assays. The milk concentration and the milk-to-plasma ratio were higher in wild-type mice than in Abcg2^{-/-} mice after clorsulon administration, showing that clorsulon is actively secreted into milk by Abcg2. The interaction of ivermectin in this process was shown after the coadministration of clorsulon and ivermectin to wild-type and Abcg2^{-/-} lactating female mice. Treatment with ivermectin had no effect on the plasma concentrations of clorsulon, but the milk concentrations and milk-to-plasma ratios of clorsulon decreased in comparison to those with treatment without ivermectin, only in wild-type animals. Consequently, the coadministration of clorsulon and ivermectin reduces clorsulon secretion into milk due to drug-drug interactions mediated by ABCG2.

Artículo VII

Coadministration of ivermectin and abamectin affects milk pharmacokinetics of the antiparasitic clorsulon in Assaf sheep.

Manuscript in preparation

❖ **Coadministration of ivermectin and abamectin affects milk pharmacokinetics of the antiparasitic clorsulon in Assaf sheep.**

Manuscript in preparation

ABSTRACT

In veterinary field, drug exposure during milk production in dairy cattle is considered a major health problem which concerns dairy consumers. The ABC transporter G2 (ABCG2) is one of the major factors involved in the active secretion of many compounds into milk due to its induced expression in the mammary gland during lactation. The main objective of this study was to determine the involvement of ABCG2 on the secretion into milk of the antiparasitic clorsulon in sheep as well as the possible effect of the macrocyclic lactones ivermectin and abamectin on this process. Cells transduced with ovine variant of ABCG2 were used to carry out *in vitro* transepithelial transport assays in which we showed that clorsulon is a substrate of the ovine transporter. In addition, ivermectin and abamectin inhibit clorsulon transport mediated by ovine ABCG2. *In vivo* interactions were studied in Assaf sheep after coadministration of clorsulon (in DMSO, 2 mg/kg, s.c.) with ivermectin (Ivomec®, 0.2 mg/kg, s.c) or abamectin (in DMSO, 0.2 mg/kg, s.c.). After ivermectin and abamectin treatment, no relevant differences in plasma bioavailability of clorsulon were reported between experimental groups since there were no differences in the area under the plasma concentration-curve (AUC) between clorsulon alone treatment and coadministration with macrocyclic lactones. Related to milk, the AUC for clorsulon was decreased after coadministration with ivermectin ($15.15 \pm 3.17 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) and abamectin ($15.30 \pm 3.25 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) compared to control group ($20.73 \pm 4.97 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). Moreover, milk parameters such as half-life ($T_{1/2}$) and mean residence time (MRT) were lower after coadministration of macrocyclic lactones. Subsequently, this study showed that coadministration of clorsulon with ivermectin and abamectin affects the transfer into milk of clorsulon.

5.2.3. CLOSANTEL

Artículo VIII

Role of ABCG2 efflux transporter in the pharmacokinetics and secretion into milk of the anthelmintic closantel: in vivo studies in mice and sheep.

Manuscript in preparation

❖ **Role of ABCG2 efflux transporter in the pharmacokinetics and secretion into milk of the anthelmintic closantel: in vivo studies in mice and sheep.**

Manuscript in preparation

ABSTRACT

Closantel is a broad-spectrum salicylanilide class of anthelmintic agent mainly used for the control of fascioliasis in sheep and cattle, characterized by its long plasma and milk persistence. The ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) is an efflux transporter localized in the apical membrane of epithelia in relevant tissues such as liver or mammary gland. Accordingly, it is involved in drug availability and active secretion of several compounds into milk. Modulation studies using ABCG2 inhibitors were reported to affect plasma pharmacokinetics and secretion into milk of ABCG2 substrates. Given the ABCG2 relevance in drug disposition and appearance of milk residues, the objective of this work was to determine whether ABCG2 is involved in closantel plasma availability as well as in its secretion into milk. Furthermore, potential drug-drug interactions in these processes were studied through the coadministration of ABCG2 inhibitors such as ivermectin and eprinomectin. Assays with *Abcg2*^{-/-} male mice showed that plasma concentrations of closantel were higher in *Abcg2*^{-/-} mice, with an area under curve (AUC) 1.6-fold higher compared to wild-type mice. Moreover, milk concentrations and milk-to-plasma ratio of closantel were significantly higher in female wild-type compared with *Abcg2*^{-/-} mice. The potential *in vivo* interaction of closantel with macrocyclic lactones as ABCG2 inhibitors, were studied in sheep after coadministration of closantel (10 mg/kg o.) with ivermectin (0.2 mg/kg s.c) or eprinomectin (1 mg/kg s.c). Both coadministrations in sheep had no significant effect on plasma and milk concentrations of closantel and either in its pharmacokinetics parameters. These outcomes reveal that *Abcg2* plays an important role in closantel plasma disposition, as well as, in its active secretion into milk in mice. However, no effect in plasma and milk levels of closantel was observed after coadministration of ABCG2 inhibitors in sheep.

6. DISCUSIÓN

6.1. ANTIINFLAMATORIOS

Hemos centrado una parte de esta Tesis Doctoral en investigar el papel del transportador de membrana ABCG2 en el transporte de AINEs utilizados en medicina veterinaria y humana como son el ácido tolfenámico y el meloxicam. Dicha interacción ha sido considerada como relevante debido al potencial riesgo de exposición de los lactantes y consumidores a los residuos farmacológicos en leche como consecuencia de la posible interacción con ABCG2. Estos estudios han permitido conocer la interacción de dichos fármacos con el transportador ABCG2 mediante ensayos *in vitro* de transporte transepitelial, así como la implicación *in vivo* de ABCG2 en la secreción a leche, la biodisponibilidad plasmática y la distribución tisular de estos fármacos utilizando modelos animales de ratones *knockout* para *Abcg2*. En el caso del meloxicam, hemos evaluado también el efecto de la lactona macrocíclica ivermectina, descrita como inhibidor del transportador, sobre estos procesos en ovejas.

Comenzando por los ensayos *in vitro* con estos dos antiinflamatorios, ácido tolfenámico y meloxicam, en el **artículo I** se ha caracterizado la interacción *in vitro* entre el ácido tolfenámico y el transportador ABCG2 mediante experimentos de transporte transepitelial (Artículo I, Figura 1). Los resultados mostraron un transporte preferencial basal-apical en las células que sobreexpresaban la variante murina del transportador comparado con las células parentales. En el **artículo II**, se mostraron resultados similares para el meloxicam en las células que sobreexpresan tanto el transportador murino *Abcg2* como el humano ABCG2 (Artículo II, Figura 1); sin embargo, el ácido tolfenámico no se transporta mediante *Abcg2* de manera tan eficiente como el meloxicam. El ratio de transporte obtenido para el ácido tolfenámico (2.38 ± 0.30) es similar al estimado para el AINE diclofenaco a partir de estudios previos (Lagas *et al.*, 2009), pero inferior al del flunixin (García-

6. DISCUSIÓN

Mateos *et al.*, 2019), que sí es similar al obtenido en nuestro estudio para el meloxicam (32.46 ± 9.02). Tanto el ácido tolfenámico como el meloxicam fueron descritos como sustratos de ABCG2. Estas diferencias en el transporte *in vitro* mediado por ABCG2 podrían deberse a diferencias en algunas propiedades fisicoquímicas importantes para la interacción con el transportador (El-Kattan y Varm, 2012; Egido *et al.*, 2015). Así pues, los sustratos de ABCG2 suelen tener un peso molecular de alrededor de 400 g/mol. El ácido tolfenámico tiene el peso molecular más bajo, 261,7 g/mol, en comparación con el meloxicam (351,4 g/mol) o el flunixin (296,2 g/mol). Además, la unión con el transportador ABCG2 aumenta con el número de HBA presentes en los compuestos (Xu *et al.*, 2015). En este caso, el ácido tolfenámico presenta 3 HBA mientras que el meloxicam tiene 7 (PubChem).

A la vista de estos resultados, la interacción entre el transportador y dichos AINEs se estudió usando los modelos *in vivo* con animales *knockout* para *Abcg2*, los cuales permiten conocer su posible implicación en la farmacocinética y la secreción a leche de los compuestos (Vlaming *et al.*, 2009). En el **artículo I**, nuestros estudios en ratones macho mostraron que los niveles plasmáticos de ácido tolfenámico tras su administración oral (Artículo I, Figura 2) e intravenosa (Artículo I, Figura 3) son significativamente superiores en los ratones *Abcg2*^{-/-} en comparación con los ratones *wild-type*, reflejando una mayor exposición al fármaco en los ratones *Abcg2*^{-/-}. En el caso del meloxicam (**artículo II**), solo tras la administración oral del fármaco, los ratones *wild-type* presentaron concentraciones plasmáticas inferiores a los ratones *Abcg2*^{-/-} (Artículo II, Figura 2B). Estos resultados indicaron que *Abcg2* estaría implicado en la biodisponibilidad oral del ácido tolfenámico y el meloxicam reduciendo su absorción y aumentando su excreción intestinal.

6. DISCUSIÓN

Asimismo, los niveles de los dos AINEs fueron estudiados en diversos órganos con relevancia farmacocinética como el hígado, intestino y riñón, así como otros órganos como los testículos y el cerebro, donde la expresión de ABCG2 presenta un papel fundamental en su protección. Los resultados mostraron altos niveles de ácido tolfenámico en el hígado de los ratones *Abcg2^{-/-}* en relación con los ratones *wild-type* (Artículo I, Tabla 1). Sin embargo, no se observaron diferencias en el intestino y riñón entre ambos grupos de ratones, lo que podría indicar que el efecto observado en plasma es debido a la presencia de *Abcg2* en hígado. En el caso del meloxicam, aunque sí se observó una acumulación superior de meloxicam en el hígado en los ratones *Abcg2^{-/-}* tras su administración oral (Artículo II, Tabla 2), estas diferencias pueden atribuirse a los elevados niveles plasmáticos obtenidos tras dicha administración en dichos ratones (Artículo II, Figura 2B). De hecho, la eliminación hepática pareció no verse afectada por el transportador ya que no se observaron diferencias entre los ratones *wild-type* y *Abcg2^{-/-}* después de la administración intravenosa del meloxicam (Artículo II, Tabla 1). Independientemente de si las diferencias observadas fueron causadas por efectos locales o sistémicos de *Abcg2*, una acumulación de meloxicam en el hígado puede ser relevante en la evaluación de la hepatotoxicidad del meloxicam.

Las diferencias en los niveles tisulares son relevantes ya que pueden causar problemas de toxicidad. En el caso del ácido tolfenámico, diversos estudios han descrito la citotoxicidad hepática (Li *et al.*, 2009; Tatematsu *et al.*, 2016). Aunque el mecanismo implicado en el daño hepático de los AINEs no está suficientemente concretado, la acumulación de los fármacos se ha propuesto como posible causa de dicho daño (Nadanaciva *et al.*, 2013). Además, las concentraciones de ácido tolfenámico y meloxicam también fueron elevadas en los testículos de los ratones *Abcg2^{-/-}* en

6. DISCUSIÓN

comparación con los *wild-type* (Artículo I, Tabla 1 y Artículo II, Tabla 1 y 2). De igual modo, diversos estudios describen un daño en la función testicular como consecuencia de la exposición *in vitro* a algunos analgésicos como el paracetamol, la aspirina, la indometacina o el ibuprofeno (Albert *et al.*, 2013; Mazaud-Guittot *et al.*, 2013; ben Maamar *et al.*, 2017).

Finalmente, los resultados obtenidos en el cerebro fueron de gran relevancia clínica ya que se observó la acumulación de meloxicam en los ratones *Abcg2^{-/-}* en comparación con los ratones *wild-type* tanto tras administración oral como intravenosa (Artículo II, Tabla 1 y 2). Estos resultados revelaron el importante papel de *Abcg2* en el paso del meloxicam a través de la barrera hematoencefálica y en su acumulación en el cerebro. En el caso del meloxicam, diversos estudios han descrito su papel protector en los procesos de neuroinflamación (Han y Ren, 2014; Haile *et al.*, 2016) y estrés oxidativo en la médula espinal y el cerebro (Karthi *et al.*, 2018; Er *et al.*, 2020). Por ello, el meloxicam podría ser un tratamiento prometedor para enfermedades degenerativas del cerebro asociadas a estrés oxidativo como son el Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Huntington (Manoharan *et al.*, 2016).

La biodisponibilidad de un fármaco está relacionada tanto con el éxito terapéutico como con los efectos tóxicos, de manera que cualquier factor que pueda alterar la exposición sistémica y/o local es objeto relevante de estudio y este es el caso del transportador de membrana ABCG2. Nuestros resultados mostraron el importante papel protector de ABCG2 en el hígado, en la barrera hematotesticular y en la barrera hematoencefálica evitando la acumulación de niveles elevados de AINEs en dichos órganos.

A diferencia de los resultados obtenidos en ratones macho, los ensayos de secreción a leche en hembras de ratón *Abcg2^{-/-}* mostraron que el transportador no está involucrado en el paso a

6. DISCUSIÓN

leche del ácido tolfenámico ya que no se observaron diferencias en las concentraciones en la leche de dicho compuesto entre ambos tipos de ratones, así como tampoco, en el ratio leche/plasma. No obstante, en el caso del meloxicam, nuestros estudios mostraron la participación de Abcg2 en su secreción a leche tras su administración intravenosa y oral, ya que tanto las concentraciones en leche como el ratio leche/plasma fueron significativamente superiores en los ratones *wild-type* en comparación con los ratones Abcg2^{-/-} (Artículo II, Figura 3).

Las diferencias en la transferencia de los fármacos a la leche mediante difusión están relacionadas entre otros factores con la lipofilicidad de los mismos. En este sentido, las moléculas con propiedades lipofílicas tienen una mayor tendencia a atravesar membranas, como el epitelio mamario, lo que favorece su paso a la leche (Ito *et al.*, 2015; Imperiale y Lanusse, 2021). Así pues, tanto el ácido tolfenámico como el meloxicam son ácidos débiles, de manera que, en el plasma predomina su forma ionizada y poco liposoluble, por lo que no atraviesa fácilmente las membranas celulares. Sin embargo, en nuestro caso, el paso a leche no depende solo de la difusión, sino también de la afinidad del fármaco por el transportador, sugiriendo que el efecto que observamos en la secreción de meloxicam a leche mediado por Abcg2, podría estar asociado con una mayor afinidad por el transportador, como se refleja en su ratio de transporte *in vitro* superior al del ácido tolfenámico.

Por ende, el transporte de meloxicam en la glándula mamaria mediado por ABCG2 puede tener implicaciones clínicas y toxicológicas. Cualquier mecanismo que pueda afectar la aparición de residuos de fármacos en la leche es de vital importancia en el ámbito veterinario. Entre esos mecanismos se encuentran incluidas las interacciones entre fármacos que conducen a la inhibición de ABCG2, lo que resulta en una reducción de la secreción de sus sustratos a la leche (Real *et al.*,

6. DISCUSIÓN

2011a; Barrera *et al.*, 2013). Por ello, en el **artículo III** se estudió el efecto de un conocido inhibidor de ABCG2 como la lactona macrocíclica ivermectina (Merino *et al.*, 2009) sobre la secreción de meloxicam a leche en ovejas de raza Assaf.

Los niveles de meloxicam en leche fueron inferiores tras la coadministración de meloxicam junto con ivermectina (Artículo III, Figura 1B). Asimismo, los valores del AUC para la leche y la relación AUC leche/plasma se redujeron significativamente en los animales a los que se les administró ivermectina de forma conjunta con meloxicam en comparación con el tratamiento solo de meloxicam (Artículo III, Tabla 2). Aunque se ha descrito que la ivermectina interactúa con otros transportadores ABC, como P-gp (Lespine *et al.*, 2007), el efecto de la ivermectina sobre la secreción de meloxicam en la leche de oveja se puede atribuir a la interacción mediada por ABCG2, ya que ningún otro transportador ABC tiene inducida su expresión en glándula mamaria en lactación (van Herwaarden y Schinkel, 2006). En vista de estos resultados, esta secreción de meloxicam a la leche podría ser modulada también por otros compuestos que interactúan como inhibidores del transportador ABCG2, como otros fármacos (Barrera *et al.*, 2013) o moléculas presentes en la dieta como los flavonoides (Pulido *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2018); afectando de igual modo a la cantidad de residuos en leche.

Los estudios llevados a cabo en los **artículos I, II y III** contribuyeron a la descripción del transportador de membrana ABCG2 como factor relevante que influye en la transferencia de AINEs como el meloxicam a la leche de rumiantes, afectando la calidad y la seguridad de la misma. Además, se ha demostrado la capacidad de regular la presencia de sus residuos en la leche a través de la coadministración de inhibidores del transportador ABCG2. Finalmente, la implicación del transportador en la biodisponibilidad plasmática y distribución tisular de AINEs como el ácido

tolfenámico y el meloxicam también ha sido comprobada, pudiendo influir en la efectividad y la toxicidad de los tratamientos, no solamente en medicina veterinaria, sino también en medicina humana.

6.2. ANTIPARASITARIOS

El estudio de las interacciones de los antiparasitarios con ABCG2 es clave ya que la farmacocinética y la secreción a leche de dichos fármacos podrían verse afectadas ante cualquier cambio en la actividad del transportador, repercutiendo en la efectividad del tratamiento y la presencia de residuos en los productos procedentes de animales tratados. En consecuencia, hemos centrado esta parte de esta Tesis Doctoral en investigar el papel del transportador de membrana ABCG2 en el transporte de los metabolitos del ABZ, el clorsulón y el closantel, ampliamente utilizados contra la fascioliasis en medicina veterinaria. Cabe señalar que en medicina humana el ABZ también es utilizado. Se han llevado a cabo ensayos *in vitro* de transporte transepitelial para conocer la interacción de los metabolitos principales del ABZ, así como del clorsulón con el transportador ABCG2. De igual modo, la implicación *in vivo* de Abcg2 en la secreción activa a leche y en los niveles plasmáticos se ha investigado utilizando modelos animales de ratones *knockout* para Abcg2. Finalmente, el efecto de las posibles interacciones farmacológicas tras la coadministración de antiparasitarios se ha evaluado mediante ensayos en ovejas de raza Assaf utilizando las lactonas macrocíclicas por su potente efecto inhibitor sobre ABCG2.

Comenzando por los ensayos *in vitro*, en los **artículos IV y VI** se ha caracterizado la interacción *in vitro* de los metabolitos del ABZ, ABZSO₂ y ABZSO₂-NH₂, y el clorsulón con las variantes murina y humana de ABCG2. Los resultados mostraron un transporte preferencial basal-

6. DISCUSIÓN

apical para los tres compuestos en las dos variantes (Artículo IV, Figura 1 y 2 y Artículo VI, Figura 1). Sin embargo, el transporte observado en la variante murina fue más eficiente que en la humana (Artículo IV, Tabla 1 y Artículo VI, Tabla 1). Esta diferencia entre el transportador murino y el humano se ha observado con anterioridad con otros sustratos (Merino *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2022; Álvarez-Fernández *et al.*, 2023), postulándose una diferencia en la afinidad/selectividad del transportador para los sustratos como posible razón (Mizuno *et al.*, 2004).

En vista de estos resultados y de la importancia de ABCG2 en la secreción activa de sus sustratos a la leche, la implicación de *Abcg2* en el paso de los metabolitos del ABZ y del clorsulón a leche fue evaluada mediante modelos animales de ratones lactantes *Abcg2*^{-/-}. Además, también se testó en este modelo el antiparasitario closantel, que por razones técnicas no pudo ser testado *in vitro*.

En los **artículos IV, VI y VIII**, nuestros resultados mostraron que tras la administración de los metabolitos del ABZ, ABZSO, ABZSO₂ y ABZSO₂-NH₂, el clorsulón y el closantel, respectivamente, los niveles en leche y los ratios leche/plasma de estos compuestos fueron más elevados en los ratones *wild-type* en comparación con los ratones *Abcg2*^{-/-} (Artículo IV, Figura 3; Artículo VI, Figura 2; Artículo VIII, Figura 2).

En relación con los niveles plasmáticos obtenidos para los metabolitos del ABZ y del clorsulón en los ensayos con ratones hembra, en el **artículo IV** y el **artículo VI**, no se observaron diferencias entre los ratones *wild-type* y *Abcg2*^{-/-}. A pesar de la evidente implicación del transportador en la secreción a leche, la ausencia de efecto a nivel plasmático entre ratones hembra *wild-type* y *Abcg2*^{-/-} ha sido observado previamente para otros sustratos de ABCG2 como el danofloxacino (Real *et al.*, 2011a), el ciprofloxacino (Merino *et al.*, 2006), el flunixin y su metabolito

6. DISCUSIÓN

(García-Mateos *et al.*, 2019), la moxidectina (Pérez *et al.*, 2009a) y el meloxicam (Artículo II, Figura 3). La potencial participación de otros transportadores que enmascaren el efecto de Abcg2 no puede ser excluida. Sin embargo, este efecto es poco probable ya que estudios previos realizados en células que sobreexpresan P-gp, uno de los transportadores ABC más relevantes a nivel de disposición plasmática, mostraron la ausencia de interacción del clorsulón y el ABZ con dicho transportador (Merino *et al.*, 2002; Dupuy *et al.*, 2010).

En el caso del closantel y sus niveles plasmáticos en ratones hembra lactantes, sí se mostraron diferencias entre ratones *wild-type* y *Abcg2^{-/-}* a las 24 y 96 h, siendo superiores en ratones *knockout* (Artículo VIII, Figura 2A). Cabe destacar que los niveles plasmáticos alcanzados en los ensayos con hembras fueron similares a los ensayos con ratones macho. Concretamente, tras la administración oral de closantel a 10 mg/kg en ratones macho, se observó que el closantel se elimina lentamente y persiste en plasma durante largo tiempo, detectándose hasta 10 semanas después de la administración. Además, las concentraciones plasmáticas de closantel fueron significativamente superiores en los ratones *Abcg2^{-/-}* en comparación con los ratones *wild-type*, a partir de las 72 horas hasta las 10 semanas, donde incluso, seguían siendo 6 veces superiores (Artículo VIII, Figura 1).

Nuestros resultados mostraron que *Abcg2* afecta a la farmacocinética del closantel limitando probablemente su absorción tras la administración oral y potenciando su eliminación. Estos efectos se observaron para otros fármacos como el topotecan (Jonker *et al.*, 2002), la nitrofurantoína (Merino *et al.*, 2005b), el ácido tolfenámico (Artículo I) y el meloxicam (Artículo II). El **artículo VIII** puso de manifiesto que *Abcg2* juega un papel relevante en la disposición del closantel. En consecuencia, cualquier factor que modifique la actividad del transportador podría provocar la

6. DISCUSIÓN

acumulación de closantel o prolongar o limitar su permanencia en plasma, pudiendo afectar a la efectividad del tratamiento o a la aparición de efectos adversos. De hecho, varios estudios han mostrado los efectos adversos del closantel en el sistema nervioso central, el nervio óptico y los tejidos de la retina en ovejas y cabras después de una sobredosis accidental (Gill *et al.*, 1999; van der Lugt y Venter, 2007).

Como se ha expuesto anteriormente, el uso de fármacos antihelmínticos en ganado de producción lechera representa un problema de salud pública como consecuencia de la posible aparición de residuos de dichos fármacos en la leche (Virkel *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos en los **artículos IV, VI y VIII** permitieron demostrar la participación de Abcg2 en la secreción activa de los metabolitos del ABZ, el clorsulón y el closantel a la leche en ratones. Por ello, la siguiente parte de la Tesis Doctoral se centró en el estudio de la implicación de ABCG2 en la presencia de residuos en leche en ganado ovino, así como las posibles interacciones farmacológicas causadas tras la coadministración de estos fármacos con lactonas macrocíclicas, antiparasitarios inhibidores de ABCG2.

En los **artículos V, VII y VIII** se evaluó el efecto de la coadministración de lactonas macrocíclicas sobre los residuos en leche de los metabolitos del ABZ, el clorsulón y el closantel en ovejas. En el caso de los metabolitos del ABZ y del closantel coadministrados con lactonas macrocíclicas, no se observaron diferencias relevantes en las concentraciones plasmáticas de los dos metabolitos detectados, ABZSO y ABZSO₂, ni del closantel entre los grupos experimentales (Artículo V, Figura 1; Artículo VIII, Figura 3); así como tampoco en sus parámetros farmacocinéticos (Artículo V, Tabla 1; Artículo VIII, Tabla 1). Nuestros resultados están en correlación con los obtenidos previamente en ganado bovino tras la coadministración de closantel

6. DISCUSIÓN

con ivermectina. En dicho estudio no se observaron diferencias en los niveles plasmáticos entre el tratamiento combinado con ivermectina y el tratamiento de closantel solo (Cromie *et al.*, 2006), lo que corrobora que la combinación con ivermectina no afecta la disponibilidad plasmática de closantel.

En el caso del clorsulón, los resultados mostraron que las concentraciones de este antiparasitario en plasma fueron inferiores a las 6 h y 8 h después de la coadministración con ivermectina y a las 4 h después del tratamiento con abamectina (Artículo VII, Figura 2A). De igual modo, se observaron diferencias en la concentración máxima (C_{max}) después de la coadministración con ivermectina, así como en la vida media de eliminación ($T_{1/2}$) y el tiempo medio de permanencia (MRT) después de la coadministración con abamectina, siendo valores inferiores en comparación con el tratamiento de clorsulón solo. A pesar de ello, no se observaron diferencias significativas entre los valores de AUC en el tratamiento con clorsulón solo con respecto a la coadministración de lactonas macrocíclicas (Artículo VII, Tabla 2).

La ausencia de diferencias en la disponibilidad plasmática de clorsulón y los metabolitos del ABZ en ovejas tras la coadministración de lactonas macrocíclicas estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos en los ratones y que se han mostrado en los **artículos VI y IV**.

Centrándonos en los residuos en leche y el efecto de las lactonas macrocíclicas sobre los mismos, en el caso de la secreción a leche de ABZSO, esta se vio alterada después de la coadministración de ABZ con ivermectina, doramectina y abamectina, aumentando los niveles de ABZSO en la leche (Artículo V, Figura 2A). Concretamente tras la coadministración junto con ivermectina, se observaron diferencias en las concentraciones en leche a las 8, 10, 12 y 14 h en comparación con el tratamiento con ABZ solo. Además, tras la coadministración con doramectina

6. DISCUSIÓN

se observaron diferencias a la 1, 12 y 14 h y, tras la coadministración con abamectina, se encontraron diferencias desde las 2 h hasta las 14 h. De igual modo, los valores AUC de leche y AUC leche/plasma fueron superiores después de la coadministración con las lactonas macrocíclicas en comparación con el tratamiento con ABZ solo (Artículo V, Tabla 2). Sin embargo, no se observaron diferencias relevantes en los niveles en leche de ABZSO₂ tras la coadministración de lactonas macrocíclicas (Artículo V, Figura 2B); ni tampoco en los parámetros farmacocinéticos entre los grupos experimentales (Artículo V Tabla 2). Aunque las lactonas macrocíclicas han sido descritas como inhibidores de ABCG2 (Merino *et al.*, 2009; González-Lobato *et al.*, 2014) y se ha observado previamente una reducción en el paso a leche de los sustratos del transportador tras su coadministración (Real *et al.*, 2011a; Artículo III), nuestros resultados mostraron un efecto contrario ya que los niveles de ABZSO en la leche aumentaron tras la coadministración de ivermectina, doramectina y abamectina.

En consecuencia, otro tipo de interacciones farmacológicas podrían estar teniendo lugar. En el caso de la administración de ABZ con ivermectina se ha postulado la existencia de un efecto conjunto de los transportadores y las enzimas metabólicas para explicar dicha interacción a nivel sistémico (Merino *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2008; Lanusse *et al.*, 2018). Considerando que la inhibición del transportador se vería reflejada en un aumento en la exposición sistémica de sustratos del transportador, un estudio previo mostró que los niveles plasmáticos de ABZSO fueron más elevados tras la coadministración de ABZ (3,8 mg/kg i.r.) junto con ivermectina (0,2 mg/kg s.c.) en corderos (Alvarez *et al.*, 2008). De igual manera, en ovejas el valor de AUC en plasma para el ABZSO fue superior tras la coadministración oral de ABZ (7,5 mg/kg) junto con ivermectina (0,5 mg/kg) (Merino *et al.*, 2003). Sin embargo, los resultados de nuestro estudio difieren ya que no se

6. DISCUSIÓN

observaron diferencias en los niveles plasmáticos de ABZSO tras la administración conjunta de ABZ (7,5 mg/kg oral) con ivermectina (0,2 mg/kg s.c.) en ovejas (Artículo V, Figura 1 y Tabla 1). Es importante tener en cuenta que la interacción entre fármacos puede ser compleja y puede variar dependiendo de las dosis, la formulación utilizada y las características individuales de los animales. Por tanto, las diferencias encontradas entre los estudios podrían ser debidas a las variaciones entre especies, tal como se ha evidenciado previamente en el caso de los niveles plasmáticos de ABZSO y ABZSO₂ entre corderos, cabras y ovejas (Myers *et al.*, 2020). Además, las diferentes dosis y vías de administración utilizadas en los estudios también puede ser un factor contribuyente (Formentini *et al.*, 2005; Aksit *et al.*, 2015). Por consiguiente, en nuestro estudio es poco probable que exista una interacción o inhibición del transportador debido a la falta de efecto observado a nivel plasmático (Artículo V, Figura 1).

Por otra parte, podría haber inducción del transportador la cual causaría una reducción en la exposición sistémica de los sustratos del transportador y un aumento en su eliminación. Estudios previos muestran que la expresión de ABCG2 puede verse inducida por la ivermectina en hepatocitos de pollo (Xu *et al.*, 2022), así como que los niveles plasmáticos de ivermectina aumentaron tras la coadministración de ABZ e ivermectina en corderos (Alvarez *et al.*, 2008). Aunque existe la posibilidad de una inducción del transportador, en nuestro estudio, como se expuso anteriormente, no se han encontrado diferencias en las concentraciones plasmáticas del ABZSO entre los grupos experimentales. Esto sugiere que la inducción del transportador es poco probable en esta situación. No obstante, en el caso de otro transportador ABC como la P-gp, se ha observado que la inducción puede tener lugar de manera local en un tejido determinado (Jette *et al.*, 1996).

6. DISCUSIÓN

En último lugar, las rutas metabólicas también podrían verse afectadas tras la coadministración de fármacos. El ABZ se metaboliza en el hígado de oveja por acción del citocromo P-450; concretamente, las subfamilias 3A y 1A son las responsables de la formación de ABZSO y ABZSO₂ (Rawden *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2008). Estudios previos han mostrado que los inhibidores del citocromo P-450 aumentan la disponibilidad plasmática en ovejas de otros fármacos antihelmínticos como los metabolitos de triclabendazol (Virkel *et al.*, 2009) o los metabolitos de fenbendazol (Benchaoui y Mckellar, 1996). No obstante, se ha descrito que la ivermectina, la abamectina y la moxidectina no tienen un efecto inhibitor relevante sobre el citocromo P-450 (Abass *et al.*, 2009; Yilmaz *et al.*, 2019; Rendic, 2021). Por otro lado, algunos estudios mostraron que la ivermectina puede inducir la expresión del citocromo P-450 en ratas (Skálová *et al.*, 2000), así como que la abamectina induce la expresión del citocromo 2E1 hepático también en ratas (Radi *et al.*, 2020). En base a nuestro estudio, la posibilidad de cambios en la ruta metabólica del ABZ es poco probable debido a la ausencia de diferencias en los niveles plasmáticos mencionada anteriormente. No obstante, es importante destacar que, si bien el metabolismo de fármacos ocurre principalmente en el hígado, no se puede ignorar la posibilidad de que la glándula mamaria también tenga la capacidad de metabolizar ciertos fármacos. De hecho, se ha observado la presencia de ciertos citocromos en la glándula mamaria (García-Lino *et al.*, 2019) que contribuyen a la bioactivación y la eliminación de compuestos. Aunque no se dispone de información específica sobre los antiparasitarios, sí se cuenta con datos sobre otro tipo de compuestos como carcinógenos. En este sentido, se ha observado que la expresión de citocromos en la glándula mamaria se ha relacionado con el desarrollo y progresión del cáncer de mama (Williams y Phillips, 2000; Lin *et al.*, 2012). De manera similar, la aflatoxina B1 puede ser transformada en aflatoxina M1 por hidroxilación en la glándula mamaria. Esta aflatoxina M1, que es

6. DISCUSIÓN

más común y tóxica, es liberada a la leche, lo que representa un riesgo potencial para los lactantes (Benkerroum y Ismail, 2022).

En el caso del paso de clorsulón a leche y el efecto de las lactonas macrocíclicas sobre el mismo en ovejas, los resultados mostraron una reducción en los residuos de clorsulón en leche tras la coadministración de ivermectina y abamectina, viéndose reflejado en la disminución de los valores de AUC en comparación con el tratamiento de clorsulón solo (Artículo VII, Tabla 3). Asimismo, los valores de $T_{1/2}$ y MRT en leche también fueron inferiores después de la coadministración de las lactonas macrocíclicas, mostrando en general, una reducción en la presencia y persistencia del clorsulón en leche. No obstante, los valores AUC leche/plasma entre los grupos experimentales no mostraron diferencias, probablemente debido a la variabilidad de los resultados y a la ligera reducción (aunque no significativa) de los niveles plasmáticos señalada anteriormente. En cualquier caso, la administración conjunta de clorsulón junto con ivermectina o abamectina provocó una reducción en la presencia de clorsulón en la leche en ganado ovino, confirmando el papel inhibitor sobre ABCG2 de las lactonas macrocíclicas y en concordancia con los resultados obtenidos con los ratones *knockout* al coadministrar clorsulón e ivermectina, en los que tanto las concentraciones de clorsulón en leche como el ratio leche/plasma en ratones *wild-type* fueron inferiores en los animales coadministrados con ivermectina (Artículo VI, Figura 2).

En el caso de la coadministración de closantel con las lactonas macrocíclicas en ovejas, los resultados en el **artículo VIII** mostraron que no hubo diferencias relevantes en los niveles de closantel en leche entre los grupos experimentales (Artículo VIII, Figura 3), así como tampoco en sus parámetros farmacocinéticos (Artículo VIII, Tabla 2). Además, las concentraciones de closantel en leche fueron inferiores a las alcanzadas en plasma, reflejando que la distribución de la sangre

6. DISCUSIÓN

hacia la leche fue limitada. Este hecho fue observado previamente en vacas y cabras tras la administración de closantel donde la relación de reparto entre el plasma y la leche fue del orden de 50:1, así como la relación AUC leche/plasma fue de 0,015 (*European Medicines Agency*, 2012; *lezzi et al.*, 2014), lo cual está en concordancia con nuestros datos.

Por ello, nuestros datos no pudieron probar la interacción farmacológica entre las lactonas macrocíclicas y el closantel. Algunas de los factores que pudieron influir fueron la alta variabilidad interindividual y la diferencia entre las farmacocinéticas. En relación con esto último, el perfil farmacocinético en plasma y en leche de ovejas para la eprinomectina y la ivermectina difieren ligeramente de la farmacocinética del closantel. En el caso de la eprinomectina, las concentraciones en plasma y leche se detectan hasta los 15-17 días (*Imperiale et al.*, 2006; *Hamel et al.*, 2017), mientras que la ivermectina se detecta hasta los 25 y 30 días (*Imperiale et al.*, 2004). En el caso del closantel, vemos que el fármaco permanece en el organismo más allá de estos tiempos, lo que puede dificultar la interacción con las lactonas macrocíclicas.

A la vista de los resultados obtenidos en los **artículos V, VII y VIII**, las posibles interacciones farmacológicas mediadas por ABCG2 deber evaluarse en cada caso concreto ya que existen múltiples factores que pueden afectar al resultado obtenido. Por ello, el estudio de estos factores que influyen en la farmacocinética y en la secreción a leche de los fármacos de uso veterinario, como ABCG2, debe realizarse de manera exhaustiva e individualizada para permitir conocer y modular la aparición de residuos, garantizando así la seguridad y la calidad de la leche y los productos lácteos.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en los estudios presentados podemos obtener las siguientes conclusiones:

CONCLUSIÓN PRIMERA: la expresión de *Abcg2* afecta a los niveles plasmáticos y la acumulación tisular de ácido tolfenámico. Los ratones *Abcg2*^{-/-} mostraron niveles más altos de ácido tolfenámico en el plasma, los testículos y el hígado en comparación con los ratones *wild-type*. Estos hallazgos sugieren que *Abcg2* desempeña un papel crucial en la disponibilidad y distribución de este fármaco en el organismo, lo que tiene implicaciones tanto a nivel terapéutico como toxicológico.

CONCLUSIÓN SEGUNDA: el meloxicam es sustrato del transportador ABCG2, el cual desempeña un papel fundamental en la acumulación del fármaco en el cerebro. Además, se ha demostrado que *Abcg2* participa en la secreción activa de meloxicam a leche, lo cual es relevante para su consideración como residuo lácteo.

CONCLUSIÓN TERCERA: la secreción de meloxicam en la leche de las ovejas mediada por el transportador tiene consecuencias relevantes para su uso en medicina veterinaria. Los estudios de transporte transepitelial mostraron que el transporte de meloxicam mediante la variante ovina de ABCG2 se redujo un 75% en presencia de ivermectina, confirmándose esta inhibición en estudios farmacocinéticos realizados en ovejas. Estos resultados permiten establecer que la modulación de la secreción a leche de este fármaco es posible a través de la inhibición de ABCG2.

CONCLUSIÓN CUARTA: los ensayos de transporte transepitelial revelaron que los metabolitos del albendazol son sustratos *in vitro* del transportador murino *Abcg2* y humano ABCG2. Además, los ensayos realizados en hembras lactantes *Abcg2*^{-/-} demostraron la participación del

7. CONCLUSIONES

transportador en la secreción de estos metabolitos a la leche, lo que puede tener consecuencias negativas para la salud de los consumidores y representar un riesgo para la seguridad alimentaria.

CONCLUSIÓN QUINTA: la coadministración de las lactonas macrocíclicas con albendazol afecta a los residuos en leche de sus metabolitos en ovejas, específicamente aumentando los niveles de ABZSO. Aunque se requieren más investigaciones para comprender las implicaciones de esta interacción, es importante considerar esta posible interacción al administrar conjuntamente estos fármacos al ganado ovino.

CONCLUSIÓN SEXTA: ABCG2 interviene en el transporte del antiparasitario clorsulón y en su secreción activa a la leche, como se ha demostrado en los estudios de transporte transepitelial y en ratones *Abcg2^{-/-}*. Dado que la combinación del clorsulón junto con la ivermectina amplía el espectro de actividad antihelmíntica y limita la aparición de resistencias, se ha comprobado que la ivermectina inhibe el transporte de clorsulón mediado por ABCG2. Esta interacción puede tener relevancia farmacológica tanto en términos de seguridad como de eficacia del clorsulón.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA: los ensayos *in vitro* de transporte transepitelial con la variante ovina de ABCG2 confirman que el clorsulón es sustrato de ABCG2 y que su transporte es inhibido por ivermectina y abamectina. Los resultados farmacocinéticos en ovejas revelaron que su coadministración junto con ivermectina o abamectina reduce los residuos en leche del clorsulón, lo que muestra la posibilidad de modular la secreción de este fármaco a través de la inhibición del transportador.

CONCLUSIÓN OCTAVA: el transportador ABCG2 afecta a la disponibilidad plasmática y la secreción a leche del antihelmíntico closantel, pudiendo influir en su eficacia, toxicidad y residuos

7. CONCLUSIONES

lácteos. Dado que el closantel presenta una persistencia prolongada tanto en plasma como en leche, la inhibición de ABCG2 puede alterar la aparición de residuos, afectando a la seguridad y la calidad de la leche. Sin embargo, la administración conjunta de inhibidores de ABCG2, como la ivermectina y la eprinomectina en ovejas, no tuvo un efecto significativo en los niveles plasmáticos ni en la secreción del fármaco a la leche.

8. CONCLUSIONS

8. CONCLUSIONS

From the results obtained in the presented studies, we can draw the following conclusions:

FIRST CONCLUSION: *Abcg2* affects the plasma levels and tissue accumulation of tolfenamic acid. *Abcg2*^{-/-} mice showed higher levels of tolfenamic acid in plasma, testis and liver compared to *wild-type* mice. These findings suggest that *Abcg2* plays a crucial role in the availability and distribution of this drug, which has therapeutically and toxicologically implications.

SECOND CONCLUSION: meloxicam is a substrate of the ABCG2 transporter, which plays a fundamental role in its accumulation in the brain. Additionally, it has been demonstrated that *Abcg2* is involved in the active secretion of meloxicam into milk, which is relevant for its consideration as a milk residue.

THIRD CONCLUSION: the secretion of meloxicam in sheep milk mediated by the transporter has relevant consequences for its use in veterinary medicine. Transepithelial transport studies showed that the transport of meloxicam mediated by the ovine variant of ABCG2 was reduced by 75% in the presence of ivermectin, confirming this inhibition in pharmacokinetic studies conducted on sheep. These results indicate that the modulation of the milk secretion of this drug is possible through the inhibition of ABCG2.

FOURTH CONCLUSION: transepithelial transport assays revealed that the metabolites of albendazole are *in vitro* substrates of the murine *Abcg2* and human ABCG2 transporters. Furthermore, assays conducted on lactating *Abcg2*^{-/-} females demonstrated the involvement of the transporter in the secretion of these metabolites into milk, which may have negative consequences for the health of consumers, posing a risk for food safety.

8. CONCLUSIONS

FIFTH CONCLUSION: the coadministration of macrocyclic lactones with albendazole affects the residues of their metabolites in sheep milk, particularly increasing the levels of ABZSO. Although further research is needed to understand the implications of this interaction, it is important to consider this potential interaction when concurrently administering these drugs to sheep.

SIXTH CONCLUSION: ABCG2 is involved in the transport of the antiparasitic drug clorsulon and its active secretion into milk, as demonstrated in transepithelial transport studies and in *Abcg2*^{-/-} mice. Since the combination of clorsulon with ivermectin broadens the spectrum of anthelmintic activity and limits the emergence of resistance, it has been observed that ivermectin inhibits the transport of clorsulon mediated by ABCG2. This interaction may have pharmacological relevance in terms of clorsulon's safety and efficacy.

SEVENTH CONCLUSION: *in vitro* transepithelial transport assays using the ovine variant of ABCG2 confirm that clorsulon is a substrate of ABCG2 and that its transport is inhibited by ivermectin and abamectin. Pharmacokinetic results in sheep revealed that coadministration of clorsulon with ivermectin or abamectin reduces the residues of clorsulon in milk, suggesting the possibility of modulating the secretion of this drug by transporter inhibition.

EIGHTH CONCLUSION: ABCG2 transporter affects the plasma availability and milk secretion of the anthelmintic drug closantel, which can influence its efficacy, toxicity and milk residues. Since closantel exhibits prolonged persistence in plasma and milk, inhibition of ABCG2 can alter the presence of residues, affecting the safety and quality of milk. However, the coadministration of ABCG2 inhibitors such as ivermectin and eprinomectin in sheep did not show a significant effect on the plasma levels or milk secretion of the drug.

9. SUMMARY

Evaluation of the interaction of anti-inflammatory and antiparasitic drugs with the ABCG2 transporter: effects on milk safety

9.1. Introduction

The use of drugs, such as nonsteroidal anti-inflammatory (NSAID) or antiparasitic drugs, for the treatment or prevention of diverse pathologies is a common practice in the livestock industry to ensure the health and welfare of animals. Nevertheless, their use entails the potential presence of pharmacological residues in animal-derived products, including milk, which poses a risk to public health. This risk is associated with the exposure of infants and consumers of dairy products to compounds that may be harmful (Prado Flores *et al.*, 2002; Daeseleire *et al.*, 2017; Rana *et al.*, 2019).

In this context, the study of drug-transporter interactions, such as ABCG2, becomes highly relevant. ABCG2 plays a crucial role in the absorption, distribution and elimination of drugs, which could potentially affect the effectiveness and toxicity of the treatment (Vlaming *et al.*, 2009; Stacy *et al.*, 2013). Moreover, it is involved in the active secretion of various drugs into milk, including antimicrobials (Real *et al.*, 2011a; Otero *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2016a), contributing to the presence of drug residues in milk. Considering the need to optimise veterinary treatments and minimise the presence of residues in animal-derived food products, thereby ensuring safe and high-quality milk, the study of the ABCG2 effect on the pharmacokinetics and secretion of drugs into milk is essential. Therefore, the studies performed in this Doctoral Thesis were focused on investigating the interaction of ABCG2 and its role in the bioavailability and secretion into milk of the NSAIDs

tolfenamic acid and meloxicam, as well as the antiparasitic drugs clorsulon and closantel and the metabolites of albendazole (ABZ).

9.2. ABCG2 membrane transporter

The ABCG2 membrane transporter is a protein belonging to the G subfamily of ATP-Binding Cassette (ABC) transporters. These proteins use the energy derived from ATP hydrolysis to transport their substrates through the membrane (Wilkins, 2015). The human *ABCG2* gene is located on chromosome 4 (4q22) and encodes a 655 amino acid and 72 kDa protein (Bailey-Dell *et al.*, 2001; Velamakanni *et al.*, 2007; Liu, 2019). Structurally, the ABCG2 transporter shows a half-transporter conformation with a nucleotide binding domain (NBD) at the N-terminal and a transmembrane domain (TMD) at the C-terminal (Figure 2), and therefore requires homodimerization to be functional (Eckenstaler and Benndorf, 2020). One of the main characteristics of ABCG2 is its ability to interact with a wide variety of compounds, including endogenous compounds, natural substances, drugs and toxic compounds (Mo and Zhang, 2012; Mao and Unadkat, 2015; Safar *et al.*, 2019; Zattoni *et al.*, 2022), and these, in turn, can interact as substrates, inhibitors or both (Table 1).

Moreover, ABCG2 exhibits a broad distribution throughout the organism (Figure 8). It is expressed in the apical membrane of pharmacologically relevant tissues (Zancanella *et al.*, 2013) such as the canalicular membrane of hepatocytes, the luminal membrane of enterocytes and the kidney proximal tubule epithelia; as well as in major protective barriers including blood-brain barrier, blood-testis barrier and placental barrier (Vlaming *et al.*, 2009; Stacy *et al.*, 2013). It behaves like a pump that extrudes compounds out of the cell (Khunweeraphong *et al.*, 2019). Due to its distribution and its aforementioned ability to interact with different compounds, ABCG2 plays a crucial role in

9. SUMMARY

protecting the organism against toxic substances. Consequently, ABCG2 is involved in the absorption, distribution and elimination of drugs, diminishing intestinal absorption and facilitating elimination, which could affect their availability, effectiveness and toxicity (Vlaming *et al.*, 2009; Basseville *et al.*, 2016). Moreover, ABCG2 is involved in the development of resistance to antitumor drugs by limiting its accumulation in tumour cells (Chen *et al.*, 2016).

Furthermore, the expression of ABCG2 is induced in the mammary gland during lactation, participating in the active secretion of its substrates into milk (Figure 9). In fact, it is the only ABC transporter which performs that function (Garcia-Lino *et al.*, 2019). In particular, it is involved in the transfer of natural or endogenous compounds into milk (van Herwaarden *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2014; García-Mateos *et al.*, 2017; Garcia-Lino *et al.*, 2021b; Álvarez-Fernández *et al.*, 2023), as well as the transfer of some veterinary drugs (Real *et al.*, 2011a; Otero *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2016a) (Table 2). In this context, the possible effect of ABCG2 on the milk secretion of drugs widely used in veterinary medicine is highlighted, due to the potential risk associated with consumer exposure to pharmacological residues in milk and dairy products (Rana *et al.*, 2019). Therefore, the effect of the coadministration of inhibitors that can affect the presence of these pharmacological residues in milk is a highly riveting research line. In fact, previous studies have reported the reduction of the concentration of several ABCG2 substrates in ovine milk through modulation of ABCG2 using transporter inhibitors (Real *et al.*, 2011a; Barrera *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2018; Gunes *et al.*, 2023).

Considering the aforementioned, this Doctoral Thesis aimed to fathom the involvement of ABCG2 in the *in vitro* transport, plasma levels, tissue distribution and milk secretion of drugs commonly used in veterinary and/or human medicine: NSAIDs, such as tolfenamic acid and

meloxicam, and antiparasitic, including ABZ metabolites, clorsulon and closantel. For these studies, a common methodology was employed. Firstly, *in vitro* experiments were carried out using MDCK-II cell line and its subclones transduced with the transporter. The objective of these *in vitro* assays was to investigate the involvement of ABCG2 in the active transport of these drugs. Secondly, *in vivo* studies were conducted using male and lactating female *Abcg2*^{-/-} mice to assess the effect of the transporter on the biodistribution and milk secretion of these drugs. Lastly, coadministration assays with inhibitors were conducted for the drugs that showed active milk secretion mediated by ABCG2. These experiments involved the use of macrocyclic lactones as ABCG2 inhibitors in mice and/or sheep.

9.3. Anti-inflammatory drugs

NSAIDs are commonly used in human and veterinary medicine for postoperative pains, migraine, inflammatory processes and musculoskeletal disorders due to its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties (Virginia, 2015; Bindu *et al.*, 2020). Their mechanism of action is based on cyclooxygenase (COX) inhibition, which is implied in the synthesis of prostaglandins (Figure 12). In this process, two main isoforms of COX are involved, COX-1 and COX-2. One way to classify NSAIDs is based on their selectivity to inhibit COX isoenzymes, dividing them into three categories: non-selective COX inhibitors that can act on both isoenzymes, non-selective COX inhibitors with greater selectivity to inhibit COX-2, and selective COX-2 inhibitors that specifically inhibit COX-2 without affecting the action of COX-1 (Tomić *et al.*, 2017; Bindu *et al.*, 2020).

Related with their pharmacokinetic, NSAIDs exhibit good availability after oral, subcutaneous or intramuscular administration. In terms of distribution, they are characterised by showing a low volume of distribution due to their high affinity for plasma proteins. Most NSAIDs are

9. SUMMARY

metabolised in the liver, resulting in the formation of metabolites which are generally inactive and mainly eliminated by renal route (Stock and Coetzee, 2015; Lees, 2018). However, their use is associated with significant side effects, particularly gastrointestinal toxicity (Budsberg, 2015).

Furthermore, in veterinary medicine, NSAIDs are used in combination with antibiotics to treat respiratory diseases (Gallo *et al.*, 2010; Stock and Coetzee, 2015). In the case of NSAIDs used in food-producing animals, strict regulations are in place to govern their usage and the presence of food residues. Maximum residue levels (MRLs) have been established for these drugs to ensure the safety of food products and protect consumer health (The European Commission, 2010) (Table 3). Various factors can contribute to the presence of these residues in milk, including non-compliance with recommended label instructions and withdrawal periods, chemical interactions between drugs and interactions with transporters (Zhang *et al.*, 2010; Beyene, 2015). In relation to the latter, interactions between NSAIDs and ABCG2 have been previously reported, with some NSAIDs, such as diclofenac and flunixin, described as substrates of ABCG2 (Lagas *et al.*, 2009; García-Mateos *et al.*, 2019), while others, like salicylic acid, have been identified as inhibitors of ABCG2 (Wassermann *et al.*, 2013). The current literature had not yet provided a description of the interaction between ABCG2 and widely used NSAIDs such as tolfenamic acid and meloxicam.

On the one hand, tolfenamic acid is an NSAID that belongs to the group of derivatives of anthranilic acid, commonly known as fenamates, as well as to non-selective COX inhibitors (Ahmed *et al.*, 2018). Recent studies have reported its antitumour action in various types of cancer (Kim *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2016; Sankpal *et al.*, 2017). Additionally, its pharmacokinetics has been studied in humans and also in various animal species, including cattle, sheep, goats, dogs, horses, and rats (Jaussaud *et al.*, 1992; McKellar *et al.*, 1994; Pedersen, 1994; Sidhu *et al.*, 2005, 2006;

9. SUMMARY

Patel *et al.*, 2011; Corum *et al.*, 2018; Turk *et al.*, 2021). In terms of pharmacokinetics, tolfenamic acid is metabolised in the liver, leading to the formation of different metabolites that are mainly eliminated through the renal pathway (Ahmed *et al.*, 2018) (Figure 13). Nevertheless, these metabolites exhibit lower activity than the parent compound in regard to their anti-inflammatory and analgesic properties (European Medicines Agency, 1999). Finally, regarding pharmacological residues, the parent compound is used as a marker residue, establishing the MRL of 50 µg/Kg for milk in cattle with a withdrawal period of 24 hours (Smith *et al.*, 2008) (Table 3).

On the other hand, meloxicam is an NSAID belonging to the oxicam group, which is derived from enolic acid. It is also classified as a non-selective COX inhibitor, with a preference for COX-2 (Bindu *et al.*, 2020; Khalil and Aldosari, 2020). Meloxicam plays a significant protective role in neuroinflammation processes by reducing neuroinflammation and oxidative stress in the spinal cord and brain (Haile *et al.*, 2016; Kartha *et al.*, 2018; Dik *et al.*, 2019). Therefore, meloxicam could be a promising therapeutic target in degenerative diseases associated with oxidative stress, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease (Manoharan *et al.*, 2016). In relation to the veterinary field, meloxicam is used in cattle to treat respiratory conditions and diarrhoea, in pigs for locomotor disorders and postoperative pain, in horses for colic and musculoskeletal disorders, and in domestic animals such as dogs and cats to reduce inflammation, postoperative and musculoskeletal pain (Budsberg, 2015; Daeseleire *et al.*, 2017; European Medicines Agency, 2018; Khalil and Aldosari, 2020). In terms of pharmacokinetics, meloxicam is characterised by its high bioavailability and is metabolised in the liver, leading to the formation of biologically inactive metabolites that are excreted through urine and faeces (Miyamoto *et al.*, 2017; Khalil and Aldosari, 2020) (Figure 14). Meloxicam shows better gastrointestinal tolerability

compared to other NSAIDs in human studies, possibly due to its selectivity in inhibiting COX-2 (Zeidler *et al.*, 2002). Lastly, meloxicam is a regulated drug for veterinary use in food-producing animals, including lactating dairy cattle. The MRL of 15 µg/Kg has been established for meloxicam in milk, using parent compound as a marker residue (Table 3). Likewise, a withdrawal period of 5 days is recommended for milk from bovine livestock (The European Commission, 2010; European Medicines Agency, 2018).

9.4. Antiparasitic drugs

Helminthic infections such as fascioliasis, which affects a wide range of domestic and wild animals, are caused by foodborne trematodes (Figure 15). These infections produce significant economic losses in the livestock sector due to reductions in milk and meat yields. Furthermore, it is worth highlighting that these infections can have an impact not only on animals but also on humans. The treatment of fascioliasis is based on chemotherapy using various anthelmintic agents such as ABZ, clorsulon and closantel (Keiser and Utzinger, 2009; Vercruyssen *et al.*, 2018; Siles-Lucas *et al.*, 2021). Nevertheless, the use of antiparasitic drugs in dairy cattle may represent a public health problem owing to the potential presence of residues of these drugs in milk and its derived products (Statham, 2015; Imperiale and Lanusse, 2021). Moreover, their wide use has been associated with the development of resistance, and one strategy to delay it consists of using combinations of anthelmintic drugs with different mechanisms of action (Lanusse *et al.*, 2018; Fissiha and Kinde, 2021). However, the use of drug combinations might lead to unpredictable drug-drug interactions that should be considered. In particular, transporter-based interactions may affect pharmacokinetics parameters and secretion into milk of drugs (Zhang *et al.*, 2010; Garcia-Lino *et al.*, 2019; Neodo *et al.*, 2019).

9. SUMMARY

Within this context, the interaction between ABCG2 and certain antiparasitic drugs has been previously studied. For instance, oxfendazole, moxidectin and monepantel were described as substrates of the transporter (Merino *et al.*, 2005c; Pérez *et al.*, 2009a; Mahnke *et al.*, 2016). Similarly, previous studies have shown that albendazole sulphoxide (ABZSO) is a substrate of the transporter, unlike its parental compound, ABZ (Merino *et al.*, 2005c). Moreover, metabolites of triclabendazole, selamectin, ivermectin, eprinomectin and doramectin have been described as inhibitors of the transporter (Merino *et al.*, 2009; Barrera *et al.*, 2012; González-Lobato *et al.*, 2014; Garcia-Lino *et al.*, 2021a). However, the relationship between ABCG2 transporter and other metabolites of ABZ, clorsulon and closantel had not been described yet.

Initially, ABZ is an anthelmintic drug belonging to the benzimidazole family generally used in veterinary and human medicine against gastrointestinal infections caused by nematodes, trematodes, and cestodes (European Medicines Agency, 2004; Siles-Lucas *et al.*, 2018). As a benzimidazole compound, its mechanism of action involves its binding to the β -tubulin of the parasite, interfering with the formation of microtubules and thus inhibiting cellular processes such as cell division (Siles-Lucas *et al.*, 2018). After its oral administration, ABZ is absorbed from the intestinal lumen and metabolised in gut and liver to ABZSO, albendazole sulphone (ABZSO₂) and albendazole 2-aminosulphone (ABZSO₂-NH₂) (Merino *et al.*, 2003; Batzias and Delis, 2004). Two different enzymatic systems are involved in ABZ metabolism: flavin-containing monooxygenase and cytochrome P-450 (Rawden *et al.*, 2000; Karlik *et al.*, 2019) (Figure 16). ABZSO and ABZSO₂ are the main metabolites commonly found in plasma, while all three metabolites are detected in milk (Liguoro *et al.*, 1996; Fletouris *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2017; Siles-Lucas *et al.*, 2018). With regard to anthelmintic activity, ABZ and ABZSO have been reported to be active

9. SUMMARY

whereas, in the case of ABZSO₂, there are contradictory studies (Ingold *et al.*, 1999; Stettler *et al.*, 2001; Adas *et al.*, 2009). Lastly, ABZ is a regulated drug approved for use in animals intended for food production. Therefore, the MRL of 100 µg/Kg has been established in milk that is determined using the sum of main metabolites as marker residues (The European Commission, 2010) (Table 4). Based on this MRL, a withdrawal period of 3 days has been established for bovine milk (Moreno *et al.*, 2005).

The next antiparasitic drug under study was clorsulon. It is a benzenesulphonamide antiparasitic used for treatment against adult liver fluke (European Medicines Agency, 2008). Furthermore, it has recently been proposed as an alternative for the treatment of schistosomiasis (Ferraroni *et al.*, 2022). Clorsulon is commercially available in combination with the macrocyclic lactone ivermectin as a broad-spectrum anthelmintic agent that is effective in sheep and cattle (Ibarra-Velarde *et al.*, 2001; Loyacano *et al.*, 2001; Heredia *et al.*, 2016). The mechanism of action of clorsulon consists of blocking the energy-producing pathway in the fluke. Specifically, it inhibits two enzymes involved in glycolysis of parasite: 3-phosphate-glyceratekinase and phosphoglyceromutase. In relation to its pharmacokinetics, clorsulon is well absorbed and eliminated via the urinary tract without being metabolised (European Medicines Agency, 2008; Richter *et al.*, 2013). Regarding the presence of clorsulon residues in milk, the parent drug is used as a marker residue to establish the MRL of 16 µg/Kg in milk (Table 5). Moreover, a withdrawal period in combination with ivermectin of 66 days has been established for bovine milk (Escribano *et al.*, 2012; European Medicines Agency, 2014b).

Finally, our research was focused on studying the antiparasitic closantel. It is a salicylanilide-derived drug used in cattle and sheep against adult stage of *Fasciola hepatica*, some

9. SUMMARY

nematodes and ectoparasites. To extend the spectrum of anthelmintic activity, closantel can be used as an alone treatment or in combination with other anthelmintics such as ivermectin (Power *et al.*, 2013b). It acts via energy pathway by uncoupling oxidative phosphorylation in the mitochondria of liver fluke. Additionally, it interferes with the mechanism responsible for maintaining pH homeostasis and induces spastic paralysis in the fluke. Moreover, the main route of entry of closantel within the parasites is by oral ingestion (European Medicines Agency, 2012; Ceballos *et al.*, 2017). Regarding its pharmacokinetics, closantel is rapidly absorbed, poorly metabolised and excreted unchanged through faeces. It is characterised by its high affinity for plasma proteins, which can explain its prolonged persistence in the plasma and its elimination (Lifschitz *et al.*, 2017; Imperiale and Lanusse, 2021). For example, the elimination half-life of closantel in sheep plasma was reported to be between 12-23 days (Hennessy *et al.*, 1993; Swan *et al.*, 1999). Likewise, closantel exhibits long persistence in milk since its half-life ranges from 10 to 17 days in cows and the withdrawal period in goat milk is between 39 and 43 days. Apart from its high persistence in milk, closantel concentrations in dairy products such as cheese and ricotta are higher than those measured in milk, which should be considered in closantel treatments (Power *et al.*, 2013b; Iezzi *et al.*, 2014). However, milk concentrations of closantel are lower compared to those obtained in plasma, revealing a limited distribution of closantel from blood to milk (European Medicines Agency, 2012; Iezzi *et al.*, 2014). Finally, closantel is used as the residue marker in bovine and sheep milk and its MRL was established at 45 µg/Kg (European Medicines Agency, 2014c) (Table 6).

9.5. Interaction between anti-inflammatory drugs and ABCG2

Considering the widespread use of NSAIDs in both veterinary and human medicine, as well as the potential impact of the ABCG2 protein transporter on their plasma availability, tissue distribution and secretion into milk, we decided to focus a section of this Thesis on the interaction between ABCG2 and two different NSAIDs: tolfenamic acid and meloxicam.

Firstly, *in vitro* transepithelial transport assays conducted in **Article I** and **Article II** demonstrated that tolfenamic acid and meloxicam are substrates of ABCG2. This was evident since basal to apical transport of both drugs in ABCG2-transduced cells was higher than apical to basal transport (Article I, Figure 1; Article II, Figure 1). To confirm that this effect is specifically caused by ABCG2, the specific inhibitor Ko143 was used (Allen *et al.*, 2002), resulting in a similar efflux ratio to that of the parental cell line (Article I, Figure 1; Article II, Figure 1). The observed variations in ABCG2 transport efficiency among NSAIDs may be attributed to differences in physicochemical properties of the drugs, including factors such as the lipid-water partition coefficient, hydrophobicity, polarity, solubility, molecular weight or the number of hydrogen bond acceptors (El-Kattan and Varm, 2012; Egido *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015).

Based on these results, the interaction between the transporter and these NSAIDs was also studied using *in vivo* models with *Abcg2* knockout mice. This approach aimed to assess the role of the transporter in the plasma availability, tissue distribution and milk secretion of these drugs. In **Article I**, plasma levels of tolfenamic acid were higher in *Abcg2*^{-/-} compared to wild-type mice after its oral and intravenous administration, which are two of the most common routes of administration of the drug (Article I, Figures 2 and 3). Moreover, levels of tolfenamic acid in liver and testis of *Abcg2*^{-/-} mice were higher compared to wild-type mice (Article I, Table 1). Our results demonstrated

9. SUMMARY

the crucial protective role of Abcg2 in the liver and the blood-testis barrier, preventing them from the accumulation of tolfenamic acid, which can cause toxicity problems (Li *et al.*, 2009; Tatematsu *et al.*, 2016). In contrast, assays of secretion into milk indicated that Abcg2 did not affect the milk secretion of tolfenamic acid, as there were not any differences in the concentrations of tolfenamic acid in milk between both types of mice, and either in the milk/plasma ratio.

Referring to meloxicam, results from **Article II** indicated the involvement of the transporter in its oral pharmacokinetics, since meloxicam levels were higher in Abcg2^{-/-} mice compared to wild-type mice (Article I, Figure 2). These results showed that Abcg2 is involved in oral bioavailability of meloxicam by reducing its absorption and probably increasing its intestinal excretion. Similarly, outcomes in the brain carried substantial clinical significance as accumulation of meloxicam was observed in Abcg2^{-/-} mice compared to wild-type mice (Article II, Table 1 and 2). These results revealed the significant role of Abcg2 in the transport of meloxicam through the blood-brain barrier and its accumulation in the brain. Several previous studies have described the protective role of meloxicam in neuroinflammation processes and oxidative stress in the spinal cord and brain (Han and Ren, 2014; Haile *et al.*, 2016; Kartha *et al.*, 2018; Er *et al.*, 2020). Consequently, the inhibition of ABCG2 and the increase in meloxicam levels in the brain offer a promising treatment and prevention approach for neurodegenerative diseases.

In contrast to tolfenamic acid, **Article II** demonstrated that Abcg2 participates in the milk secretion of meloxicam. Concentrations of meloxicam in milk and milk/plasma ratio were significantly higher in wild-type mice in comparison to Abcg2^{-/-} counterparts (Article II, Figure 3). Transport of meloxicam in the mammary gland mediated by ABCG2 may have clinical and

toxicological implications, as it is associated with its presence as a residue in milk. This raises significant concerns regarding its use as an anti-inflammatory agent in veterinary medicine.

Therefore, **Article III** studied the effect of ivermectin, an antiparasitic drug belonging to the group of macrocyclic lactones and described as an inhibitor of ABCG2 (Merino *et al.*, 2009), on the secretion of meloxicam into sheep milk. Firstly, it was observed that ivermectin is an efficient inhibitor of *in vitro* transport of meloxicam mediated by ovine ABCG2-transduced cells, resulting in a significant reduction in the transport ratio (24.85 ± 4.62 in controls vs 6.31 ± 1.37 in presence of ivermectin) (Article III, Table 1). Additionally, pharmacokinetic studies carried out in sheep demonstrated that coadministration of meloxicam with ivermectin led to a decrease in meloxicam residues in milk. In fact, a significant reduction in both, the AUC in milk (3.92 ± 0.66 vs 2.26 ± 1.52 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) and the AUC milk/plasma ratio (0.17 ± 0.03 vs 0.09 ± 0.06) was reported for ivermectin-treated animals compared to controls (Article III, Figure 1 and Table 2). These findings demonstrate the impact of drug-drug interactions on the secretion of meloxicam into milk, specifically through the use of inhibitors of the transporter. This research contributes to the understanding of the factors that affect the transfer of anti-inflammatory drugs into milk in ruminants.

9.6. Interaction between antiparasitic drugs and ABCG2

Understanding the interactions between antiparasitic drugs and ABCG2 is crucial because of their potential impact on the pharmacokinetics and milk secretion of these drugs. This, in turn, can influence the effectiveness of the treatment and the presence of residues in products derived from treated animals.

9. SUMMARY

Firstly, the **Article IV** showed that the metabolites of ABZ, ABZSO₂ and ABZSO₂-NH₂, are *in vitro* substrates of the murine the human variants of the transporter. For ABZSO₂, a preferential basal to apical transport was reported in both variants with an efflux ratio significantly higher in murine Abcg2 (5.47 ± 0.32) and human ABCG2 (1.35 ± 0.16) transduced cells compared to parental cells (0.97 ± 0.08) (Article IV, Figure 1 and Table 1). In the same way, for ABZSO₂-NH₂, apical directional transport in murine (4.48 ± 0.53) and human (3.58 ± 0.79) variants was higher than in parental cells (1.02 ± 0.12) (Article IV, Figure 2 and Table 1). Previous studies have also shown a variation in transport efficiency between murine and human in other tested drugs, which suggests a potential difference in substrate affinity or selectivity (Mizuno *et al.*, 2004; Merino *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2022; Álvarez-Fernández *et al.*, 2023). Considering these results and the role of ABCG2 in the active secretion of its substrates into milk, its involvement in the secretion of ABZ metabolites into milk was evaluated using lactating female Abcg2^{-/-} mice. Our results showed that after the administration of ABZSO, ABZSO₂ and ABZSO₂-NH₂, milk concentrations and milk/plasma ratios were higher in wild-type compared to Abcg2^{-/-} mice (Article IV, Figure 3). Regarding plasma levels, no significant differences between wild-type and Abcg2^{-/-} mice were reported. Comparable results have been observed for other ABCG2 substrates such as danofloxacin (Real *et al.*, 2011a) and ciprofloxacin (Merino *et al.*, 2006).

Murine Abcg2 plays a significant role in secretion of ABZ metabolites into milk, which may contribute to the undesired presence of drug residues in milk after ABZ administration in livestock. This situation poses a risk as it exposes consumers to these compounds. Therefore, in **Article V**, the potential impact of coadministration of macrocyclic lactones, ivermectin, doramectin and abamectin, on the residues of ABZ metabolites in sheep milk was examined. The transfer into milk

9. SUMMARY

of ABZSO was altered after coadministration of ABZ with ivermectin, doramectin and abamectin, increasing ABZSO levels in milk. However, no relevant differences in ABZSO₂ milk levels were showed after coadministration of ABZ with macrocyclic lactones (Article V, Figure 2 and Table 2). Moreover, and related to plasma levels, no relevant differences of ABZSO and ABZSO₂ were observed between experimental groups (Article V, Figure 1 and Table 1). Although previous studies have described that macrocyclic lactones inhibit the activity of ABCG2 (Merino *et al.*, 2009; González-Lobato *et al.*, 2014), and a reduction in the secretion of its substrates into milk has been observed after their coadministration (Real *et al.*, 2011a), our results revealed an opposite outcome. Consequently, other types of drug-drug interactions could be occurring. The existence of a synergistic effect of efflux transporters and metabolic enzymes was formerly proposed to explain these interactions (Merino *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2008; Lanusse *et al.*, 2018; Garcia-Lino *et al.*, 2019).

Taking into account that the inhibition of the transporter would result in a higher systemic exposure of transporter substrates, previous studies have reported higher plasma levels of ABZSO after the administration of ABZ in combination with ivermectin in lambs and sheep compared to treatment with ABZ alone (Merino *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2008). Nevertheless, in our study, transporter inhibition is unlikely due to the lack of effect at plasma level, which may be attributed to variations in dosages and administration routes. Furthermore, transporter induction is a possibility, leading to reduced systemic exposure and increased elimination of substrates. Nonetheless, our study revealed no differences in plasma concentrations of ABZSO between experimental groups, suggesting that transporter induction is unlikely in this situation. Lastly, metabolic pathways may also be affected following the coadministration of drugs. A previous study has shown that

9. SUMMARY

cytochrome P-450 inhibitors increase the plasma availability of triclabendazole metabolites in sheep (Virkel *et al.*, 2009). However, it has been reported that ivermectin and abamectin do not have a significant inhibitory effect on cytochrome P-450 (Abass *et al.*, 2009; Yilmaz *et al.*, 2019; Rendic, 2021). In contrast, other studies have shown that the expression of cytochromes can be induced by ivermectin or abamectin (Skálová *et al.*, 2000; Radi *et al.*, 2020). Despite these observations, the possibility of changes in ABZ metabolic pathway was also unlikely since no relevant differences were reported in plasma concentrations between experimental groups. Nonetheless, metabolism in the mammary gland cannot be ruled out since xenobiotic metabolising enzymes expressed in mammary gland such as cytochromes were reported, although in less proportion than in liver (Lin *et al.*, 2012; Garcia-Lino *et al.*, 2019). According to **Article V**, further research is required to fully understand this interaction. However, it is crucial to emphasise that coadministration of these drugs leads to a significant increase in one of the main ABZ metabolites in milk, which could enlarge the risk of exposure for consumers.

Our investigations continued with the study of the interaction between ABCG2 and the antiparasitic clorsulon in **Article VI**. Transepithelial transport assays showed a preferential basal to apical transport in murine *Abcg2* and human ABCG2 in contrast with parental cells (Article VI, Figure 1). In fact, relative efflux transport ratio for clorsulon in murine *Abcg2* (2.20 ± 0.13) and human ABCG2 (1.63 ± 0.17)-transduced cells was significantly higher than in the parental cells (1.05 ± 0.08) (Article VI, Table 1). In the presence of *Abcg2* specific inhibitor Ko143, efflux transport ratios in murine and human variants of the transporter were reverted (Article VI, Table 1). These outcomes show that clorsulon is an *in vitro* substrate for murine *Abcg2* and human ABCG2. This is

9. SUMMARY

the first time that an antiparasitic drug belonging to the benzenesulphonamide groups was identified as an ABCG2 substrate.

In addition, the involvement of Abcg2 in the secretion of clorsulon into milk was demonstrated using lactating Abcg2^{-/-}. Milk concentrations of clorsulon were higher in wild-type mice than in Abcg2^{-/-} mice (2.56 ± 0.75 µg/mL versus 1.61 ± 0.65 µg/mL, respectively). In the same way, the milk/plasma ratio of clorsulon was significantly higher in wild-type than in Abcg2^{-/-} mice (1.01 ± 0.61 µg/mL versus 0.51 ± 0.36 µg/mL, respectively). Contrarily, plasma concentrations of clorsulon showed no differences between wild-type and Abcg2^{-/-} mice in the treatment neither with clorsulon alone nor with the combination of clorsulon and ivermectin (Article VI, Figure 2). These results demonstrated that Abcg2 plays a significant role in the active secretion of clorsulon into milk, which could potentially affect the presence of residues in dairy products, posing a hazard to public health.

In this context, clorsulon and ivermectin constitute a commercially marketed combination for veterinary therapy (Ibarra-Velarde *et al.*, 2001; Meaney *et al.*, 2003). Therefore, the effect of ivermectin on both *in vitro* transport and milk secretion of clorsulon was also evaluated in **Article VI**. Firstly, it was observed that ivermectin inhibits the *in vitro* transport of clorsulon that was evidenced by a significant decrease in the efflux transport ratios in murine Abcg2 and human ABCG2-transduced cells when ivermectin was present (Article VI, Figure 1 and Table 1). Likewise, for *in vivo* assays, concentrations of clorsulon in milk and the milk/plasma ratio in wild-type mice were reduced when clorsulon was coadministered with ivermectin compared to those treated with clorsulon alone (Article VI, Figure 2). Moreover, the effect of ivermectin on clorsulon secretion into milk can be attributed to Abcg2, for two main reasons: Abcg2 is the main ABC transporter with induced expression in the mammary gland during lactation (Jonker *et al.*, 2005; van Herwaarden

9. SUMMARY

and Schinkel, 2006), and no differences in milk concentrations or milk/plasma ratios were detected between wild-type and *Abcg2*^{-/-} mice following ivermectin treatment, suggesting that the effect of ivermectin is *Abcg2*-specific. Similar results were previously reported using *in vivo* assays with mice, where ABCG2 inhibitors were shown to decrease the milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin (Merino *et al.*, 2010; Barrera *et al.*, 2012).

Considering these findings and the relevance of *Abcg2* in the potential presence of residues in livestock milk, in **Article VII**, the interaction with the ovine variant of ABCG2 as well as its possible role in the secretion of clorsulon into milk in sheep were evaluated. Additionally, the effect of two macrocyclic lactones, ivermectin and abamectin, on ABCG2-mediated transport and milk secretion of clorsulon in sheep was tested. The results confirmed that clorsulon is also an *in vitro* substrate of the ovine variant of ABCG2 due to the fact that relative efflux ratio was higher in ovine ABCG2 cells in comparison to parental cells (2.70 ± 0.87 vs 1.07 ± 0.08 , respectively). Furthermore, the presence of ivermectin and abamectin inhibits the transport of clorsulon mediated by ovine ABCG2, which was evidenced by lower efflux ratios compared to treatment with clorsulon alone (Article VII, Figure 1 and Table 1).

Based on the significant inhibition observed in the *in vitro* assays, the coadministration of clorsulon with ivermectin and abamectin in sheep was conducted to assess *in vivo* the extent of drug-drug interaction mediated by ABCG2. Regarding plasma levels, no significant differences were observed in the AUC values between treatment with clorsulon alone and coadministration with macrocyclic lactones (Article VII, Table 2) which is in accordance with the previously observed lack of difference in clorsulon plasma levels in mice after coadministration with ivermectin (Article VI, Figure 2). Although our results evidently showed that clorsulon is a substrate of *Abcg2* and this

9. SUMMARY

transporter can have an influence on the plasma disposition of its substrates (Vlaming *et al.*, 2009), it is important to consider that other factors, including the potential involvement of other transporters *in vivo*, may conceal the effect of Abcg2 on the systemic disposition of clorsulon.

Focusing on milk residues, the results showed a reduction in clorsulon residues in milk after coadministration of ivermectin and abamectin. The milk AUC value for clorsulon was significantly lower after coadministration with ivermectin ($15.15 \pm 3.17 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) and abamectin ($15.30 \pm 3.25 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) compared to clorsulon alone treatment ($20.73 \pm 4.97 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). However, there were no significant differences in the milk/plasma AUC ratios between experimental groups (Article VII, Table 3). This might be attributed to the potential impact of the coadministration of macrocyclic lactones on the systemic exposure of clorsulon as a slight reduction in plasma AUC was observed, although it was not statistically significant (Article VII, Table 2), probably due to the high interindividual variability. As a result, the decrease in milk levels of clorsulon may be attributed to the potential reduction in plasma levels. In any case, **Article VII** showed that coadministration of clorsulon with ivermectin or abamectin led to a decrease in the presence and persistence of clorsulon in sheep milk.

Finally, our assays, described in **Article VIII**, focused on investigating the interaction between ABCG2 and the anthelmintic closantel. Due to technical limitations, this evaluation was conducted directly using Abcg2^{-/-} mouse model as *in vitro* assays were not feasible. Firstly, after oral administration of closantel in male mice, plasma closantel concentrations were significantly higher in Abcg2^{-/-} mice compared to wild-type mice, from 72 hours to 10 weeks, where they were still 6-fold higher (Article VIII, Figure 1). Besides, Abcg2^{-/-} total exposure to closantel was higher as evidenced by the AUC value which was 1.6-fold higher than in the wild-type mice. Consequently, Abcg2 affects

9. SUMMARY

the pharmacokinetics of closantel by limiting its absorption after oral administration and enhancing its elimination. In addition, any factor that modifies the activity of the transporter could cause the accumulation of closantel or further enlarge its permanence in plasma, which may affect the effectiveness of the treatment or the appearance of side effects. In fact, several studies show the adverse effects of closantel on the central nervous system, optic nerve and retinal tissues in sheep and goats after unintentional overdose (Gill *et al.*, 1999; van der Lugt and Venter, 2007).

Then, our data showed that Abcg2 has a relevant role in the secretion of closantel in milk, as it is evidenced by the higher milk/plasma ratio in wild-type mice compared to Abcg2^{-/-} animals, at all-time points tested (Article VIII, Figure 2). Additionally, the important role of Abcg2 in the closantel plasma availability was restated since there were also differences in closantel plasma level between wild-type and Abcg2^{-/-} mice at 24 and 96h, being higher in knockout mice (Article VIII, Figure 2).

In view of the pharmacokinetics, closantel is characterised not only by its prolonged presence in plasma, which ensures its efficacy against parasites, but also by its long persistence in milk, which affects residues in dairy products (Power *et al.*, 2013b; Iezzi *et al.*, 2014; Ceballos *et al.*, 2017; Lifschitz *et al.*, 2017). Along with previous demonstration that Abcg2 is involved in active secretion of closantel into milk in mice, in **Article VIII**, the effect of coadministration ABCG2 inhibitors was evaluated. To check the potential *in vivo* drug-drug interactions, assay in sheep was carried out, coadministrating closantel with ivermectin or eprinomectin as ABCG2 inhibitors. However, results showed no significant effect neither on the plasma or milk levels of closantel, nor on the pharmacokinetic parameters between experimental groups (Article VIII, Figure 3, Table 1 and 2). It is worth mentioning that concentrations of closantel in milk were lower than those achieved in plasma, reflecting that the distribution of closantel from blood into milk was limited. This

9. SUMMARY

fact was previously observed in cows and goats after closantel administration where the partition ratio between plasma and milk was of the order of 50:1, as well as the milk/plasma AUC ratio was 0.015 (European Medicines Agency, 2012; Iezzi *et al.*, 2014), which is in agreement with our data (Article VIII, Table 2). Therefore, our experimental conditions could not prove a drug-drug interaction between the macrocyclic lactones and closantel in sheep, probably as a consequence of the high inter-individual variability and the difference between the pharmacokinetic profile of both drugs (Imperiale *et al.*, 2004, 2006; Hamel *et al.*, 2017).

The results obtained in this Doctoral Thesis demonstrate the involvement of ABCG2 in the bioavailability and secretion into the milk of drugs commonly used in veterinary medicine, such as anti-inflammatory and antiparasitic drugs. Furthermore, these studies reveal the influence of ABCG2 in the presence of residues in sheep milk and the potential drug interactions resulting from coadministration of drugs. These studies will enable the design of suitable therapeutic strategies to optimise the safety and quality of milk and dairy products.

10. BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

Abass, K., Turpeinen, M. y Pelkonen, O. (2009) "An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes", *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 44(6), pp. 553-563. doi:10.1080/03601230902997766.

Abdel-Tawab, A. M., Bradley, M., Ghazaly, E. A., Horton, J. y El-Setouhy, M. (2009) "Albendazole and its metabolites in the breast milk of lactating women following a single oral dose of albendazole", *British Journal of Clinical Pharmacology*, 68(5), pp. 737-742. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03524.x.

Abdelrahim, M., Baker, C. H., Abbruzzese, J. L. y Safe, S. (2006) "Tolfenamic acid and pancreatic cancer growth, angiogenesis, and Sp protein degradation", *Journal of the National Cancer Institute*, 98(12), pp. 855-868. doi:10.1093/jnci/djj232.

Adas, G., Arikan, S., Kemik, O., Oner, A., Sahip, N. y Karatepe, O. (2009) "Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolicial agents on hydatid cysts (in vitro study)", *World Journal of Gastroenterology*, 15(1), p. 112. doi:10.3748/wjg.15.112.

Adwan, L., Subaiea, G. M., Basha, R. y Zawia, N. H. (2015) "Tolfenamic acid reduces tau and CDK5 levels: implications for dementia and tauopathies", *Journal of Neurochemistry*, 133(2), pp. 266-272. doi:10.1111/jnc.12960.

Ahmed, S., Sheraz, M. A. y Ahmad, I. (2018) "Tolfenamic Acid", *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 43, pp. 255-319. doi:10.1016/bs.podrm.2018.01.001.

Aksit, D., Yalinkilinc, H. S., Sekkin, S., Boyacioğlu, M., Cirak, V. Y., Ayaz, E. y Gokbulut, C. (2015) "Comparative pharmacokinetics and bioavailability of albendazole sulfoxide in sheep and goats, and dose-dependent plasma disposition in goats", *BMC Veterinary Research*, 11(1), p. 124. doi:10.1186/s12917-015-0442-5.

10. BIBLIOGRAFÍA

Al-Shawi, M. K. (2011) "Catalytic and transport cycles of ABC exporters", *Essays in Biochemistry*, 50, pp. 63-83. doi:10.1042/bse0500063.

Albert, O., Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Legrand, A., Guillé, F., Bensalah, K., Dejuq-Rainsford, N. y Jégou, B. (2013) "Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro", *Human Reproduction*, 28(7), pp. 1890-1898. doi:10.1093/humrep/det112.

Alfaras, I., Pérez, M., Juan, M. E., Merino, G., Prieto, J. G., Planas, J. M. y Álvarez, A. I. (2010) "Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) in the bioavailability and tissue distribution of trans- resveratrol in knockout mice", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), pp. 4523-4528. doi:10.1021/jf9042858.

Allen, J. D., van Loevezijn, A., Lakhai, J. M., van der Valk, M., van Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J. H. M., 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", *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(6), pp. 417-425. Disponible en: <https://aacrjournals.org/mct/article/1/6/417/233728/Potent-and-Specific-Inhibition-of-the-Breast>

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 Research*, 58(23), pp. 5337-5339. Disponible en: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/58/23/5337/504837/A-Human-Placenta-specific-ATP-Binding-Cassette>

Álvarez-Sánchez, M. A., Mainar-Jaime, R. C., Pérez-García, J. y Rojo-Vázquez, F. A. (2006) "Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain", *Veterinary*

10. BIBLIOGRAFÍA

Record, 159(13), pp. 424-425. doi:10.1136/vr.159.13.424.

Álvarez-Fernández, L., Gomez-Gomez, A., Haro, N., García-Lino, A. M., Álvarez, A. I., Pozo, O. J. y Merino, G. (2023) "ABCG2 transporter plays a key role in the biodistribution of melatonin and its main metabolites", *Journal of Pineal Research*, 74(2), pp. 1-11. doi:10.1111/jpi.12849.

Alvarez, L.I., Martínez Valladares, M., Canton, C., Lanusse, C. E. y Ceballos, L. (2020) "Testing Albendazole Resistance in *Fasciola hepatica*", en *Fasciola hepatica: Methods and Protocols*, pp. 213-220. doi:10.1007/978-1-0716-0475-5.

Alvarez, L. I., Sanchez, S. F. y Lanusse, C. E. (1999) "In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22(2), pp. 77-86. doi:10.1046/j.1365-2885.1999.00194.x.

Alvarez, L., Lifschitz, A., Entrocasso, C., Manazza, J., Mottier, L., Borda, B., Virkel, G. y Lanusse, C. E. (2008) "Evaluation of the interaction between ivermectin and albendazole following their combined use in lambs", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(3), pp. 230-239. doi:10.1111/j.1365-2885.2008.00953.x.

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 Metabolism and Disposition*, 35(10), pp. 1873-1879. doi:10.1124/dmd.107.014969.

Austin Doyle, L. y Ross, D. D. (2003) "Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)", *Oncogene*, 22(47), pp. 7340-7358. doi:10.1038/sj.onc.1206938.

Bailey-Dell, K. J., Hassel, B., Doyle, L. A. y Ross, D. D. (2001) "Promoter characterization and

10. BIBLIOGRAFÍA

genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1520(3), pp. 234-241. doi:10.1016/S0167-4781(01)00270-6.

Barrera, B., González-Lobato, L., Otero, J. A., Real, R., Prieto, J. G., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2013) "Effects of triclabendazole on secretion of danofloxacin and moxidectin into the milk of sheep: Role of triclabendazole metabolites as inhibitors of the ruminant ABCG2 transporter", *The Veterinary Journal*, 198(2), pp. 429-436. doi:10.1016/j.tvjl.2013.07.033.

Barrera, B., Otero, J. A., Egido, E., Prieto, J. G., Seelig, A., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2012) "The anthelmintic triclabendazole and its metabolites inhibit the membrane transporter ABCG2/BCRP", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), pp. 3535-3543. doi:10.1128/AAC.06345-11.

Bartram, D. J., Leathwick, D. M., Taylor, M. A., Geurden, T. y Maeder, S. J. (2012) "The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes", *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), pp. 151-158. doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.030.

Basseville, A., Hall, M. D., Chau, C. H., Robey, R. W., Gottesman, M., Figg, W. D. y Bates, S. E. (2016) "The ABCG2 Multidrug Transporter", en *ABC Transporters - 40 Years on*, pp. 195-226. doi:10.1007/978-3-319-23476-2_9.

Batzias, G. C. y Delis, G. A. (2004) "Reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone and albendazole 2-aminosulphone in sheep plasma", *Journal of Chromatography B*, 805(2), pp. 267-274. doi:10.1016/j.jchromb.2004.03.012.

ter Beek, J., Guskov, A. y Slotboom, D. J. (2014) "Structural diversity of ABC transporters", *Journal of General Physiology*, 143(4), pp. 419-435. doi:10.1085/jgp.201411164.

10. BIBLIOGRAFÍA

Beis, K. (2015) "Structural basis for the mechanism of ABC transporters", *Biochemical Society Transactions*, 43(April), pp. 889-893. doi:10.1042/BST20150047.

Bekker, A., Klopping, C. y Collingwood, S. (2018) "Meloxicam in the management of post-operative pain: Narrative review", *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 34(4), p. 450. doi:10.4103/joacp.JOACP_133_18.

Benchaoui, H. A. y Mckellar, Q. A. (1996) "Interaction between Fenbendazole and Piperonyl Butoxide: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Implications", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48(7), pp. 753-759. doi:10.1111/j.2042-7158.1996.tb03965.x.

Benderra, Z., Faussat, A.-M., Sayada, L., Perrot, J.-Y., Chaoui, D., Marie, J.-P. y Legrand, O. (2004) "Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein in 149 Adult Acute Myeloid Leukemias", *Clinical Cancer Research*, 10(23), pp. 7896-7902. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0795.

Benkerroum, N. y Ismail, A. (2022) "Human Breast Milk Contamination with Aflatoxins, Impact on Children's Health, and Possible Control Means: A Review", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(24), p. 16792. doi:10.3390/ijerph192416792.

Beretta, G. L., Cassinelli, G., Pennati, M., Zuco, V. y Gatti, L. (2017) "Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, pp. 271-289. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.062.

Beyene, T. (2015) "Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health", *Journal of Veterinary Science & Technology*, 07(01), pp. 1-7. doi:10.4172/2157-7579.1000285.

Biendl, S., Häberli, C. y Keiser, J. (2022) "Discovery of novel antischistosomal scaffolds from

10. BIBLIOGRAFÍA

the open access Pandemic Response Box", *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 20(4), pp. 621-629. doi:10.1080/14787210.2022.1990042.

Bindu, S., Mazumder, S. y Bandyopadhyay, U. (2020) "Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective", *Biochemical Pharmacology*, 180(July), p. 114147. doi:10.1016/j.bcp.2020.114147.

Blazquez, A. G., Briz, O., Romero, M. R., Rosales, R., Monte, M. J., Vaquero, J., Macias, R. I. R., Cassio, D. y Marin, J. J. G. (2012) "Characterization of the Role of ABCG2 as a Bile Acid Transporter in Liver and Placenta", *Molecular Pharmacology*, 81(2), pp. 273-283. doi:10.1124/mol.111.075143.

Borghgi, B., Aurini, L., White, P. F., Mordenti, A., Lolli, F., Borghgi, R., Martignani, M. y Greggi, T. (2013) "Long-lasting beneficial effects of periradicular injection of meloxicam for treating chronic low back pain and sciatica", *Minerva Anestesiologica*, 79(4), pp. 370-378.

Borgsteede, F. H. M., Dercksen, D. D. y Huijbers, R. (2007) "Doramectin and albendazole resistance in sheep in The Netherlands", *Veterinary Parasitology*, 144(1-2), pp. 180-183. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.031.

Breedveld, P., Beijnen, J. H. y Schellens, J. H. M. (2006) "Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs", *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(1), pp. 17-24. doi:10.1016/j.tips.2005.11.009.

Breedveld, P., Pluim, D., Cipriani, G., Wielinga, P., van Tellingen, O., Schinkel, A. H. y Schellens, J. H. M. (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 Pat", *Cancer*

10. BIBLIOGRAFÍA

Research, 65(7), pp. 2577-2582. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2416.

Breedveld, P., Zelcer, N., Pluim, D., Sönmezer, O., Tibben, M. M., Beijnen, J. H., Schinkel, A. H., van Tellingen, O., Borst, P. y Schellens, J. H. M. (2004) "Mechanism of the Pharmacokinetic Interaction between Methotrexate and Benzimidazoles", *Cancer Research*, 64(16), pp. 5804-5811. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-4062.

Budsberg, S. C. (2015) "Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs.", en Gaynor, J. y Muir, W. (eds.) *Handbook of Veterinary Pain Management*. 3.^a ed. St. Louis, Missouri, pp. 142-160.

Bustamante-Rangel, M., Delgado-Zamarreño, M. M. y Rodríguez-Gonzalo, E. (2022) "Simple method for the determination of anthelmintic drugs in milk intended for human consumption using liquid chromatography–tandem mass spectrometry", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(1), pp. 322-329. doi:10.1002/jsfa.11361.

Canton, C., Canton, L., Lifschitz, A., Paula Dominguez, M., Alvarez, L., Ceballos, L., Mate, L., Lanusse, C. y Ballent, M. (2023) "Monepantel-based anthelmintic combinations to optimize parasite control in cattle", *International Journal for Parasitology*. Australian Society for Parasitology. doi:10.1016/j.ijpara.2023.02.001.

Capece, B. P. S., Navarro, M., Arcalis, T., Castells, G., Toribio, L., Perez, F., Carretero, A., Ruberte, J., Arboix, M. y Cristòfol, C. (2003) "Albendazole Sulphoxide Enantiomers in Pregnant Rats Embryo Concentrations and Developmental Toxicity", *The Veterinary Journal*, 165(3), pp. 266-275. doi:10.1016/S1090-0233(02)00158-2.

Catalano, A., Iacopetta, D., Ceramella, J., Scumaci, D., Giuzio, F., Saturnino, C., Aquaro, S., Rosano, C. y Sinicropi, M. S. (2022) "Multidrug Resistance (MDR): A Widespread Phenomenon in Pharmacological Therapies", *Molecules*, 27(3), p. 616. doi:10.3390/molecules27030616.

10. BIBLIOGRAFÍA

Ceballos, L., Canton, C., Cadenazzi, G., Larsen, K., Virkel, G., Moreno, L., Fairweather, I., Lanusse, C. y Alvarez, L. (2017) "Understanding the main route of drug entry in adult *Fasciola hepatica* : Further insights into closantel pharmacological activity", *Experimental Parasitology*, 181, pp. 23-29. doi:10.1016/j.exppara.2017.07.003.

Chang, F. W., Fan, H. C., Liu, J. M., Fan, T. P., Jing, J., Yang, C. L. y Hsu, R. J. (2017) "Estrogen Enhances the Expression of the Multidrug Transporter Gene ABCG2-Increasing Drug Resistance of Breast Cancer Cells through Estrogen Receptors", *International journal of molecular sciences*, 18(1). doi:10.3390/IJMS18010163.

Charlier, J., Thamsborg, S. M., Bartley, D. J., Skuce, P. J., Kenyon, F., Geurden, T., Hoste, H., Williams, A. R., Sotiraki, S., Höglund, J., Chartier, C., Geldhof, P., van Dijk, J., Rinaldi, L., Morgan, E. R., von Samson-Himmelstjerna, G., Vercruyse, J. y Claerebout, E. (2018) "Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs", *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, pp. 217-234. doi:10.1111/tbed.12707.

Chen, H., Weng, Z. y Xu, C. (2020) "Albendazole suppresses cell proliferation and migration and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells", *Anti-Cancer Drugs*, 31(5), pp. 431-439. doi:10.1097/CAD.0000000000000914.

Chen, J., Ying, G.-G. y Deng, W.-J. (2019) "Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(27), pp. 7569-7586. doi:10.1021/acs.jafc.9b01334.

Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L. y Li, J. (2016) "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade", *Cancer Letters*, 370(1), pp. 153-164. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.010.

10. BIBLIOGRAFÍA

Christensen, S. E., Cooper, S. A., Mack, R. J., McCallum, S. W., Du, W. y Freyer, A. (2018) "A Randomized Double-Blind Controlled Trial of Intravenous Meloxicam in the Treatment of Pain Following Dental Impaction Surgery", *The Journal of Clinical Pharmacology*, 58(5), pp. 593-605. doi:10.1002/jcph.1058.

Cleophas, M., Joosten, L., Stamp, L., Dalbeth, N., Woodward, O. y Merriman, T. (2017) "ABCG2 polymorphisms in gout: insights into disease susceptibility and treatment approaches", *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 10, pp. 129-142. doi:10.2147/PGPM.S105854.

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 research*, 15(7), pp. 936-944. doi: 10.1101/ gr.3806705.

Coles, G. C., Rhodes, A. C. y Stafford, K. A. (2000) "Activity of closantel against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*", *Veterinary Record*, 146(17), pp. 504-504. doi:10.1136/vr.146.17.504-a.

Coles, G. C. y Stafford, K. A. (2001) "Activity of oxyclozanide, nitroxylnil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*.", *The Veterinary Record*, 148(23), pp. 723-724. doi:10.1136/vr.148.23.723.

Cooper, K. M., Whelan, M., Danaher, M. y Kennedy, D. G. (2011) "Stability during cooking of anthelmintic veterinary drug residues in beef", *Food Additives and Contaminants*, 28(2), p. 155-165. doi: 10.1080/19440049.2010.542775.

Corum, O., Corum, D. D., Er, A., Yildiz, R. y Uney, K. (2018) "Pharmacokinetics and

10. BIBLIOGRAFÍA

bioavailability of tolfenamic acid in sheep", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41(March), pp. 1-7. doi:10.1111/jvp.12702.

Cromie, L., Ferry, M., Couper, A., Fields, C. y Taylor, S. M. (2006) "Pharmacokinetics of a novel closantel/ivermectin injection in cattle", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(3), pp. 205-211. doi:10.1111/j.1365-2885.2006.00738.x.

Daeseleire, E., Van Pamel, E., Van Poucke, C. y Croubels, S. (2017) "Veterinary Drug Residues in Foods", en *Chemical Contaminants and Residues in Food: Second Edition*. Woodhead Publishing, pp. 117-153. doi:10.1016/B978-0-08-100674-0.00006-0.

Dankers, A. C. A., Sweep, F. C. G. J., Pertjjs, J. C. L. M., Verweij, V., van den Heuvel, J. J. M. W., Koenderink, J. B., Russel, F. G. M. y Masereeuw, R. (2012) "Localization of breast cancer resistance protein (Bcrp) in endocrine organs and inhibition of its transport activity by steroid hormones", *Cell and Tissue Research*, 349(2), pp. 551-563. doi:10.1007/s00441-012-1417-5.

Dayan, A. D. (2003) "Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics", *Acta Tropica*, 86(2-3), pp. 141-159. doi:10.1016/S0001-706X(03)00031-7.

Dean, M., Moitra, K. y Allikmets, R. (2022) "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily", *Human Mutation*, 43(9), pp. 1162-1182. doi:10.1002/humu.24418.

Diez, R., Diez, M. J., Garcia, J. J., Rodríguez, J. M., Lopez, C., Fernandez, N., Sierra, M. y Sahagun, A. M. (2022) "Improvement of Albendazole Bioavailability with Menbutone Administration in Sheep", *Animals*, 12(4), p. 463. doi:10.3390/ani12040463.

Dik, B., Coskun, D., Bahcivan, E. y Er, A. (2019) "Doxycycline and meloxicam can treat neuroinflammation by increasing activity of antioxidant enzymes in rat brain", *Pakistan journal of*

10. BIBLIOGRAFÍA

pharmaceutical sciences, 32(1), pp. 391-396.

Do, T. M., Noel-Hudson, M.-S., Ribes, S., Besengez, C., Smirnova, M., Cisternino, S., Buyse, M., Calon, F., Chimini, G., Chacun, H., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R. y Bourasset, F. (2012) "ABCG2- and ABCG4-Mediated Efflux of Amyloid- β Peptide 1-40 at the Mouse Blood-Brain Barrier", *Journal of Alzheimer's Disease*, 30(1), pp. 155-166. doi:10.3233/JAD-2012-112189.

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", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), pp. 15665-15670. doi:10.1073/pnas.95.26.15665.

Dupuy, J., Alvinerie, M., Ménez, C. y Lespine, A. (2010) "Interaction of anthelmintic drugs with P-glycoprotein in recombinant LLC-PK1-mdr1a cells", *Chemico-Biological Interactions*, 186(3), pp. 280-286. doi:10.1016/j.cbi.2010.05.013.

Dvorožňáková, E., Hřčková, G., Borošková, Z., Velebný, S. y Dubinský, P. (2004) "Effect of treatment with free and liposomized albendazole on selected immunological parameters and cyst growth in mice infected with *Echinococcus multilocularis*", *Parasitology International*, 53(4), pp. 315-325. doi:10.1016/j.parint.2004.05.001.

Eckenstaler, R. y Benndorf, R. A. (2020) "3D structure of the transporter ABCG2—What's new?", *British Journal of Pharmacology*, 177(7), pp. 1485-1496. doi:10.1111/bph.14991.

Egido, E., Müller, R., Li-Blatter, X., Merino, G. y Seelig, A. (2015) "Predicting Activators and Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) and P-Glycoprotein (ABCB1) Based on Mechanistic Considerations", *Molecular Pharmaceutics*, 12(11), pp. 4026-4037. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00463.

10. BIBLIOGRAFÍA

El-Kattan, A. y Varm, M. (2012) "Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability", en *Topics on Drug Metabolism*. Croatia: InTech. doi:10.5772/31087.

El-Saber Batiha, G., Alqahtani, A., Ilesanmi, O. B., Saati, A. A., El-Mleeh, A., Hetta, H. F. y Magdy Beshbishy, A. (2020) "Avermectin Derivatives, Pharmacokinetics, Therapeutic and Toxic Dosages, Mechanism of Action, and Their Biological Effects", *Pharmaceuticals*, 13(8), p. 196. doi:10.3390/ph13080196.

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 Metabolism and Disposition*, 36(6), pp. 995-1002. doi:10.1124/dmd.107.019257.

Enokizono, J., Kusuhara, H. y Sugiyama, Y. (2007) "Effect of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/ Abcg2) on the Disposition of Phytoestrogens", *Molecular Pharmacology*, 72(4), pp. 967-975. doi:10.1124/mol.107.034751.

Er, A., Coskun, D., Bahcivan, E. y Dik, B. (2020) "Effect of doxycycline and meloxicam on cytokines, brain-derived neurotrophic factor, matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and cyclooxygenase-2 in brain", *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(10), pp. 1328-1334. doi:10.22038/ijbms.2020.45193.10527.

Ergen, A. M. y Yalçın, S. S. (2019) "Unexpected drug residuals in human milk in Ankara, capital of Turkey", *BMC Pregnancy and Childbirth*, 19(1), p. 348. doi:10.1186/s12884-019-2506-1.

Escribano, M., I. San Andres, M., J. de Lucas, J. y Gonzalez-Canga, A. (2012) "Ivermectin Residue Depletion in Food Producing Species and its Presence in Animal Foodstuffs With a View to Human Safety", *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6), pp. 987-998.

10. BIBLIOGRAFÍA

doi:10.2174/138920112800399121.

European Medicines Agency (1999) "Committee for Veterinary Medicinal Products. Tolfenamic acid.", *EMEA/MRL/183/97-FINAL*. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/tolfenamic-acid-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf.

European Medicines Agency (2004) "Committee of medicinal products for veterinary use - Albendazole", *EMEA/MRL/865/03-FINAL*, (June), pp. 1-4. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500009638.pdf.

European Medicines Agency (2008) "Committee for Medicinal Products for Veterinary use. European Public MRL Assessment Report (EPMAR). Clorsulon.Cattle", *EMEA/CVMP/358525/2008*. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/clorsulon-cattle-european-public-mrl-assessment-report-epmar-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf.

European Medicines Agency (2012) "European public MRL assessment report (EPMAR). Closantel (bovine and ovine milk)", *EMA/CVMP/813350/2011*. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/closantel-bovine-ovine-milk-european-public-mrl-assessment-report-epmar_en.pdf.

European Medicines Agency (2014a) "European public MRL assessment report (EPMAR). Clorsulon (bovine milk) – after the provisional maximum residue limit (MRL).", *EMA/CVMP/752339/2013*. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/clorsulon-bovine-milk-european-public-maximum-residue-limit-assessment-report-epmar-cvmp_en.pdf.

European Medicines Agency (2014b) "Opinion of the Committee for Medicinal Products for

10. BIBLIOGRAFÍA

Veterinary use on the establishment of maximum residue limits. EU/ART27/11/190/IMB", *EMA/CVMP/741367/2013-Rev.1*. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-opinion/opinion-cvmp-establishment-maximum-residue-limits-clorsulon_en-0.pdf.

European Medicines Agency (2014c) "Opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use on the establishment of maximum residue limits. EU/ART27/11/191/IMB", *EMA/CVMP/741512/2013-Rev.1*. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-opinion/opinion-cvmp-establishment-maximum-residue-limits-closantel_en-0.pdf.

European Medicines Agency (2018) "Metacam (meloxicam)", *EMA/CVMP/259397/2006 EMEA/V/C/000033*. Disponible en: www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/metacam.

Feldman, D., Leahy, E. y Lee, S. (2018) "Chemopreventive Properties of Tolfenamic Acid: A Mechanistic Review.", *Current medicinal chemistry*, 25, pp. 1598-1608. doi:10.2174/0929867324666170414155107.

Ferraroni, M., Angeli, A., Carradori, S. y Supuran, C. T. (2022) "Inhibition of Schistosoma mansoni carbonic anhydrase by the antiparasitic drug clorsulon: X-ray crystallographic and in vitro studies", *Acta Crystallographica Section D:Structural Biology*, 78(3), pp. 321-327. doi:10.1107/S2059798322000079.

Ferreira, M., Costa, J. y Reis-Henriques, M. A. (2014) "ABC transporters in fish species: a review", *Frontiers in Physiology*, 5(July), pp. 1-12. doi:10.3389/fphys.2014.00266.

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 Letters*, 235(1), pp. 84-92. doi:10.1016/j.canlet.2005.04.024.

Fissiha, W. y Kinde, M. Z. (2021) "Anthelmintic resistance and its mechanism: a review",

10. BIBLIOGRAFÍA

Infection and drug resistance, 14, pp. 5403-5410. doi:10.2147/IDR.S332378.

Fitzpatrick, C. E., Chapinal, N., Petersson-Wolfe, C. S., DeVries, T. J., Kelton, D. F., Duffield, T. F. y Leslie, K. E. (2013) "The effect of meloxicam on pain sensitivity, rumination time, and clinical signs in dairy cows with endotoxin-induced clinical mastitis", *Journal of Dairy Science*, 96(5), pp. 2847-2856. doi:10.3168/jds.2012-5855.

Fletouris, D. J., Botsoglou, N. A., Psomas, I. E. y Mantis, A. I. (1998) "Albendazole-related drug residues in milk and their fate during cheesemaking, ripening, and storage.", *Journal of Food Protection*, 61(11), pp. 1484-1488. doi:10.4315/0362-028X-61.11.1484.

Formentini, E. A., Mestorino, N. y Errecalde, J. O. (2005) "Pharmacokinetics of Ricobendazole After its Intravenous, Intraruminal and Subcutaneous Administration in Sheep", *Veterinary Research Communications*, 29(7), pp. 595-608. doi:10.1007/s11259-005-3304-y.

Gallo, P., Fabbrocino, S., Dowling, G., Salini, M., Fiori, M., Perretta, G. y Serpe, L. (2010) "Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, 1217(17), pp. 2832-2839. doi:10.1016/j.chroma.2010.02.047.

Garcia-Lino, A. M., Álvarez-Fernández, I., Blanco-Paniagua, E., Merino, G. y Álvarez, A. I. (2019) "Transporters in the Mammary Gland—Contribution to Presence of Nutrients and Drugs into Milk", *Nutrients*, 11(10), p. 2372. doi:10.3390/nu11102372.

Garcia-Lino, A. M., Garcia-Mateos, D., Alvarez-Fernandez, I., Blanco-Paniagua, E., Medina, J. M., Merino, G. y Alvarez, A. I. (2021a) "Role of eprinomectin as inhibitor of the ruminant ABCG2 transporter: Effects on plasma distribution of danofloxacin and meloxicam in sheep", *Research in Veterinary Science*, 136, pp. 478-483. doi:10.1016/j.rvsc.2021.03.026.

10. BIBLIOGRAFÍA

García-Lino, A. M., Gómez-Gómez, A., García-Mateos, D., de la Fuente, A., Álvarez, A. I., Pozo, O. J. y Merino, G. (2021b) "Analysis of the interaction between tryptophan-related compounds and ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) using targeted metabolomics", *Food Chemistry*, 344, p. 128665. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128665.

García-Mateos, D., García-Lino, A. M., Álvarez-Fernández, I., Blanco-Paniagua, E., de la Fuente, A., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2019) "Role of ABCG2 in Secretion into Milk of the Anti-Inflammatory Flunixin and Its Main Metabolite: In Vitro-In Vivo Correlation in Mice and Cows", *Drug Metabolism and Disposition*, 47(5), pp. 516-524. doi:10.1124/dmd.118.085506.

García-Mateos, D., García-Villalba, R., Marañón, J. A., Espín, J. C., Merino, G. y Álvarez, A. I. (2017) "The Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) influences the levels of enterolignans and their metabolites in plasma, milk and mammary gland", *Journal of Functional Foods*, 35, pp. 648-654. doi:10.1016/j.jff.2017.06.038.

García-Mateos, D., García-Villalba, R., Otero, J. A., Marañón, J. A., Espín, J. C., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2018) "An altered tissue distribution of flaxseed lignans and their metabolites in Abcg2 knockout mice", *Food and Function*, 9(1), pp. 636-642. doi:10.1039/c7fo01549f.

Gazzinelli-Guimaraes, P. H. y Nutman, T. B. (2018) "Helminth parasites and immune regulation", *F1000Research*, 7. doi:10.12688/F1000RESEARCH.15596.1.

George, A. M. y Jones, P. M. (2012) "Perspectives on the structure–function of ABC transporters: The Switch and Constant Contact Models", *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 109(3), pp. 95-107. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2012.06.003.

Geurden, T., Bartram, D., Van Brussel, L., Bo, L., Scott-Baird, E. y Rugg, D. (2012) "Evaluation of the comparative efficacy of a moxidectin plus triclabendazole pour-on solution against adult and

10. BIBLIOGRAFÍA

immature liver fluke, *Fasciola hepatica*, in cattle", *Veterinary Parasitology*, 189(2-4), pp. 227-232. doi:10.1016/j.vetpar.2012.04.019.

Ghafouri, H., Ghaderi, B., Amini, S., Nikkhoo, B., Abdi, M. y Hoseini, A. (2016) "Association of ABCB1 and ABCG2 single nucleotide polymorphisms with clinical findings and response to chemotherapy treatments in Kurdish patients with breast cancer", *Tumor Biology*, 37(6), pp. 7901-7906. doi:10.1007/s13277-015-4679-1.

Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L. R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. ., 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., Wah Yee, S., Zamek-Gliszczyński, M. J. y Zhang, L. (2010) "Membrane transporters in drug development", *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), pp. 215-236. doi:10.1038/nrd3028.

Gill, P., Cook, R., Boulton, J., Kelly, W., Vanselow, B. y Reddacliff, L. (1999) "Optic neuropathy and retinopathy in closantel toxicosis of sheep and goats", *Australian Veterinary Journal*, 77(4), pp. 259-261. doi:10.1111/j.1751-0813.1999.tb11718.x.

Gillet, J. P., Efferth, T. y Remacle, J. (2007) "Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes", *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1775(2), pp. 237-262. doi:10.1016/j.bbcan.2007.05.002.

Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J. y Sarkadi, B. (2004) "The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity", *Current Drug Delivery*, 1(1), pp. 27-42. doi:10.2174/1567201043480036.

Gokbulut, C. y McKellar, Q. A. (2018) "Anthelmintic drugs used in equine species", *Veterinary Parasitology*, 261, pp. 27-52. doi:10.1016/j.vetpar.2018.08.002.

10. BIBLIOGRAFÍA

Gonçalves, J., Silva, S., Gouveia, F., Bicker, J., Falcão, A., Alves, G. y Fortuna, A. (2021) "A combo-strategy to improve brain delivery of antiepileptic drugs: Focus on BCRP and intranasal administration", *International Journal of Pharmaceutics*, 593, p. 120161. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.120161.

González-Lobato, L., Real, R., Herrero, D., de la Fuente, A., Prieto, J. G., Marqués, M. M., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2014) "Novel in vitro systems for prediction of veterinary drug residues in ovine milk and dairy products", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(6), pp. 1026-1037. doi:10.1080/19440049.2014.908261.

Gordon, D. K., Zadoks, R. N., Stevenson, H., Sargison, N. D. y Skuce, P. J. (2012) "On farm evaluation of the coproantigen ELISA and coproantigen reduction test in Scottish sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*", *Veterinary Parasitology*, 187(3-4), pp. 436-444. doi:10.1016/j.vetpar.2012.02.009.

Grube, M., Reuther, S., Meyer zu Schwabedissen, H., Köck, 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 Metabolism and Disposition*, 35(1), pp. 30-35. doi:10.1124/dmd.106.011411.

Gunes, Y., Okyar, A., Krajcsi, P., Fekete, Z. y Ustuner, O. (2023) "Modulation of monepantel secretion into milk by soy isoflavones", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 46(3), pp. 185-194. doi:10.1111/jvp.13106.

Ha, T., Lou, Z., Baek, S. J. y Lee, S.-H. (2016) "Tolfenamic acid downregulates β -catenin in colon cancer", *International Immunopharmacology*, 35, pp. 287-293. doi:10.1016/j.intimp.2016.04.008.

Haile, M., Boutajangout, A., Chung, K., Chan, J., Stolper, T., Vin-, N., Batchan, M., Urso, J. D.,

10. BIBLIOGRAFÍA

Lin, Y., Kline, R., Yaghmour, F., Jahfal, S., Kamal, R., Aljohani, W., Blanck, T., Bekker, A. y Wisniewski, T. (2016) "The Cox-2 Inhibitor Meloxicam Ameliorates Neuroinflammation and Depressive Behavior in Adult Mice after Splenectomy", *Journal of Neurophysiology and Neurological Disorders*, 3(101). doi:10.17303/jnnd.2016.3.101.

Hamel, D., Bosco, A., Rinaldi, L., Cringoli, G., Kaulfuß, K.-H., Kellermann, M., Fischer, J., Wang, H., Kley, K., Mayr, S., Rauh, R., Visser, M., Wiefel, T., Fankhauser, B. y Rehbein, S. (2017) "Eprinomectin pour-on (EPRINEX® Pour-on, Merial): efficacy against gastrointestinal and pulmonary nematodes and pharmacokinetics in sheep", *BMC Veterinary Research*, 13(1), p. 148. doi:10.1186/s12917-017-1075-7.

Han, L. y Ren, Q. (2014) "Protective effect of meloxicam against acute radiation-induced brain injury in rats", *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 30(4), pp. 375-378.

Hanna, R. E. B., McMahon, C., Ellison, S., Edgar, H. W., Kajugu, P.-E., Gordon, A., Irwin, D., Barley, J. P., Malone, F. E., Brennan, G. P. y Fairweather, I. (2015) "Fasciola hepatica: A comparative survey of adult fluke resistance to triclabendazole, nitroxylinil and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology", *Veterinary Parasitology*, 207(1-2), pp. 34-43. doi:10.1016/j.vetpar.2014.11.016.

Hennessy, D. R., Sangster, N. C., Steel, J. W. y Collins, G. H. (1993) "Comparative pharmacokinetic disposition of closantel in sheep and goats", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 16(3), pp. 254-260. doi:10.1111/j.1365-2885.1993.tb00172.x.

Heredia, R., Aguilar, E., Romero, C., Bautista, L. y Mendoza, G. (2016) "Evaluation of five treatments to control intestinal parasites in sheep in Ayapango, state of Mexico", *Veterinary World*, 9(11), pp. 1233-1237. doi:10.14202/vetworld.2016.1233-1237.

10. BIBLIOGRAFÍA

van Herwaarden, A. E. y Schinkel, A. H. (2006) "The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins", *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(1), pp. 10-16. doi:10.1016/j.tips.2005.11.007.

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), pp. 123-130. doi:10.1093/carcin/bgi176.

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", *Molecular and Cellular Biology*, 27(4), pp. 1247-1253. doi:10.1128/MCB.01621-06.

Heyes, N., Kapoor, P. y Kerr, I. D. (2018) "Polymorphisms of the Multidrug Pump ABCG2: A Systematic Review of Their Effect on Protein Expression, Function, and Drug Pharmacokinetics", *Drug Metabolism and Disposition*, 46(12), pp. 1886-1899. doi:10.1124/dmd.118.083030.

Higashikuni, Y., Sainz, J., Nakamura, K., Takaoka, M., Enomoto, S., Iwata, H., Sahara, M., Tanaka, K., Koibuchi, N., Ito, S., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., Hirata, Y., Nagai, R. y Sata, M. (2010) "The ATP-Binding Cassette Transporter BCRP1/ABCG2 Plays a Pivotal Role in Cardiac Repair After Myocardial Infarction Via Modulation of Microvascular Endothelial Cell Survival and Function", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(11), pp. 2128-2135. doi:10.1161/ATVBAHA.110.211755.

Higgins, C. F. y Linton, K. J. (2004) "The ATP switch model for ABC transporters", *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10), pp. 918-926. doi:10.1038/nsmb836.

10. BIBLIOGRAFÍA

Hillgren, K. M., Keppler, D., Zur, A. A., Giacomini, K. M., Stieger, B., Cass, C. E. y Zhang, L. (2013) "Emerging Transporters of Clinical Importance: An Update From the International Transporter Consortium", *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94(1), pp. 52-63. doi:10.1038/clpt.2013.74.

Hira, D. y Terada, T. (2018) "BCRP/ABCG2 and high-alert medications: Biochemical, pharmacokinetic, pharmacogenetic, and clinical implications", *Biochemical Pharmacology*, 147, pp. 201-210. doi:10.1016/j.bcp.2017.10.004.

Hong, S.-T. (2018) "Albendazole and Praziquantel: Review and Safety Monitoring in Korea", *Infection & Chemotherapy*, 50(1), pp. 1-10. doi:10.3947/ic.2018.50.1.1.

van Hoppe, S., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H. y Schinkel, A. H. (2017) "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-gp/ABCB1) transport afatinib and restrict its oral availability and brain accumulation", *Pharmacological Research*, 120, pp. 43-50. doi:10.1016/j.phrs.2017.01.035.

Huang, L., Be, X., Tchapanian, E. H., Colletti, A. E., Roberts, J., Langley, M., Ling, Y., Wong, B. K. y Jin, L. (2012) "Deletion of Abcg2 Has Differential Effects on Excretion and Pharmacokinetics of Probe Substrates in Rats", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343(2), pp. 316-324. doi:10.1124/jpet.112.197046.

Huang, L., Li, X., Roberts, J., Janosky, B. y Lin, M.-H. J. (2015) "Differential role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in drug distribution into brain, CSF and peripheral nerve tissues in rats", *Xenobiotica*, 45(6), pp. 547-555. doi:10.3109/00498254.2014.997324.

Hurtado, M., Sankpal, U. T., Chhabra, J., Brown, D. T., Maram, R., Patel, R., Gurung, R. K., Simecka, J., Holder, A. A. y Basha, R. (2019) "Copper-tolfenamic acid: evaluation of stability and anti-cancer activity", *Investigational New Drugs*, 37(1), pp. 27-34. doi:10.1007/s10637-018-0594-9.

10. BIBLIOGRAFÍA

Hutchinson, G. W., Dawson, K., Fitzgibbon, C. C. y Martin, P. J. (2009) "Efficacy of an injectable combination anthelmintic (nitroxylin+clorsulon+ivermectin) against early immature *Fasciola hepatica* compared to triclabendazole combination flukicides given orally or topically to cattle", *Veterinary Parasitology*, 162(3-4), pp. 278-284. doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.032.

Ianiski, F. R., Alves, C. B., Ferreira, C. F., Rech, V. C., Savegnago, L., Wilhelm, E. A. y Luchese, C. (2016) "Meloxicam-loaded nanocapsules as an alternative to improve memory decline in an Alzheimer's disease model in mice: involvement of Na⁺, K⁺-ATPase", *Metabolic Brain Disease*, 31(4), pp. 793-802. doi:10.1007/s11011-016-9812-3.

Ibarra-Velarde, F., Vera-Montenegro, Y., Nájera-Fuentes, R. y Sánchez-Albarran, A. (2001) "Efficacy of combined chemotherapy against gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in cattle", *Veterinary Parasitology*, 99(3), pp. 199-204. doi:10.1016/S0304-4017(01)00460-5.

Iezzi, S., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Nejamkin, P., Lloberas, M., Manazza, J., Lanusse, C. y Imperiale, F. (2014) "Closantel plasma and milk disposition in dairy goats: Assessment of drug residues in cheese and ricotta", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 37(6), pp. 589-594. doi:10.1111/jvp.12135.

Imperiale, F. A., Busetti, M. R., Suárez, V. H. y Lanusse, C. E. (2004) "Milk Excretion of Ivermectin and Moxidectin in Dairy Sheep: Assessment of Drug Residues during Cheese Elaboration and Ripening Period", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), pp. 6205-6211. doi:10.1021/jf049117n.

Imperiale, F. y Lanusse, C. (2021) "The Pattern of Blood–Milk Exchange for Antiparasitic Drugs in Dairy Ruminants", *Animals*, 11(10), p. 2758. doi:10.3390/ani11102758.

Imperiale, F., Pis, A., Sallovitz, J., Lifschitz, A., Busetti, M., Suárez, V. y Lanusse, C. (2006)

10. BIBLIOGRAFÍA

"Pattern of eprinomectin milk excretion in dairy sheep unaffected by lactation stage: Comparative residual profiles in dairy products", *Journal of Food Protection*, 69(10), pp. 2424-2429. doi:10.4315/0362-028X-69.10.2424.

Ingold, K., Bigler, P., Thormann, W., Cavaliero, T., Gottstein, B. y Hemphill, A. (1999) "Efficacies of Albendazole Sulfoxide and Albendazole Sulfone against In Vitro-Cultivated *Echinococcus multilocularis* Metacestodes", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), pp. 1052-1061. doi:10.1128/AAC.43.5.1052.

Ito, N., Ito, K., Ikebuchi, Y., Toyoda, Y., Takada, T., Hisaka, A., Oka, A. y Suzuki, H. (2015) "Prediction of Drug Transfer into Milk Considering Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)-Mediated Transport", *Pharmaceutical Research*, 32(8), pp. 2527-2537. doi:10.1007/s11095-015-1641-2.

Jackson, S. M., Manolaridis, I., Kowal, J., Zechner, M., Taylor, N. M. I., Bause, M., Bauer, S., Bartholomaeus, R., Bernhardt, G., Koenig, B., Buschauer, A., Stahlberg, H., Altmann, K. H. y Locher, K. P. (2018) "Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2", *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(4), pp. 333-340. doi:10.1038/s41594-018-0049-1.

Jaeger, L. H. y Carvalho-Costa, F. A. (2017) "Status of benzimidazole resistance in intestinal nematode populations of livestock in Brazil: a systematic review", *BMC Veterinary Research*, 13(1), p. 358. doi:10.1186/s12917-017-1282-2.

Jaussaud, P., Guieu, D., Bellon, C., Barbier, B., Lhopital, M. C., Sechet, R., Courtot, D. y Toutain, P. L. (1992) "Pharmacokinetics of tolfenamic acid in the horse.", *Equine Veterinary Journal*, (S11), pp. 69-72. doi:10.1111/j.2042-3306.1992.tb04778.x.

Jette, L., Beaulieu, E., Leclerc, J. M. y Béliveau, R. (1996) "Cyclosporin a treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues", *American Journal of Physiology-*

10. BIBLIOGRAFÍA

Renal Physiology, 270(5), pp. F756-F765. doi:10.1152/ajprenal.1996.270.5.f756.

Jonker, J. W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., van der Valk, M. A., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Plösch, T., Kuipers, F., Oude Elferink, R. P. J., Rosing, H., Beijnen, J. H. y Schinkel, A. H. (2002) "The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyrin", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), pp. 15649-15654. doi:10.1073/pnas.202607599.

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.", *Nature Medicine*, 11(2), pp. 127-129. doi:10.1038/nm1186.

Jonker, J. W., Smit, J. W., Brinkhuis, R. F., Maliepaard, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M. y Schinkel, A. H. (2000) "Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan", *Journal of the National Cancer Institute*, 92(20), pp. 1651-1656. doi:10.1093/jnci/92.20.1651.

Junco, M., Iglesias, L. E., Sagués, M. F., Guerrero, I., Zegbi, S. y Saumell, C. A. (2021) "Effect of macrocyclic lactones on nontarget coprophilic organisms: a review", *Parasitology Research*, 120(3), pp. 773-783. doi:10.1007/s00436-021-07064-4.

Kaehler, M., Ruemenapp, J., Gonnermann, D., Nagel, I., Bruhn, O., Haenisch, S., Ammerpohl, O., Wesch, D., Cascorbi, I. y Bruckmueller, H. (2017) "MicroRNA-212/ABCG2-axis contributes to development of imatinib-resistance in leukemic cells", *Oncotarget*, 8(54), pp. 92018-92031. doi:10.18632/oncotarget.21272.

Kapoor, P., Horsey, A. J., Cox, M. H. y Kerr, I. D. (2018) "ABCG2: Does resolving its structure

10. BIBLIOGRAFÍA

elucidate the mechanism?", *Biochemical Society Transactions*, 46(6), pp. 1485-1494. doi:10.1042/BST20180145.

Karliik, W., Chłopecka, M., Bamburowicz-Klimkowska, M. y Mendel, M. (2019) "Modulations of bovine hepatic microsomal metabolism of benzimidazoles by secondary plant metabolites", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42(2), pp. 222-229. doi:10.1111/jvp.12727.

Kartha, S., Weisshaar, C. L., Philips, B. H. y Winkelstein, B. A. (2018) "Pre-treatment with Meloxicam Prevents the Spinal Inflammation and Oxidative Stress in DRG Neurons that Accompany Painful Cervical Radiculopathy", *Neuroscience*, 388, pp. 393-404. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.07.054.

Keiser, J. y Utzinger, J. (2009) "Food-borne trematodiasis", *Clinical microbiology reviews*, 22(3), pp. 466-483. doi:10.1128/CMR.00012-09.

Kellerová, P., Matoušková, P., Lamka, J., Vokřál, I., Szotáková, B., Zajíčková, M., Pasák, M. y Skálová, L. (2019) "Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in *Haemonchus contortus* female and male adults", *Veterinary Parasitology*, 273(July), pp. 24-31. doi:10.1016/j.vetpar.2019.07.006.

Kellerová, P., Raisová Stuchlíková, L., Matoušková, P., Štěrbová, K., Lamka, J., Navrátilová, M., Vokřál, I., Szotáková, B. y Skálová, L. (2020) "Sub-lethal doses of albendazole induce drug metabolizing enzymes and increase albendazole deactivation in *Haemonchus contortus* adults", *Veterinary Research*, 51(1), p. 94. doi:10.1186/s13567-020-00820-x.

Khalil, N. Y. y Aldosari, K. F. (2020) "Meloxicam", en *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*. Academic Press, pp. 159-197. doi:10.1016/bs.podrm.2019.10.006.

Khalili, M. R. y Zareei, A. (2021) "Case report: restored vision after ocular Closantel intoxication

10. BIBLIOGRAFÍA

and blindness", *BMC Ophthalmology*, 21(1), p. 158. doi:10.1186/s12886-021-01916-4.

Khunweeraphong, N., Stockner, T. y Kuchler, K. (2017) "The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion.", *Scientific reports*, 7(1), p. 13767. doi:10.1038/s41598-017-11794-w.

Khunweeraphong, N., Szöllösi, D., Stockner, T. y Kuchler, K. (2019) "The ABCG2 multidrug transporter is a pump gated by a valve and an extracellular lid", *Nature Communications*, 10(1), p. 5433. doi:10.1038/s41467-019-13302-2.

Kim, H.-J., Cho, S.-D., Kim, J., Kim, S.-J., Choi, C., Kim, J.-S., Nam, J.-S., Han Kwon, K., Kang, K.-S. y Jung, J.-Y. (2013) "Apoptotic effect of tolfenamic acid on MDA-MB-231 breast cancer cells and xenograft tumors", *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 53(1), pp. 21-26. doi:10.3164/jcbrn.12-78.

Knopp, S., Mohammed, K. A., Speich, B., Hattendorf, J., Khamis, I. S., Khamis, A. N., Stothard, J. R., Rollinson, D., Marti, H. y Utzinger, J. (2010) "Albendazole and Mebendazole Administered Alone or in Combination with Ivermectin against *Trichuris trichiura* : A Randomized Controlled Trial", *Clinical Infectious Diseases*, 51(12), pp. 1420-1428. doi:10.1086/657310.

Kodaira, H., Kusuhara, H., Ushiki, J., Fuse, E. y Sugiyama, Y. (2010) "Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(3), pp. 788-796. doi:10.1124/jpet.109.162321.

Koo, D.-H., Ryu, M.-H., Ryoo, B.-Y., Beck, M. Y., Na, Y.-S., Shin, J.-G., Lee, S. S., Kim, E.-Y. y Kang, Y.-K. (2015) "Association of ABCG2 polymorphism with clinical efficacy of imatinib in patients with gastrointestinal stromal tumor", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75(1), pp. 173-182.

10. BIBLIOGRAFÍA

doi:10.1007/s00280-014-2630-6.

Kort, A., Durmus, S., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H. y Schinkel, A. H. (2015) "Brain and Testis Accumulation of Regorafenib is Restricted by Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1)", *Pharmaceutical Research*, 32(7), pp. 2205-2216. doi:10.1007/s11095-014-1609-7.

Kovacsics, D., Brózik, A., Tihanyi, B., Matula, Z., Borsy, A., Mészáros, N., Szabó, E., Németh, E., Fóthi, Á., Zámbo, B., Szüts, D., Várady, G., Orbán, T. I., Apáti, Á. y Sarkadi, B. (2020) "Precision-engineered reporter cell lines reveal ABCG2 regulation in live lung cancer cells", *Biochemical Pharmacology*, 175, p. 113865. doi:10.1016/j.bcp.2020.113865.

Kowal, J., Ni, D., Jackson, S. M., Manolaridis, I., Stahlberg, H. y Locher, K. P. (2021) "Structural Basis of Drug Recognition by the Multidrug Transporter ABCG2", *Journal of Molecular Biology*, 433(13), p. 166980. doi:10.1016/j.jmb.2021.166980.

Kowalski, M. L. y Makowska, J. S. (2015) "Seven Steps to the Diagnosis of NSAIDs Hypersensitivity: How to Apply a New Classification in Real Practice?", *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 7(4), p. 312. doi:10.4168/aaair.2015.7.4.312.

Krolewiecki, A., Enbiale, W., Gandasegui, J., van Lieshout, L., Kepha, S., Messa Junior, A., Bengtson, M., Gelaye, W., Escola, V., Martinez-Valladares, M., Cambra-Pellejà, M., Algorta, J., Martí-Soler, H., Fleitas, P., Ballester, M. R., Doyle, S. R., Williams, N. A., Legarda, A., Mandomando, I., Mwandawiro, C. y Muñoz, J. (2022) "An adaptive phase II/III safety and efficacy randomized controlled trial of single day or three-day fixed-dose albendazole-ivermectin co-formulation versus albendazole for the treatment of *Trichuris trichiura* and other STH infections. ALIVE trial protocol", *Gates Open Research*, 6(May), p. 62. doi:10.12688/gatesopenres.13615.1.

10. BIBLIOGRAFÍA

Kruijtzter, C. M. F., Beijnen, J. H., Rosing, H., ten Bokkel Huinink, W. W., Schot, M., Jewell, R. C., Paul, E. M. y Schellens, J. H. M. (2002) "Increased Oral Bioavailability of Topotecan in Combination With the Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Inhibitor GF120918", *Journal of Clinical Oncology*, 20(13), pp. 2943-2950. doi:10.1200/JCO.2002.12.116.

Kukal, S., Guin, D., Rawat, C., Bora, S., Mishra, M. K., Sharma, P., Paul, P. R., Kanojia, N., Grewal, G. K., Kukreti, S., Saso, L. y Kukreti, R. (2021) "Multidrug efflux transporter ABCG2: expression and regulation", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, pp. 6887-6939. doi:10.1007/s00018-021-03901-y.

Kumkate, S., Chunchob, S. y Janvilisri, T. (2008) "Expression of ATP-binding cassette multidrug transporters in the giant liver fluke *Fasciola gigantica* and their possible involvement in the transport of bile salts and anthelmintics", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 317(1-2), pp. 77-84. doi:10.1007/s11010-008-9833-2.

Lagas, J. S., van der Kruijssen, C. M. M., van de Wetering, K., Beijnen, J. H. y Schinkel, A. H. (2009) "Transport of Diclofenac by Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) and Stimulation of Multidrug Resistance Protein 2 (ABCC2)-Mediated Drug Transport by Diclofenac and Benzbromarone", *Drug Metabolism and Disposition*, 37(1), pp. 129-136. doi:10.1124/dmd.108.023200.

Lagas, J. S., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H. y Schinkel, A. H. (2010a) "Hepatic Clearance of Reactive Glucuronide Metabolites of Diclofenac in the Mouse Is Dependent on Multiple ATP-Binding Cassette Efflux Transporters", *Molecular Pharmacology*, 77(4), pp. 687-694. doi:10.1124/mol.109.062364.

Lagas, J. S., van Waterschoot, R. A. B., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H. y Schinkel, A. H. (2010b) "Breast Cancer Resistance Protein and P-glycoprotein Limit Sorafenib Brain

10. BIBLIOGRAFÍA

Accumulation", *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(2), pp. 319-326. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0663.

Lanusse, C., Canton, C., Virkel, G., Alvarez, L., Costa-Junior, L. y Lifschitz, A. (2018) "Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants", *Trends in Parasitology*, 34(8), pp. 664-682. doi:10.1016/j.pt.2018.05.005.

Lapeyre-Mestre, M., Grolleau, S. y Montastruc, J.-L. (2013) "Adverse drug reactions associated with the use of NSAIDs: a case/noncase analysis of spontaneous reports from the French pharmacovigilance database 2002-2006", *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 27(2), pp. 223-230. doi:10.1111/j.1472-8206.2011.00991.x.

László, L., Sarkadi, B. y Hegedűs, T. (2016) "Jump into a New Fold—A Homology Based Model for the ABCG2/BCRP Multidrug Transporter", *PLOS ONE*, 11(10), p. e0164426. doi:10.1371/journal.pone.0164426.

Leary, E. O., Gasior, S. y McElnea, E. (2023) "Closantel toxicity", *BMJ Case Reports*, 16(2), p. e249626. doi:10.1136/bcr-2022-249626.

Lees, P. (2018) "Analgesic, antiinflammatory, antipyretic drugs", en Riviere, J. E. y Papich, M. G. (eds.) *Veterinary Pharmacology & Therapeutics*. 10.^a ed. Hoboken NJ: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 467-500.

Leprohon, P., Légaré, D. y Ouellette, M. (2011) "ABC transporters involved in drug resistance in human parasites", *Essays in Biochemistry*, 50, pp. 121-144. doi:10.1042/bse0500121.

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", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(1), pp. 84-94. doi:10.1016/j.ejps.2006.10.004.

10. BIBLIOGRAFÍA

Lewinson, O., Orelle, C. y Seeger, M. A. (2020) "Structures of ABC transporters: handle with care", *FEBS Letters*, 594(23), pp. 3799-3814. doi:10.1002/1873-3468.13966.

Li, W., Sparidans, R. W., Martins, M. L. F., El-Lari, M., Lebre, M. C., van Tellingen, O., Beijnen, J. H. y Schinkel, A. H. (2021) "ABCB1 and ABCG2 Restrict Brain and Testis Accumulation and, Alongside CYP3A, Limit Oral Availability of the Novel TRK Inhibitor Selitrectinib", *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(6), pp. 1173-1182. doi:10.1158/1535-7163.MCT-20-0705.

Li, X., Ou, X., Luo, G., Ou, X., Xie, Y., Ying, M., Qu, W., Zuo, H., Qi, X., Wang, Y., Liu, Z. y Zhu, L. (2020) "Mdr1a, Bcrp and Mrp2 regulate the efficacy and toxicity of mesaconitine and hyaconitine by altering their tissue accumulation and in vivo residence", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 409, p. 115332. doi:10.1016/j.taap.2020.115332.

Li, Y., Qi, X. M., Xue, X., Wu, X.-F., Wu, Y.-F., Chen, M., Xing, G. Z., Luan, Y. y Ren, J. (2009) "The relationship between diphenylamine structure and NSAIDs-induced hepatocytes injury", *Toxicology Letters*, 186(2), pp. 111-114. doi:10.1016/j.toxlet.2009.01.005.

Liao, M., Chuang, B.-C., Zhu, Q., Li, Y., Guan, E., Yu, S., Yang, J., Prakash, S. y Xia, C. Q. (2018) "Preclinical absorption, distribution, metabolism, excretion and pharmacokinetics of a novel selective inhibitor of breast cancer resistance protein (BCRP)", *Xenobiotica*, 48(5), pp. 467-477. doi:10.1080/00498254.2017.1328147.

Lifschitz, A., Lanusse, C. y Alvarez, L. (2017) "Host pharmacokinetics and drug accumulation of anthelmintics within target helminth parasites of ruminants", *New Zealand Veterinary Journal*, 65(4), pp. 176-184. doi:10.1080/00480169.2017.1317222.

Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J. y Lanusse, C. (2009) "Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: In vitro and in vivo characterisation of their pharmacological

10. BIBLIOGRAFÍA

interaction", *Veterinary Journal*. Elsevier Ltd, 182(2), pp. 261-268. doi:10.1016/j.tvjl.2008.06.001.

Liguoro, M. De, Longo, F., Brambilla, G., Cinquina, A., Bocca, A. y Lucisano, A. (1996) "Distribution of the anthelmintic drug albendazole and its major metabolites in ovine milk and milk products after a single oral dose", *Journal of Dairy Research*, 63(4), pp. 533-542. doi:10.1017/s0022029900032076.

Lin, Y., Yao, Y., Liu, S., Wang, L., Moorthy, B., Xiong, D., Cheng, T., Ding, X. y Gu, J. (2012) "Role of mammary epithelial and stromal P450 enzymes in the clearance and metabolic activation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in mice", *Toxicology Letters*, 212(2), pp. 97-105. doi:10.1016/j.toxlet.2012.05.005.

Lindner, S., Halwachs, S., Wassermann, L. y Honscha, W. (2013) "Expression and subcellular localization of efflux transporter ABCG2/BCRP in important tissue barriers of lactating dairy cows, sheep and goats", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(6), pp. 562-570. doi:10.1111/jvp.12045.

Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D. y Bates, S. E. (2001) "From MDR to MXR: New understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(7), pp. 931-959. doi:10.1007/PL00000912.

Liu, H., Sun, H., Zhang, B., Liu, S., Deng, S., Weng, Z., Zuo, B., Yang, J. y He, Y. (2020) "18F-FDG PET imaging for monitoring the early anti-tumor effect of albendazole on triple-negative breast cancer", *Breast Cancer*, 27(3), pp. 372-380. doi:10.1007/s12282-019-01027-5.

Liu, X. (2019) "Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity.", en Liu, X. y Pan, G. (eds.) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1 st ed. Singapore, pp. 13-100.

Low, S.-K., Fukunaga, K., Takahashi, A., Matsuda, K., Hongo, F., Nakanishi, H., Kitamura, H.,

10. BIBLIOGRAFÍA

Inoue, T., Kato, Y., Tomita, Y., Fukasawa, S., Tanaka, T., Nishimura, K., Uemura, H., Hara, I., Fujisawa, M., Matsuyama, H., Hashine, K., Tatsugami, K., Enokida, H., Kubo, M., Miki, T. y Mushiroda, T. (2016) "Association Study of a Functional Variant on ABCG2 Gene with Sunitinib-Induced Severe Adverse Drug Reaction", *PLOS ONE*, 11(2), p. e0148177. doi:10.1371/journal.pone.0148177.

Loyacano, A. F., Skogerboe, T. L., Williams, J. C., DeRosa, A. A., Gurie, J. A. y Shostrom, V. K. (2001) "Effects of parenteral administration of doramectin or a combination of ivermectin and clorsulon on control of gastrointestinal, nematode and liver fluke infections and on growth performance in cattle", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(9), pp. 1465-1468. doi:10.2460/javma.2001.218.1465.

Luciano, V., Proschak, E., Langer, J. D., Knapp, S., Heering, J. y Marschalek, R. (2021) "Closantel is an allosteric inhibitor of human Taspase1", *iScience*, 24(12), p. 103524. doi:10.1016/j.isci.2021.103524.

van der Lugt, J. J. y Venter, I. (2007) "Myelin Vacuolation, Optic Neuropathy and Retinal Degeneration after Closantel Overdosage in Sheep and in a Goat", *Journal of Comparative Pathology*, 136(2-3), pp. 87-95. doi:10.1016/j.jcpa.2006.11.007.

ben Maamar, M., Lesné, L., Hennig, K., Desdoits-Lethimonier, C., Kilcoyne, K. R., Coiffec, I., Rolland, A. D., Chevrier, C., Kristensen, D. M., Lavoué, V., Antignac, J. P., Le Bizec, B., Dejuqc-Rainsford, N., Mitchell, R. T., Mazaud-Guittot, S. y Jégou, B. (2017) "Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development", *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1-15. doi:10.1038/srep44184.

Mahnke, H., Ballent, M., Baumann, S., Imperiale, F., von Bergen, M., Lanusse, C., Lifschitz, A. L., Honscha, W. y Halwachs, S. (2016) "The ABCG2 efflux transporter in the mammary gland mediates veterinary drug secretion across the blood-milk barrier into milk of dairy cows", *Drug Metabolism and*

10. BIBLIOGRAFÍA

Disposition, 44(5), pp. 700-708. doi:10.1124/dmd.115.068940.

Malfará, B. N., Benzi, J. R. de L., de Oliveira Filgueira, G. C., Zanelli, C. F., Duarte, G., de Carvalho Cavalli, R. y de Moraes, N. V. (2019) "ABCG2 c.421C>A polymorphism alters nifedipine transport to breast milk in hypertensive breastfeeding women", *Reproductive Toxicology*, 85, pp. 1-5. doi:10.1016/j.reprotox.2019.01.007.

Manoharan, S., Guillemin, G. J., Abiramasundari, R. S., Essa, M. M., Akbar, M. y Akbar, M. D. (2016) "The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, pp. 1-15. doi:10.1155/2016/8590578.

Manolaridis, I., Jackson, S. M., Taylor, N. M. I., Kowal, J., Stahlberg, H. y Locher, K. P. (2018) "Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states", *Nature*, 563(7731), pp. 426-430. doi:10.1038/s41586-018-0680-3.

Mao, Q. (2008) "BCRP/ABCG2 in the placenta: Expression, function and regulation", *Pharmaceutical Research*, 25(6), pp. 1244-1255. doi:10.1007/s11095-008-9537-z.

Mao, Q. y Unadkat, J. D. (2015) "Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update", *The AAPS Journal*, 17(1), pp. 65-82. doi:10.1208/s12248-014-9668-6.

Marquez, B. y Van Bambeke, F. (2011) "ABC Multidrug Transporters: Target for Modulation of Drug Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions", *Current Drug Targets*, 12(5), pp. 600-620. doi:10.2174/138945011795378504.

Martínez-Valladares, M., Cordero-Pérez, C. y Rojo-Vázquez, F. A. (2014) "Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon", *Experimental Parasitology*, 136(1), pp. 59-62. doi:10.1016/j.exppara.2013.10.010.

10. BIBLIOGRAFÍA

Mas-Coma, S., Bargues, M. D. y Valero, M. A. (2018) "Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures", *Parasitology*, 145(13), pp. 1665-1699. doi:10.1017/S0031182018000914.

Mas-Coma, S., Valero, M. A. y Bargues, M. D. (2019) "Chapter 4. Fascioliasis", en Toledo, R. y Fried, B. (eds.) *Digenetic Trematodes*. 2nd ed, pp. 71-103. doi:10.1007/978-3-030-18616-6_4.

Matamoros, G., Sánchez, A., Gabrie, J. A., Juárez, M., Ceballos, L., Escalada, A., Rodríguez, C., Martí-Soler, H., Rueda, M. M., Canales, M., Lanusse, C., Cajal, P., Álvarez, L., Cimino, R. O. y Krolewiecki, A. (2021) "Efficacy and Safety of Albendazole and High-Dose Ivermectin Coadministration in School-Aged Children Infected With *Trichuris trichiura* in Honduras: A Randomized Controlled Trial", *Clinical Infectious Diseases*, 73(7), pp. 1203-1210. doi:10.1093/cid/ciab365.

Maté, L., Ballent, M., Cantón, C., Ceballos, L., Lifschitz, A., Lanusse, C., Alvarez, L. y Liron, J. P. (2018) "Assessment of P-glycoprotein gene expression in adult stage of *Haemonchus contortus* in vivo exposed to ivermectin", *Veterinary Parasitology*, 264, pp. 1-7. doi:10.1016/j.vetpar.2018.10.011.

Mazaud-Guittot, S., Nicolaz, C. N., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Maamar, M. B., Balaguer, P., Kristensen, D. M., Chevrier, C., Lavoué, V., Poulain, P., Dejuçq-Rainsford, N. y Jégou, B. (2013) "Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent.", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(11), pp. 1757-1767. doi:10.1210/jc.2013-2531.

McKellar, Q. A., Lees, P. y Gettinby, G. (1994) "Pharmacodynamics of tolfenamic acid in dogs. Evaluation of dose response relationships", *European Journal of Pharmacology*, 253(3), pp. 191-200. doi:10.1016/0014-2999(94)90191-0.

Mealey, K. L. (2012) "ABCG2 transporter: therapeutic and physiologic implications in veterinary

10. BIBLIOGRAFÍA

species", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(2), pp. 105-112. doi:10.1111/j.1365-2885.2011.01313.x.

Mealey, K. L. (2013) "Adverse Drug Reactions in Veterinary Patients Associated with Drug Transporters", *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(5), pp. 1067-1078. doi:10.1016/j.cvsm.2013.04.004.

Meaney, M., Fairweather, I., Brennan, G. P. y Forbes, A. B. (2004) "Transmission electron microscope study of the ultrastructural changes induced in the tegument and gut of *Fasciola hepatica* following in vivo drug treatment with clorsulon", *Parasitology Research*, 92, pp. 232-241. doi:10.1007/s00436-003-1036-x.

Meaney, M., Fairweather, I., Brennan, G. P., McDowell, L. S. L. y Forbes, A. B. (2003) "*Fasciola hepatica*: effects of the fasciolicide clorsulon in vitro and in vivo on the tegumental surface, and a comparison of the effects on young- and old-mature flukes", *Parasitology Research*, 91, pp. 238-250. doi:10.1007/s00436-003-0863-0.

Meaney, M., Haughey, S., Brennan, G. P. y Fairweather, I. (2005) "Ultrastructural observations on oral ingestion and trans-tegumental uptake of clorsulon by the liver fluke, *Fasciola hepatica*", *Parasitology Research*, 95, pp. 201-212. doi:10.1007/s00436-004-1272-8.

Merino, G., Alvarez, A. I., Prieto, J. G. y Kim, R. B. (2002) "The Anthelmintic Agent Albendazole Does Not Interact with P-Glycoprotein", *Drug Metabolism and Disposition*, 30(4), pp. 365-369. doi:10.1124/dmd.30.4.365.

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 metabolism and disposition*, 34(4), pp. 690-

10. BIBLIOGRAFÍA

695. doi:10.1124/dmd.105.008219.

Merino, G., van Herwaarden, A. E., Wagenaar, E., Jonker, J. W. y Schinkel, A. H. (2005a) "Sex-Dependent Expression and Activity of the ATP-Binding Cassette Transporter Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Liver", *Molecular Pharmacology*, 67(5), pp. 1765-1771. doi:10.1124/mol.105.011080.

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.", *Molecular pharmacology*, 67(5), pp. 1758-1764. doi:10.1124/mol.104.010439.

Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., Pulido, M. M., Molina, A. J., Alvarez, A. I. y Schinkel, A. H. (2005c) "Transport of Anthelmintic Benzimidazole drugs by Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)", *Drug Metabolism and Disposition*, 33, pp. 614-618. doi:10.1124/dmd.104.003319.

Merino, G., Molina, A. J., García, J. L., Pulido, M. M., Prieto, J. G. y Álvarez, A. I. (2003) "Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: Pharmacokinetic effects of inhibitors", *International Journal of Pharmaceutics*, 263(1-2), pp. 123-132. doi:10.1016/S0378-5173(03)00369-7.

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.", *Pharmaceutical Research*, 27(10), pp. 2098-2105. doi:10.1007/s11095-010-0208-5.

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.",

10. BIBLIOGRAFÍA

Drug metabolism and disposition, 37(1), pp. 5-9. doi:10.1124/dmd.108.022715.

Michiels, M., Meuldermans, W. y Heykants, J. (1987) "The Metabolism and Fate of Closantel (Flukiver) in Sheep and Cattle", *Drug Metabolism Reviews*, 18(2-3), pp. 235-251. doi:10.3109/03602538708998307.

Miguel, V., Otero, J. A., García-Villalba, R., Tomás-Barberán, F., Espín, J. C., Merino, G. y Álvarez, A. I. (2014) "Role of ABCG2 in Transport of the Mammalian Lignan Enterolactone and its Secretion into Milk in Abcg2 Knockout Mice", *Drug Metabolism and Disposition*, 42(5), pp. 943-946. doi:10.1124/dmd.113.055970.

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 Research*, 59(1), pp. 8-13. Disponible en: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/59/1/8/505070/Molecular-Cloning-of-cDNAs-Which-Are-Highly>

Miyamoto, A., Aoyama, T. y Matsumoto, Y. (2017) "The measurement of meloxicam and meloxicam metabolites in rat plasma using a high-performance liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry method", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 65(2), pp. 121-126. doi:10.1248/cpb.c16-00514.

Miyata, H., Takada, T., Toyoda, Y., Matsuo, H., Ichida, K. y Suzuki, H. (2016) "Identification of Febuxostat as a New Strong ABCG2 Inhibitor: Potential Applications and Risks in Clinical Situations", *Frontiers in Pharmacology*, 7. doi:10.3389/fphar.2016.00518.

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-

10. BIBLIOGRAFÍA

pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) knockout mice.", *Drug metabolism and disposition*, 32(9), pp. 898-901. Disponible en: <https://dmd.aspetjournals.org/content/32/9/898.long>

Mizuno, N., Takahashi, T., Kushihara, H., Schuetz, J. D., Niwa, T. y Sugiyama, Y. (2007) "Evaluation of the Role of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ ABCG2) and Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (MRP4/ ABCC4) in The Urinary Excretion of Sulfate and Glucuronide Metabolites of Edaravone (MCI-186; 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-o", *Drug Metabolism and Disposition*, 35(11), pp. 2045-2052. doi:10.1124/dmd.107.016352.

Mo, W. y Zhang, J. T. (2012) "Human ABCG2: Structure, function, and its role in multidrug resistance", *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(1), pp. 1-27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3325772/>.

Mofid, L. S., Casapía, M., Montresor, A., Rahme, E., Marquis, G. S., Vercruyssen, J., Allen, L. H., Blouin, B., Razuri, H., Pezo, L. y Gyorkos, T. W. (2021) "Maternal postpartum deworming and infant milk intake: Secondary outcomes from a trial", *Maternal and Child Nutrition*, 14(7), p. e13183. doi:10.1111/mcn.13183.

Monteiro, B. y Steagall, P. V. (2019) "Antiinflammatory Drugs", *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 49(6), pp. 993-1011. doi:10.1016/j.cvsm.2019.07.009.

Moreno, L., Imperiale, F., Mottier, L., Alvarez, L. y Lanusse, C. (2005) "Comparison of milk residue profiles after oral and subcutaneous administration of benzimidazole anthelmintics to dairy cows", *Analytica Chimica Acta*, 536(1-2), pp. 91-99. doi:10.1016/j.aca.2004.12.069.

Moser, W., Schindler, C. y Keiser, J. (2019) "Drug Combinations Against Soil-Transmitted Helminth Infections", en *Advances in Parasitology*, pp. 91-115. doi:10.1016/bs.apar.2018.08.002.

10. BIBLIOGRAFÍA

Movahedi, F., Li, L., Gu, W. y Xu, Z. P. (2017) "Nanoformulations of albendazole as effective anticancer and antiparasite agents", *Nanomedicine*, 12(20), pp. 2555-2574. doi:10.2217/nnm-2017-0102.

Muenster, U., Grieshop, B., Ickenroth, K. y Gnoth, M. J. (2008) "Characterization of Substrates and Inhibitors for the In Vitro Assessment of Bcrp Mediated Drug–Drug Interactions", *Pharmaceutical Research*, 25(10), pp. 2320-2326. doi:10.1007/s11095-008-9632-1.

Müller, F. y Fromm, M. F. (2011) "Transporter-mediated drug–drug interactions", *Pharmacogenomics*, 12(7), pp. 1017-1037. doi:10.2217/pgs.11.44.

Myers, M. J., Howard, K. D. y Kawalek, J. C. (2020) "Pharmacokinetic comparison of six anthelmintics in sheep, goats, and cattle", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 44(1), pp. 58-67. doi:10.1111/jvp.12897.

Nadanaciva, S., Aleo, M. D., Strock, C. J., Stedman, D. B., Wang, H. y Will, Y. (2013) "Toxicity assessments of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in isolated mitochondria, rat hepatocytes, and zebrafish show good concordance across chemical classes", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(2), pp. 272-280. doi:10.1016/j.taap.2013.06.019.

Nagy, E., Vajda, E., Vari, C., Sipka, S., Fárr, A.-M. y Horváth, E. (2017) "Meloxicam ameliorates the cartilage and subchondral bone deterioration in monoiodoacetate-induced rat osteoarthritis", *PeerJ*, 5, p. e3185. doi:10.7717/peerj.3185.

Nagy, T., Tóth, Á., Telbisz, Á., Sarkadi, B., Tordai, H., Tordai, A. y Hegedűs, T. (2021) "The transport pathway in the ABCG2 protein and its regulation revealed by molecular dynamics simulations", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, pp. 2329-2339. doi:10.1007/s00018-020-03651-3.

Neodo, A., Schulz, J. D., Huwyler, J. y Keiser, J. (2019) "In Vitro and In Vivo Drug-Drug

10. BIBLIOGRAFÍA

Interaction Study of the Effects of Ivermectin and Oxantel Pamoate on Tribendimidine", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(1), pp. e00762-18. doi:10.1128/AAC.00762-18.

Ni, Z., Bikadi, Z., Rosenberg, M. F. y Mao, Q. (2010) "Structure and Function of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)", *Current Drug Metabolism*, 11(7), pp. 603-617. doi:10.2174/138920010792927325.

Novobilský, A., Amaya Solis, N., Skarin, M. y Höglund, J. (2016) "Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test", *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(3), pp. 141-147. doi:10.1016/j.ijpddr.2016.06.004.

Novobilský, A. y Höglund, J. (2015) "First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle", *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3), pp. 172-177. doi:10.1016/j.ijpddr.2015.07.003.

Oliveira, C. C., Costa, D. F. L., Limeira, C. H., Nogueira, D. B., Nascimento, B. H. R. y Vaz, A. F. M. (2022) "Anthelmintic intoxication in goats and sheep: A systematic review", *Research in Veterinary Science*, 152, pp. 657-662. doi:10.1016/j.rvsc.2022.09.038.

Oostendorp, R. L., Buckle, T., Beijnen, J. H., van Tellingen, O. y Schellens, J. H. M. (2009) "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", *Investigational New Drugs*, 27(1), pp. 31-40. doi:10.1007/s10637-008-9138-z.

Ortiz, M. I., Castañeda-Hernández, G. y Granados-Soto, V. (2005) "Pharmacological evidence for the activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by meloxicam in the formalin test", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(4), pp. 725-731. doi:10.1016/j.pbb.2005.05.008.

10. BIBLIOGRAFÍA

Otero, J. A., Barrera, B., de la Fuente, A., Prieto, J. G., Marqués, M., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2015) "Short communication: The gain-of-function Y581S polymorphism of the ABCG2 transporter increases secretion into milk of danofloxacin at the therapeutic dose for mastitis treatment", *Journal of Dairy Science*, 98(1), pp. 312-317. doi:10.3168/jds.2014-8288.

Otero, J. A., García-Mateos, D., Alvarez-Fernández, I., García-Villalba, R., Espín, J. C., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2018) "Flaxseed-enriched diets change milk concentration of the antimicrobial danofloxacin in sheep.", *BMC Veterinary Research*, 14(1), p. 14. doi:10.1186/s12917-018-1341-3.

Otero, J. A., García-Mateos, D., de la Fuente, A., Prieto, J. G., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2016a) "Effect of bovine ABCG2 Y581S polymorphism on concentrations in milk of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin", *Journal of Dairy Science*, 99(7), pp. 5731-5738. doi:10.3168/jds.2015-10593.

Otero, J. A., Miguel, V., González-Lobato, L., García-Villalba, R., Espín, J. C., Prieto, J. G., Merino, G. y Álvarez, A. I. (2016b) "Effect of bovine ABCG2 polymorphism Y581S SNP on secretion into milk of enterolactone, riboflavin and uric acid", *Animal*, 10(2), pp. 238-247. doi:10.1017/S1751731115002141.

Otero, J. A., Real, R., de la Fuente, Á., Prieto, J. G., Marqués, M., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2013) "The Bovine ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2 Tyr581Ser Single-Nucleotide Polymorphism Increases Milk Secretion of the Fluoroquinolone Danofloxacin", *Drug Metabolism and Disposition*, 41(3), pp. 546-549. doi:10.1124/dmd.112.049056.

Ozdemir Kutahya, Z., Kandir, S., Eser Faki, H., Uney, K., Tras, B., Celik, M. y Torun, O. (2023) "Pharmacokinetics and pharmacokinetic interactions of orally administered oxfendazole and oxclozanide tablet formulation to sheep", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 46(1),

10. BIBLIOGRAFÍA

pp. 34-41. doi:10.1111/jvp.13096.

Patel, S. D., Sadariya, K. A., Gothi, A. K., Patel, U. D., Gohil, P. A., Jain, M. R., Bhavsar, S. K. y Thaker, A. M. (2011) "Effect of moxifloxacin administration on pharmacokinetics of tolfenamic acid in rats.", *Brazilian archives of biology and technology*, 54(4), pp. 739-744. doi:10.1590/S1516-89132011000400013.

Pedersen, S. B. (1994) "Biopharmaceutical Aspects of Tolfenamic Acid", *Pharmacology & Toxicology*, 75, pp. 22-32. doi:10.1111/j.1600-0773.1994.tb01992.x.

Penati, M., Sala, G., Biscarini, F., Boccardo, A., Bronzo, V., Castiglioni, B., Cremonesi, P., Moroni, P., Pravettoni, D. y Addis, M. F. (2021) "Feeding Pre-weaned Calves With Waste Milk Containing Antibiotic Residues Is Related to a Higher Incidence of Diarrhea and Alterations in the Fecal Microbiota", *Frontiers in Veterinary Science*, 8(July), p. 650150. doi:10.3389/fvets.2021.650150.

Pensel, P. E., Ullio Gamboa, G., Fabbri, J., Ceballos, L., Sanchez Bruni, S., Alvarez, L. I., Allemandi, D., Benoit, J. P., Palma, S. D. y Elissondo, M. C. (2015) "Cystic echinococcosis therapy: Albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice", *Acta Tropica*, 152, pp. 185-194. doi:10.1016/j.actatropica.2015.09.016.

Pérez, 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.", *Chemico-Biological Interactions*, 180(1), pp. 106-112. doi:10.1016/j.cbi.2009.02.009.

Pérez, M., Otero, J. A., Barrera, B., Prieto, J. G., Merino, G. y Alvarez, A. I. (2013) "Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: Effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep", *The Veterinary Journal*, 196(2), pp. 203-208. doi:10.1016/j.tvjl.2012.09.012.

Pérez, M., Real, R., Mendoza, G., Merino, G., Prieto, J. G. y Alvarez, A. I. (2009b) "Milk

10. BIBLIOGRAFÍA

secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: modulation by isoflavones.", *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 32(5), pp. 498-502. doi:10.1111/j.1365-2885.2008.01050.x.

Polgar, O., Robey, R. W. y Bates, S. E. (2008) "ABCG2: structure, function and role in drug response", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(1), pp. 1-15. doi:10.1517/17425255.4.1.1.

Pourgholami, M. H., Cai, Z. Y., Lu, Y., Wang, L. y Morris, D. L. (2006) "Albendazole: A potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice", *Clinical Cancer Research*, 12(6), pp. 1928-1935. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1181.

Pourgholami, M. H., Szwajcer, M., Chin, M., Liauw, W., Seef, J., Galettis, P., Morris, D. L. y Links, M. (2010) "Phase I clinical trial to determine maximum tolerated dose of oral albendazole in patients with advanced cancer", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65(3), pp. 597-605. doi:10.1007/s00280-009-1157-8.

Power, C., Danaher, M., Sayers, R., O'Brien, B., Whelan, M., Furey, A. y Jordan, K. (2013a) "Investigation of the persistence of rafoxanide residues in bovine milk and fate during processing", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(6), pp. 1087-1095. doi:10.1080/19440049.2013.787655.

Power, C., Sayers, R., O'Brien, B., Clancy, C., Furey, A., Jordan, K. y Danaher, M. (2013b) "Investigation of the persistence of closantel residues in bovine milk following lactating-cow and dry-cow treatments and its migration into dairy products", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(36), pp. 8703-8710. doi:10.1021/jf4022866.

Prado Flores, G., Carabias Martínez, R., Rodríguez Gonzalo, E. y Herrero Hernández, E.

10. BIBLIOGRAFÍA

(2002) "Presence of residues and pollutants in human milk", *Revista española de salud pública*, 76(2), pp. 133-147. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=17076207>.

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", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(4), pp. 279-287. doi:10.1111/j.1365-2885.2006.00744.x.

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 Research*, 60(1), pp. 47-50. Disponible en: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/60/1/47/506228/Fumitremorgin-C-Reverses-Multidrug-Resistance-in>.

Radi, A. M., Mohammed, E. T., Abushouk, A. I., Aleya, L. y Abdel-Daim, M. M. (2020) "The effects of abamectin on oxidative stress and gene expression in rat liver and brain tissues: Modulation by sesame oil and ascorbic acid", *Science of the Total Environment*, 701, p. 134882. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134882.

Rana, M. S., Lee, S. Y., Kang, H. J. y Hur, S. J. (2019) "Reducing Veterinary Drug Residues in Animal Products: A Review", *Food Science of Animal Resources*, 39(5), pp. 687-703. doi:10.5851/kosfa.2019.e65.

Rawden, H. C., Kokwaro, G. O., Ward, S. A. y Edwards, G. (2000) "Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes", *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49, pp. 313-322. doi: 10.1046/j.1365-2125.2000.00170.x.

10. BIBLIOGRAFÍA

Raza, A., Bagnall, N. H., Jabbar, A., Kopp, S. R. y Kotze, A. C. (2016) "Increased expression of ATP binding cassette transporter genes following exposure of *Haemonchus contortus* larvae to a high concentration of monepantel in vitro", *Parasites & Vectors*, 9(1), p. 522. doi:10.1186/s13071-016-1806-9.

Real, R., Egado, E., Pérez, M., González-Lobato, L., Barrera, B., Prieto, J. G., Álvarez, A. I. y Merino, G. (2011a) "Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: interaction with ivermectin", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34(4), pp. 313-321. doi:10.1111/j.1365-2885.2010.01241.x.

Real, R., González-Lobato, L., Baro, M. F., Valbuena, S., de la Fuente, A., Prieto, J. G., Álvarez, 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", *Journal of Animal Science*, 89(12), pp. 4325-4338. doi:10.2527/jas.2011-3841.

Rendic, S. P. (2021) "Metabolism and interactions of Ivermectin with human cytochrome P450 enzymes and drug transporters, possible adverse and toxic effects", *Archives of Toxicology*, 95(5), pp. 1535-1546. doi:10.1007/s00204-021-03025-z.

Riches, Z., Abanda, N. y Collier, A. C. (2015) "BCRP protein levels do not differ regionally in adult human livers, but decline in the elderly", *Chemico-Biological Interactions*, 242, pp. 203-210. doi:10.1016/j.cbi.2015.10.007.

Richter, D., Richter, J., Grüner, B., Kranz, K., Franz, J. y Kern, P. (2013) "In vitro efficacy of triclabendazole and clorsulon against the larval stage of *Echinococcus multilocularis*", *Parasitology Research*, 112(4), pp. 1655-1660. doi:10.1007/s00436-013-3321-7.

10. BIBLIOGRAFÍA

Robey, R. W., Polgar, O., Deeken, J., To, K. W. y Bates, S. E. (2007) "ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance", *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(1), pp. 39-57. doi:10.1007/s10555-007-9042-6.

Robey, R. W., To, K. K. K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M. y Bates, S. E. (2009) "ABCG2: A perspective", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(1), pp. 3-13. doi:10.1016/j.addr.2008.11.003.

Rolfe, P., Boray, J., Fitzgibbon, C., Parsons, G., Kemsley, P. y Sangster, N. (1990) "Closantel resistance in *Huemonchus contortus* from sheep", *Australian veterinary journal*, 67(1), p. 29. doi:10.1111/j.1751-0813.1990.tb07389.x.

Romero, T., Althaus, R., Moya, V. J., Beltrán, M. del C., Reybroeck, W. y Molina, M. P. (2017) "Albendazole residues in goat's milk: Interferences in microbial inhibitor tests used to detect antibiotics in milk", *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), pp. 302-305. doi:10.1016/j.jfda.2016.08.007.

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", *Journal of Dairy Science*, 89(12), pp. 4921-4923. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72542-5.

Safar, Z., Kis, E., Erdo, F., Zolnerciks, J. K. y Krajcsi, P. (2019) "ABCG2/BCRP: variants, transporter interaction profile of substrates and inhibitors", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 15(4), pp. 313-328. doi:10.1080/17425255.2019.1591373.

Saleh, B., Li, L., Chen, X., Li, J., Jiang, S., Liu, R. y He, L. (2022) "Determination of closantel enantiomers in black goat plasma and their pharmacokinetic characteristics", *Journal of Chromatography B*, 1210, p. 123414. doi:10.1016/j.jchromb.2022.123414.

Sanabria, R., Ceballos, L., Moreno, L., Romero, J., Lanusse, C. y Alvarez, L. (2013)

10. BIBLIOGRAFÍA

"Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole", *Veterinary Parasitology*, 193(1-3), pp. 105-110. doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.033.

Sankpal, U. T., Goodison, S., Jones-Pauley, M., Hurtado, M., Zhang, F. y Basha, R. (2017) "Tolfenamic acid-induced alterations in genes and pathways in pancreatic cancer cells", *Oncotarget*, 8(9), pp. 14593-14603. doi:10.18632/oncotarget.14651.

Sarkadi, B., Homolya, L. y Hegedűs, T. (2020) "The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology", *FEBS Letters*, 594(23), pp. 4012-4034. doi:10.1002/1873-3468.13947.

Saurin, W., Hofnung, M. y Dassa, E. (1999) "Getting In or Out: Early Segregation Between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters", *Journal of Molecular Evolution*, 48(1), pp. 22-41. doi:10.1007/PL00006442.

Schrickx, J. A. y Fink-Gremmels, J. (2008) "Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products", *European Journal of Pharmacology*, 585(2-3), pp. 510-519. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.014.

Schulz, J. D., Neodo, A., Coulibaly, J. T. y Keiser, J. (2019) "Pharmacokinetics of albendazole, albendazole sulfoxide, and albendazole sulfone determined from plasma, blood, dried-blood spots, and Mitra samples of hookworm-infected adolescents", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(4), pp. 1-12. doi:10.1128/AAC.02489-18.

Schwab, J. M., Schluesener, H. J., Meyermann, R. y Serhan, C. N. (2003) "COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics?", *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69(5), pp. 339-343. doi:10.1016/j.plefa.2003.07.003.

Shuhua, X., Jiqing, Y., Mingjie, W., Pieying, J., Fanghua, G., Junjie, C., Wei, J. y Hotez, P.

10. BIBLIOGRAFÍA

(2002) "Augmented bioavailability and cysticidal activity of albendazole reformulated in soybean emulsion in mice infected with *Echinococcus granulosus* or *Echinococcus multilocularis*", *Acta Tropica*, 82(1), pp. 77-84. doi:10.1016/S0001-706X(02)00027-X.

Siarheyeva, A., Liu, R. y Sharom, F. J. (2010) "Characterization of an Asymmetric Occluded State of P-glycoprotein with Two Bound Nucleotides", *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), pp. 7575-7586. doi:10.1074/jbc.M109.047290.

Sibille, P., Calléja, C., Carreras, F., Bigot, K., Galtier, P. y Boulard, C. (2000) "Fasciola hepatica: Influence of gender and liver biotransformations on flukicide treatment efficacy of rats infested and cured with either clorsulon/ivermectin or triclabendazole", *Experimental Parasitology*, 94(4), pp. 227-237. doi:10.1006/expr.2000.4501.

Sidhu, P. K., Landoni, M. F., Aliabadi, M. H. S., Toutain, P. L. y Lees, P. (2011) "Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of marbofloxacin administered alone and in combination with tolfenamic acid in calves", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34(4), pp. 376-387. doi:10.1111/j.1365-2885.2010.01247.x.

Sidhu, P. K., Landoni, M. F. y Lees, P. (2005) "Influence of marbofloxacin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolfenamic acid in calves.", *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 28(1), pp. 109-119. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00633.x.

Sidhu, P. K., Landoni, M. F. y Lees, P. (2006) "Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of tolfenamic acid and marbofloxacin in goats.", *Research in veterinary science*, 80(1), pp. 79-90. doi:10.1016/j.rvsc.2005.04.008.

Siles-Lucas, M., Becerro-Recio, D., Serrat, J. y González-Miguel, J. (2021) "Fascioliasis and fasciolopsiasis: Current knowledge and future trends", *Research in Veterinary Science*, 134, pp. 27-35.

10. BIBLIOGRAFÍA

doi:10.1016/j.rvsc.2020.10.011.

Siles-Lucas, M., Casulli, A., Cirilli, R. y Carmena, D. (2018) "Progress in the pharmacological treatment of human cystic and alveolar echinococcosis: Compounds and therapeutic targets", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(4), p. e0006422. doi:10.1371/journal.pntd.0006422.

Simmons, D. L., Botting, R. M. y Hla, T. (2004) "Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition", *Pharmacological Reviews*, 56(3), pp. 387-437. doi:10.1124/pr.56.3.3.

Singla, N., McCallum, S. W., Mack, R. J., Freyer, A., Hobson, S. y Du, W. (2018) "Safety and efficacy of an intravenous nanocrystal formulation of meloxicam in the management of moderate to severe pain following laparoscopic abdominal surgery", *Journal of Pain Research*, 11, pp. 1901-1903. doi:10.2147/JPR.S163736.

Sissung, T. M., Goey, A. K. L., Ley, A. M., Strobe, J. D. y Figg, W. D. (2014) "Pharmacogenetics of Membrane Transporters: A Review of Current Approaches", *Methods in Molecular Biology*, 1175, pp. 91-120. doi:10.1007/978-1-4939-0956-8_6.

Skálová, L., Szotáková, B., Machala, M., Neča, J., Lamka, J., Ducháček, L. y Kvasničková, E. (2000) "Effect of ivermectin on induction of cytochromes P450 in male rats", *Chemical Papers*, 54(4), pp. 249-253. Disponible en: <https://chempap.org/?id=7&paper=2892>

Smith, G. W., Davis, J. L., Tell, L. A., Webb, A. I. y Riviere, J. E. (2008) "Extralabel use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cattle", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(5), pp. 697-701. doi:10.2460/javma.232.5.697.

van Soest, F. J. S., Abbeloos, E., McDougall, S. y Hogeveen, H. (2018) "Addition of meloxicam to the treatment of bovine clinical mastitis results in a net economic benefit to the dairy farmer", *Journal*

10. BIBLIOGRAFÍA

of dairy science, 101(4), pp. 3387-3397. doi:10.3168/JDS.2017-12869.

Song, Y.-K., Kim, M.-J., Kim, M.-S., Lee, J. H., Chung, S.-J., Song, J. S., Chae, Y.-J. y Lee, K.-R. (2022) "Role of the efflux transporters Abcb1 and Abcg2 in the brain distribution of olaparib in mice", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 173, p. 106177. doi:10.1016/j.ejps.2022.106177.

Stacy, A. E., Jansson, P. J. y Richardson, D. R. (2013) "Molecular Pharmacology of ABCG2 and Its Role in Chemoresistance", *Molecular Pharmacology*, 84(5), pp. 655-669. doi:10.1124/mol.113.088609.

Statham, J. M. E. (2015) "Control of liver fluke: an emerging issue in terms of veterinary residues.", *The Veterinary record*, 177(20), pp. 519-21. doi:10.1136/vr.h6287.

Stettler, M., Rossignol, J. F., Fink, R., Walker, M., Gottstein, B., Merli, M., Theurillat, R., Thormann, W., Dricot, E., Segers, R. y Hemphill, A. (2004) "Secondary and primary murine alveolar echinococcosis: combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity", *International Journal for Parasitology*, 34(5), pp. 615-624. doi:10.1016/j.ijpara.2004.01.006.

Stettler, M., Siles-Lucas, M., Sarciron, E., Lawton, P., Gottstein, B. y Hemphill, A. (2001) "Echinococcus multilocularis Alkaline Phosphatase as a Marker for Metacestode Damage Induced by In Vitro Drug Treatment with Albendazole Sulfoxide and Albendazole Sulfone", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), pp. 2256-2262. doi:10.1128/AAC.45.8.2256-2262.2001.

Stock, M. L. y Coetzee, J. F. (2015) "Clinical Pharmacology of Analgesic Drugs in Cattle", *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 31(1), pp. 113-138. doi:10.1016/j.cvfa.2014.11.002.

Stuchlíková, L. R., Matoušková, P., Vokřál, I., Lamka, J., Szotáková, B., Sečkařová, A., Dimunová, D., Nguyen, L. T., Várady, M. y Skálová, L. (2018) "Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in Haemonchus contortus adults: Sex differences, resistance-related

10. BIBLIOGRAFÍA

differences and the identification of new metabolites", *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(1), pp. 50-58. doi:10.1016/j.ijpddr.2018.01.005.

Subaiea, G. M., Adwan, L. I., Ahmed, A. H., Stevens, K. E. y Zawia, N. H. (2013) "Short-term treatment with tolfenamic acid improves cognitive functions in alzheimer's disease mice", *Neurobiology of Aging*, 34(10), pp. 2421-2430. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.002.

Sundlof, S. F. y Whitlock, T. W. (1992) "Clorsulon pharmacokinetics in sheep and goats following oral and intravenous administration", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 15(3), pp. 282-291. doi:10.1111/j.1365-2885.1992.tb01018.x.

Swan, G. E., Koeleman, H. A., Steyn, H. S. y Mülders, M. S. G. (1999) "Intravascular plasma disposition and salivary secretion of closantel and rofoxanide in sheep", *Journal of the South African Veterinary Association*, 70(2), pp. 75-79. doi:10.4102/jsava.v70i2.758.

Tabatabaei, S. A., Soleimani, M., Mansouri, M. R., Mirshahi, A., Inanlou, B., Abrishami, M., Pakrah, A. R. y Masarat, H. (2016) "Closantel; a veterinary drug with potential severe morbidity in humans", *BMC Ophthalmology*, 16(1), p. 207. doi:10.1186/s12886-016-0387-x.

Tacconelli, S., Bruno, A., Grande, R., Ballerini, P. y Patrignani, P. (2017) "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular safety – translating pharmacological data into clinical readouts", *Expert Opinion on Drug Safety*, 16(7), pp. 791-807. doi:10.1080/14740338.2017.1338272.

Takeuchi, R., Shinozaki, K., Nakanishi, T. y Tamai, I. (2015) "Local Drug-Drug Interaction of Donepezil with Cilostazol at Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Increases Drug Accumulation in Heart", *Drug Metabolism and Disposition*, 44(1), pp. 68-74. doi:10.1124/dmd.115.066654.

Tatematsu, Y., Hayashi, H., Taguchi, R., Fujita, H., Yamamoto, A. y Ohkura, K. (2016) "Effect of N-Phenylanthranilic Acid Scaffold Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on the Mitochondrial

10. BIBLIOGRAFÍA

Permeability Transition", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(2), pp. 278-284. doi:10.1248/bpb.b15-00717.

Taylor, N. M. I., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Kowal, J., Stahlberg, H. y Locher, K. P. (2017) "Structure of the human multidrug transporter ABCG2", *Nature*, 546(7659), pp. 504-509. doi:10.1038/nature22345.

Teruel, M., García, V. y Catalano, R. (2009) "Effects of Albendazole Sulphoxide on Embryonic, Foetal and Placental Parameters in Wistar Rats", *International Journal of Morphology*, 27(4), pp. 1147-1153. doi:10.4067/S0717-95022009000400030.

The European Commission (2010) "Commission Regulation (EU) 37/2010 Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin", *Official Journal of the European Union*, (L 15), pp. 1-72. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32010R0037>

Thomas, C., Aller, S. G., Beis, K., Carpenter, E. P., Chang, G., Chen, L., Dassa, E., Dean, M., Duong Van Hoa, F., Ekiert, D., Ford, R., Gaudet, R., Gong, X., Holland, I. B., Huang, Y., Kahne, D. K., Kato, H., Koronakis, V., Koth, C. M., Lee, Y., Lewinson, O., Lill, R., Martinoia, E., Murakami, S., Pinkett, H. W., Poolman, B., Rosenbaum, D., Sarkadi, B., Schmitt, L., Schneider, E., Shi, Y., Shyng, S., Slotboom, D. J., Tajkhorshid, E., Tieleman, D. P., Ueda, K., Váradi, A., Wen, P., Yan, N., Zhang, P., Zheng, H., Zimmer, J. y Tampé, R. (2020) "Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters", *FEBS Letters*, 594(23), pp. 3767-3775. doi:10.1002/1873-3468.13935.

Timson, D. J. (2016) "Metabolic Enzymes of Helminth Parasites: Potential as Drug Targets", *Current Protein and Peptide Science*, 17(3), pp. 280-295. doi:10.2174/1389203717999160226180733.

10. BIBLIOGRAFÍA

Tomić, M., Micov, A., Pecikoza, U. y Stepanović-Petrović, R. (2017) "Clinical Uses of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Potential Benefits of NSAIDs Modified-Release Preparations", en *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. Elsevier, pp. 1-29. doi:10.1016/B978-0-12-804017-1.00001-7.

Tsiboukis, D., Sazakli, E., Gortzi, O., Hadjichristodoulou, C., Matara, C. y Leotsinidis, M. (2010) "Assessing quality of raw milk in southern Greece in the aspect of certain benzimidazole residues", *Food Additives and Contaminants: Part B*, 3(2), pp. 73-79. doi:10.1080/19440049.2010.487877.

Tsiboukis, D., Sazakli, E., Jelastopulu, E. y Leotsinidis, M. (2013) "Anthelmintics residues in raw milk. Assessing intake by a children population", *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(1), pp. 85-91. doi:10.2478/pjvs-2013-0012.

Turk, E., Tekeli, I. O., Durna Corum, D., Corum, O., Altinok Yipel, F., Ilhan, A., Emiroglu, S. B., Uguz, H. y Uney, K. (2021) "Pharmacokinetics of tolfenamic acid in goats after different administration routes", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 44(3), pp. 367-373. doi:10.1111/jvp.12949.

Velamakanni, S., Wei, S. L., Janvilisri, T. y van Veen, H. W. (2007) "ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(5-6), pp. 465-471. doi:10.1007/s10863-007-9122-x.

Vercruysse, J., Charlier, J., Van Dijk, J., Morgan, E. R., Geary, T., von Samson-Himmelstjerna, G. y Claerebout, E. (2018) "Control of helminth ruminant infections by 2030", *Parasitology*, 145(13), pp. 1655-1664. doi:10.1017/S003118201700227X.

Veríssimo, C. J., Niciura, S. C. M., Alberti, A. L. L., Rodrigues, C. F. C., Barbosa, C. M. P., Chiebao, D. P., Cardoso, D., da Silva, G. S., Pereira, J. R., Margatho, L. F. F., da Costa, R. L. D.,

10. BIBLIOGRAFÍA

Nardon, R. F., Ueno, T. E. H., Curci, V. C. L. M. y Molento, M. B. (2012) "Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil", *Veterinary Parasitology*, 187(1-2), pp. 209-216. doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.013.

Virginia, D. V. (2015) "Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Food Producing Animals", *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 10(2), pp. 85-90. doi:10.3844/ajavsp.2015.85.90.

Virkel, G., Ballent, M., Lanusse, C. y Lifschitz, A. (2019) "Role of ABC Transporters in Veterinary Medicine: Pharmacotoxicological Implications", *Current Medicinal Chemistry*, 26(7), pp. 1251-1269. doi:10.2174/0929867325666180201094730.

Virkel, G., Lifschitz, A., Sallovits, J., Balent, M., Scarcella, S. y Lanusse, C. (2009) "Inhibition of cytochrome P450 activity enhances the systemic availability of triclabendazole metabolites in sheep", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(1), pp. 79-86. doi:10.1111/j.1365-2885.2008.01006.x.

Viviani, P., Lifschitz, A. L., Luque, S. E., Lloberas, M. M., Maté, M. L., Cardozo, P. A., Lanusse, C. E. y Virkel, G. L. (2019) "Pharmacologic interaction between oxfendazole and triclabendazole: In vitro biotransformation and systemic exposure in sheep", *Experimental Parasitology*, 204, p. 107718. doi:10.1016/j.exppara.2019.107718.

Vlaming, M. L. H., Lagas, J. S. y Schinkel, A. H. (2009) "Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice.", *Advanced drug delivery reviews*, 61(1), pp. 14-25. doi:10.1016/j.addr.2008.08.007.

Wang, L., Leggas, M., Goswami, M., Empey, P. E. y McNamara, P. J. (2008) "GF120918 as a chemical Abcg2 knockout model to study nitrofurantoin transfer into milk", *Drug Metabolism and Disposition*, 36(12), pp. 2591-2596. doi:10.1124/dmd.108.021980.

10. BIBLIOGRAFÍA

Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F. y Tall, A. R. (2004) "ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26), pp. 9774-9779. doi:10.1073/pnas.0403506101.

Wang, Y., Sparidans, R. W., Li, W., Lebre, M. C., Beijnen, J. H. y Schinkel, A. H. (2020) "OATP1A/1B, CYP3A, ABCB1, and ABCG2 limit oral availability of the NTRK inhibitor larotrectinib, while ABCB1 and ABCG2 also restrict its brain accumulation", *British Journal of Pharmacology*, 177(13), pp. 3060-3074. doi:10.1111/bph.15034.

Wang, Y., Wang, Y., Qin, Z., Cai, S., Yu, L., Hu, H. y Zeng, S. (2021) "The role of non-coding RNAs in ABC transporters regulation and their clinical implications of multidrug resistance in cancer", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 17(3), pp. 291-306. doi:10.1080/17425255.2021.1887139.

Wang, Z., Wang, N., Liu, P., Chen, Q., Situ, H., Xie, T., Zhang, J., Peng, C., Lin, Y. y Chen, J. (2014) "MicroRNA-25 regulates chemoresistance-associated autophagy in breast cancer cells, a process modulated by the natural autophagy inducer isoliquiritigenin", *Oncotarget*, 5(16), pp. 7013-7026. doi:10.18632/oncotarget.2192.

Warner, R., Ydstie, J. A., Wulf, L. W., Gehring, R., Coetzee, J. F., Mochel, J. P. y Gorden, P. J. (2020) "Comparative Pharmacokinetics of Meloxicam Between Healthy Post-partum vs. Mid-lactation Dairy Cattle", *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 548. doi:10.3389/fvets.2020.00548.

Wassermann, L., Halwachs, S., Lindner, S., Honscha, K. U. y Honscha, W. (2013) "Determination of Functional ABCG2 Activity and Assessment of Drug-ABCG2 Interactions in Dairy Animals Using a Novel MDCKII InVitro Model.", *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(2), pp. 772-784. doi:10.1002/jps.

10. BIBLIOGRAFÍA

Weidner, L. D., Zoghbi, S. S., Lu, S., Shukla, S., Ambudkar, S. V., Pike, V. W., Mulder, J., Gottesman, M. M., Innis, R. B. y Hall, M. D. (2015) "The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354(3), pp. 384-393. doi:10.1124/jpet.115.225482.

Whelan, M., Bloemhoff, Y., Furey, A., Sayers, R. y Danaher, M. (2011) "Investigation of the persistence of nitroxylin residues in milk from lactating dairy cows by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), pp. 7793-7797. doi:10.1021/jf202050r.

Wilkins, S. (2015) "Structure and mechanism of ABC transporters.", *F1000Prime Reports*, 7(14), pp. 1-9. doi:10.12703/P7-14.

Williams, J. A. y Phillips, D. H. (2000) "Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer.", *Cancer research*, 60(17), pp. 4667-77. Disponible en: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/60/17/4667/506505/Mammary-Expression-of-Xenobiotic-Metabolizing>.

Wong, R. S. Y. (2019) "Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion", *Advances in Pharmacological Sciences*, 2019, pp. 1-10. doi:10.1155/2019/3418975.

Woodward, O. M., Köttgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W. B. y Köttgen, M. (2009) "Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), pp. 10338-10342. doi:10.1073/pnas.0901249106.

World Health Organization (2022) *Geohelminthiasis*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news->

10. BIBLIOGRAFÍA

room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections

Wright, J., Muench, S. P., Goldman, A. y Baker, A. (2018) "Substrate polyspecificity and conformational relevance in ABC transporters: New insights from structural studies", *Biochemical Society Transactions*, 46(6), pp. 1475-1484. doi:10.1042/BST20180146.

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)", *Molecular Biotechnology*, 39(1), pp. 21-27. doi:10.1007/s12033-007-9024-5.

Xie, M., Fu, Z., Cao, J., Liu, Y., Wu, J., Li, Q. y Chen, Y. (2018) "MicroRNA-132 and microRNA-212 mediate doxorubicin resistance by down-regulating the PTEN-AKT/NF- κ B signaling pathway in breast cancer", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, pp. 286-294. doi:10.1016/j.biopha.2018.03.088.

Xin, Q., Yuan, M., Li, H., Song, X., Lu, J. y Jing, T. (2019) "In vitro and in vivo effects of 3-bromopyruvate against *Echinococcus metacestodes*", *Veterinary Research*, 50(1), p. 96. doi:10.1186/s13567-019-0710-7.

Xu, Y., Egido, E., Li-Blatter, X., Müller, R., Merino, G., Bernèche, S. y Seelig, A. (2015) "Allocreite sensing and binding by the breast cancer resistance protein (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1)", *Biochemistry*, 54(40), pp. 6195-6206. doi:10.1021/acs.biochem.5b00649.

Xu, Z., Li, M., Lu, W., Li, L., Zhang, Y. y Wang, L. (2022) "Ivermectin induces chicken BCRP/ABCG2 expression and function: Involvement of CXR signaling pathway and mRNA stabilization", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 45(6), pp. 558-569. doi:10.1111/jvp.13090.

Yalçın, S. S., Güneş, B. y Yalçın, S. (2020) "Incredible pharmaceutical residues in human milk in a cohort study from Şanlıurfa in Turkey", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, p.

10. BIBLIOGRAFÍA

103502. doi:10.1016/j.etaf.2020.103502.

Yilmaz, E., Gerst, B., McKay-Demeler, J. y Krücken, J. (2019) "Minimal modulation of macrocyclic lactone susceptibility in *Caenorhabditis elegans* following inhibition of cytochrome P450 monooxygenase activity", *Experimental Parasitology*, 200, pp. 61-66. doi:10.1016/j.exppara.2019.03.017.

Yu, Q., Ni, D., Kowal, J., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Stahlberg, H. y Locher, K. P. (2021) "Structures of ABCG2 under turnover conditions reveal a key step in the drug transport mechanism", *Nature Communications*, 12(1), p. 4376. doi:10.1038/s41467-021-24651-2.

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", *Molecular Pharmaceutics*, 3(1), pp. 55-61. doi:10.1021/mp050113v.

Zamek-Gliszczyński, M. J., Bedwell, D. W., Bao, J. Q. y Higgins, J. W. (2012) "Characterization of SAGE Mdr1a (P-gp), Bcrp, and Mrp2 knockout rats using loperamide, paclitaxel, sulfasalazine, and carboxydichlorofluorescein pharmacokinetics", *Drug Metabolism and Disposition*. Drug Metab Dispos, 40(9), pp. 1825-1833. doi:10.1124/dmd.112.046508.

Zamek-Gliszczyński, M. J., Goldstein, K. M., Paulman, A., Baker, T. K. y Ryan, T. P. (2013) "Minor compensatory changes in SAGE Mdr1a (P-gp), Bcrp, and Mrp2 knockout rats do not detract from their utility in the study of transporter-mediated pharmacokinetics", *Drug Metabolism and Disposition*, 41(6), pp. 1174-1178. doi:10.1124/dmd.113.051409.

Zamek-Gliszczyński, M. J., Nezasa, K., Tian, X., Kalvass, J. C., Patel, N. J., Raub, T. J. y Brouwer, K. L. R. (2006) "The Important Role of Bcrp (Abcg2) in the Biliary Excretion of Sulfate and Glucuronide Metabolites of Acetaminophen, 4-Methylumbelliferone, and Harmol in Mice", *Molecular*

10. BIBLIOGRAFÍA

Pharmacology, 70(6), pp. 2127-2133. doi:10.1124/mol.106.026955.

Zancanella, V., Giantin, M., Lopparelli, R. M., Nebbia, C. and Dacasto, M. (2013) "Tissue distribution and phenobarbital induction of target SLC- and ABC- transporters in cattle", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(4), pp. 358–369. doi:10.1111/j.1365-2885.2012.01427.x.

Zárate-Rendón, D. A., Briones-Montero, A., Huaraca-Oré, N. A., Veirano, G. S., Levecke, B. y Geldhof, P. (2023) "Comparison of the therapeutic efficacy of five anthelmintics against natural *Fasciola hepatica* infections in dairy cattle from the Mantaro Valley, Peru", *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 38, p. 100827. doi:10.1016/j.vprsr.2022.100827.

Zattoni, I. F., Delabio, L. C., Dutra, J. de P., Kita, D. H., Scheiffer, G., Hembecker, M., Pereira, G. da S., Moure, V. R. y Valdameri, G. (2022) "Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 237, p. 114346. doi:10.1016/j.ejmech.2022.114346.

Zeidler, H., Kaltwasser, J. P., Leonard, J. P., Kohlmann, T., Sigmund, R., Degner, F. y Hettich, M. (2002) "Prescription and Tolerability of Meloxicam in Day-to-Day Practice", *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*, 8(6), pp. 305-315. doi:10.1097/00124743-200212000-00005.

Zhang, L., Reynolds, K. S., Zhao, P. y Huang, S.-M. (2010) "Drug interactions evaluation: An integrated part of risk assessment of therapeutics", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(2), pp. 134-145. doi:10.1016/j.taap.2009.12.016.

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 Metabolism and Disposition*, 35(12), pp. 2154-2158. doi:10.1124/dmd.107.018044.

10. BIBLIOGRAFÍA

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", *Molecular Pharmacology*, 73(3), pp. 949-959. doi:10.1124/mol.107.041616.

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", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), pp. 12339-12344. doi:10.1073/pnas.192276999.

Zhou, S., Zong, Y., Ney, P. A., Nair, G., Stewart, C. F. y Sorrentino, B. P. (2005) "Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels", *Blood*, 105(6), pp. 2571-2576. doi:10.1182/blood-2004-04-1566.

Zhu, X.-Y., Xia, B., Liu, H.-C., Xu, Y.-Q., Huang, C.-J., Gao, J.-M., Dong, Q.-X. y Li, C.-Q. (2016) "Closantel Suppresses Angiogenesis and Cancer Growth in Zebrafish Models", *ASSAY and Drug Development Technologies*, 14(5), pp. 282-290. doi:10.1089/adt.2015.679.

