



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Fisiología Animal

Efecto de las isoflavonas de la soja sobre los niveles en leche de fármacos de uso veterinario mediante la inhibición del transportador ABCG2/ BCRP



Memoria presentada por la Licenciada Miriam Pérez Guerrero para
la obtención del grado de Doctor por la Universidad de León

León, 2013



**universidad
de león**

**INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

La Dra. Dña. **Ana Isabel Álvarez de Felipe** y la Dra. Dña. **Gracia Merino Peláez** como Directores de la Tesis Doctoral titulada «Efecto de las isoflavonas de la soja sobre los niveles en leche de fármacos de uso veterinario mediante la inhibición del transportador ABCG2/BCRP» realizada por Dña. **Miriam Pérez Guerrero** en el programa de doctorado Biomedicina en el departamento de Ciencias Biomédicas, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman para dar cumplimiento del artículo 11.3 del R.D. 56/2005, en
León a de de 2013.

Los directores de la Tesis Doctoral

Fdo: Dra. Ana Isabel Álvarez de Felipe

Fdo: Dra. Gracia Merino Peláez



**universidad
de león**

ADmisión A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO

**(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y norma 7^a de las
complementarias de la ULE)**

El órgano responsable del programa de doctorado Biomedicina en su reunión celebrada el día de de 2013 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada «Efecto de las isoflavonas de la soja sobre los niveles en leche de fármacos de uso veterinario mediante la inhibición del transportador ABCG2/BCRP», dirigida por la Dra. Dña. Ana Isabel Álvarez de Felipe y la Dra. Dña. Gracia Merino Peláez, elaborada por Dña. Miriam Pérez Guerrero.

Lo que firmo para dar cumplimiento del artículo 11.3 del R.D. 56/2005, en

León a de de 2013.

Vº Bº

El Director del Departamento,

El Secretario,

Fdo.:

Fdo.:

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

□ «*In vitro and in vivo interaction of moxidectin with BCRP/ABCG2*».

Chemico-Biological Interactions 180:106-112; 2009.

Miriam Pérez, Alba G. Blázquez, Rebeca Real, Gracia Mendoza, Julio G. Prieto, Gracia Merino, Ana I. Álvarez.

□ «*In vivo inhibition of the BCRP/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: A comparative study in Bcrp1^{-/-} mice*».

Pharmaceutical Research 27(10):2098-105; 2010.

Gracia Merino, **Miriam Pérez**, Rebeca Real, Estefania Egido, Julio G. Prieto, Ana I. Alvarez.

□ «*Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: modulation by isoflavones*».

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 32(5):498-502; 2009.

Miriam Pérez, Rebeca Real, Gracia Mendoza, Gracia Merino, Julio G. Prieto, Ana I. Álvarez.

□ «*Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep*». **Veterinary Journal**.196(2):203-208; 2013.

Miriam Pérez, Jon A. Otero, Borja Barrera, Julio G. Prieto, Gracia Merino, Ana I. Alvarez.

Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han dado lugar a las siguientes **Comunicaciones a Congresos tanto Nacionales como Internacionales:**

«*Interacción de la danofloxacina con la BCRP/ABCG2: Influencia de flavonoides»*

XXXI Congreso de la SEBBM. 9-12 Septiembre 2008. Bilbao, España.

Rebeca Real, **Miriam Pérez**, Lucía González-Lobato, Estefanía Egido, Julio G. Prieto, Ana I. Alvarez, Gracia Merino.

«*Inhibición del transportador BCRP/ABCG2 por isoflavonas»*

XXXI Congreso de la SEBBM. 9-12 Septiembre 2008. Bilbao, España.

Ana I. Alvarez, Rebeca Real, **Miriam Pérez**, Lucía González-Lobato, Estefanía Egido, Julio G. Prieto, Gracia Merino.

«*Interacción in vivo del antibiótico Danofloxacina con el transportador de membrana BCRP/ABCG2»*

III Reunión de la red española de investigación sobre proteínas trasportadoras de membrana. «Bioquímica, fisiología y farmacología de los transportadores de membrana». 8-9 junio de 2009. Salamanca, España.

Estefanía Egido, Borja Barrera, Rebeca Real, **Miriam Pérez**, Lucía González Lobato, Julio G. Prieto, Ana I. Álvarez, Gracia Merino.

«*In vivo interaction of danofloxacin with Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)»*

6th International Research Conference, Biomedicals Transporters. 9-13 agosto 2009. Thun, Suiza.

Rebeca Real, Estefanía Egido, Lucía González-Lobato, **Miriam Pérez**, Julio G. Prieto, Ana I. Álvarez, Gracia Merino.

-
- «***Influence of soy isoflavones on Nitrofurantoin interaction with the BCRP/ABCG2 protein***»

6th International Research Conference, Biomedicals Transporters. 9-13 agosto 2009. Thun, Suiza.

Miriam Pérez, Rebeca Real, Estefanía Egido, Gracia Mendoza, Julio G. Prieto, Gracia Merino, Ana I. Álvarez.

- «***Influencia de las isoflavonas en la secreción láctea mediada por BCRP, de nitrofurantoína: Estudio en ovejas productoras de leche***»

VIII Congreso de Veterinarios de Castilla y León. 4-6 junio 2009. León, España.

Tipo de Participación: Póster. **PREMIO ACCESIT a la comunicación.**

Miriam Pérez, Rebeca Real, Borja Barrera, Gracia Merino, Julio G. Prieto, Ana I. Alvarez.

- «***Inhibition by isoflavones of Breast Cancer Resistance Protein: Effect on nitrofurantoin disposition in wild-type and knockout mice***»

4th International Conference on Polyphenols and Health. 7-11 diciembre 2009.

Yorkshire, Reino Unido.

Miriam Pérez, Rebeca Real, Lucía González-Lobato, Gracia Mendoza, Julio G. Prieto, Gracia Merino, Ana I. Álvarez.

- «***In vitro interaction of danofloxacin with Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) mediated by genistein and daidzein***»

4th International Conference on Polyphenols and Health. 7-11 diciembre 2009.

Yorkshire, Reino Unido.

Ana I. Álvarez, **Miriam Pérez**, Rebeca Real, Estefanía Egido, Borja Barrera, Julio G. Prieto, Gracia Merino.

FINANCIACIÓN

Esta Tesis Doctoral elaborada por compendio de artículos se ha desarrollado gracias a la concesión de una Beca del Programa de Formación de Profesorado Investigador (FPI) (2007-2010), concedida por del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte asociado al proyecto AGL 2006-13186 (REF: BES-2007-16685, con fecha de incorporación, 1/07/2007)

Dentro del desarrollo de dicha Beca se han realizado dos estancias breves, una en el centro de investigación Foulum en el laboratorio del Dr. Stig Purup (Aarhus, Dinamarca) y otra en la Facultad de Farmacología en el laboratorio de la Dra. Margery Barrand (Cambridge, Reino Unido).

Para su realización se ha contado con las siguientes ayudas:

—**Proyectos de Investigación Fundamental del Plan Nacional.** Título del proyecto: «**Influencia de las Isoflavonas en la secreción láctea mediada por ivermectina, selamectina y moxidectina:estudio en cultivos celulares y en ovejas productoras de leche.** REF. AGL 2006-13186. Duración: 2006-2009. Investigadora Principal: Dra Ana I Alvarez.

—**Proyectos de Investigación financiados por la Junta de Castilla y León.**
Título del proyecto : **Efectos de las isoflavonas genisteína y daidzeína en la regulación de la BCRP/ABG2:** (REF: LE028A08) Duración: 2007-2008.
Investigadora Principal: Dra Ana I Alvarez.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han puesto
a mi disposición sus conocimientos y los medios necesarios para la realización de
este trabajo, en especial a mis directoras de tesis.

A mi padre

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS..... 21

RESUMEN..... 25

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... 33

1) TRANSPORTADORES ABC: ABCG2/BCRP	35
1.1) Sustratos e inhibidores de ABCG2/BCRP	38
1.2) Distribución tisular de ABCG2/BCRP	41
2) IMPORTANCIA DE ABCG2/BCRP EN LA EXCRECIÓN DE FÁRMACOS A LECHE	43
3) POLIFENOLES.....	50
4) SUSTRATOS DE ABCG2/BCRP	57
4.1) Moxidectina.....	57
4.2) Nitrofurantoína.....	60
4.3) Danofloxacina	63

OBJETIVOS..... 67

**ARTÍCULO 1: IN VITRO AND IN VIVO INTERACTION OF MOXIDECTIN WITH
BCRP/ABCG2. *Chem Biol Interact* 2009, Volume 180, Issue 1, pp 106-112 73**

ANEXO I: FARMACOCINÉTICA DE LA MOXIDECTINA EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE ABCG2/BCRP EN OVEJAS DE RAZA ASSAF.....	101
1) Grupos experimentales	103
2) Toma de muestras y análisis cromatográficos.....	103
3) Resultados	104

**ARTÍCULO 2: IN VIVO INHIBITION OF BCRP/ABCG2 MEDIATED TRANSPORT
OF NITROFURANTOIN BY THE ISOFLAVONES GENISTEIN AND DAIDZEIN:
A COMPARATIVE STUDY IN BCRP1(-/-) MICE. *Pharm Res* 2010, Volume
27, Issue 10, pp 2098-2015** **109**

ARTÍCULO 3: MILK SECRETION OF NITROFURANTOIN, AS A SPECIFIC BCRP/ABCG2 SUBSTRATE, IN ASSAF SHEEP: MODULATION BY ISOFLAVONES. <i>J Vet Pharmacol Ther 2009, Volume 32, Issue 5, pp 498-502</i>	135
ANEXO II: VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE ISOFLAVONAS EN LA SANGRE DE OVEJAS ASSAF ADMINISTRADAS CON DISTINTAS DIETAS Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE NITROFURANTOÍNA EN LECHE.....	153
1) Grupos experimentales	155
2) Toma de muestras y condiciones cromatográficas.....	156
3) Resultados	157
ARTÍCULO 4: INHIBITION OF ABCG2/BCRP TRANSPORTER BY SOY ISOFLAVONES GENISTEIN AND DAIDZEIN: EFFECT ON PLASMA AND MILK LEVELS OF DANOFLOXACIN IN SHEEP. <i>Vet J 2013, Vol 196,</i> Issue 2, pp 203-208	163
DISCUSIÓN GLOBAL	185
1) RESIDUOS DE FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS EN LECHE.	
INTERACCIÓN DE MOXIDECTINA CON ABCG2/BCRP	187
2) MODULACIÓN POR ISOFLAVONAS DE LA SECRECIÓN DE FÁRMACOS.....	191
2.1) Estudios en cultivos celulares	192
2.2) Estudios en ratones wildtype y knockout.....	193
2.3) Experimentos en ovejas Assaf.....	195
2.3.1) Niveles de moxidectina en leche. Influencia de la coadministración con isoflavonas.....	195
2.3.2) Niveles de nitrofurantoína en leche. Influencia de las dietas sin isoflavonas.....	198
2.3.3) Niveles de danofloxacina en leche. Dietas enriquecidas con soja.....	200
CONCLUSIONES	203
BIBLIOGRAFÍA	211

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A-B: Apical-Basal.

ABC: ATP-Binding Cassette.

AUC: área bajo la curva.

AUC(0-t): área bajo la curva de concentración del fármaco frente al tiempo desde el tiempo cero hasta el tiempo t.

AUC_{leche}: área bajo la curva de concentración del fármaco en leche frente al tiempo.

AUC_{plasma}: área bajo la curva de concentración del fármaco en plasma frente al tiempo.

ABCG2/BCRP: (Breast Cancer Resistance Protein) Proteína asociada al cáncer de mama.

B-A: Basal-Apical.

Bcrp1: homólogo de ABCG2/BCRP en roedores.

Cmáx: concentración en leche y plasma máxima.

CYP1A: isoenzima 1A del citocromo P450.

CYP450: sistema citocromo P450.

DAID: daidzeína.

DANO: danofloxacina.

EMEA: European Medicine Agency (Agencia Europea del Medicamento).

GEN: genisteína.

G1: grupo 1.

G2: grupo 2.

G3: grupo 3.

G4: grupo 4.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

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).

MCF-7: línea celular procedente de células tumorales de mama.

MDCKII: Madin-Darby Canine Kidney Cells (línea celular derivada de riñón de perro).

MDR: Multidrug Resistance (Multirresistencia a fármacos).

MF: mediana de fluorescencia.

MOXI: moxidectina.

MRPs: proteínas asociadas a la resistencia de fármacos.

MRT: tiempo de residencia medio.

MXR: mitoxantrona.

NITRO: nitrofurantoína.

P(app): permeabilidad aparente.

PAR: parental.

PBS: búfer fosfato salino.

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

P-gp: glicoproteína P.

QUER: quercitina.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

SP: Side Population.

t_{1/2}: vida media de eliminación.

Tmax: tiempo observado al que se alcanza la concentración máxima.

Vmax: velocidad máxima.

RESUMEN

La leche es un alimento saludable y nutritivo con un elevado consumo en la mayor parte de la población mundial. Entre los distintos tipos de leche disponibles en el mercado, la leche procedente de vaca y oveja comprende el mayor porcentaje de leche comercializada. Particularmente, la leche de oveja por ser muy rica en grasa, es muy apta para la fabricación de queso.

Las políticas alimentarias tanto en los países industrializados como en los países en vías de desarrollo, han llevado a la introducción y desarrollo de nuevos antihelmínticos y antimicrobianos para controlar y prevenir enfermedades infecciosas en los animales de producción, y a realizar cambios en las prácticas de cría, con el objetivo de proporcionar una amplia disponibilidad de productos cárnicos y derivados lácteos (Lee *et al.*, 2012). En la leche, la presencia de residuos químicos de medicamentos veterinarios como hormonas y agentes antimicrobianos, y contaminantes como pesticidas y dioxinas han hecho crecer la alarma social y en los últimos años se ha observado una creciente preocupación sobre los posibles riesgos para la salud (Herrera-Herrera *et al.*, 2009). Si los tratamientos con antibióticos se aplican indebidamente al ganado, los residuos pueden permanecer en la canal de los animales tras el sacrificio, estos residuos también pueden resultar en una disminución de la calidad en los derivados lácteos (Imperiale *et al.*, 2011). Además, la presencia de antibióticos en leche puede favorecer el desarrollo de resistencias a los medicamentos en las poblaciones de bacterias intestinales. En consecuencia, es necesario controlar los niveles residuales de estos compuestos con el fin de cumplir los requisitos reglamentarios y especialmente para proteger al

RESUMEN

consumidor y al medio ambiente, por lo que acortar el tiempo de espera en leche mejoraría la calidad de la misma y se disminuirían los gastos de producción.

ABCG2/BCRP es un transportador ABC con importantes implicaciones en el ámbito de la medicina veterinaria, no sólo por su papel en la disponibilidad de los fármacos y por sus interacciones farmacológicas (Mealey *et al.*, 2012), sino por el aumento de su expresión en la glándula mamaria en lactación. Estudios llevados a cabo por Jonker *et al.*, (2005), han demostrado el papel funcional de la ABCG2/BCRP en la glándula mamaria. Si se tiene en cuenta que otros transportadores ABC localizados en la membrana apical como la glicoproteína P y MRP2, no están presentes en la glándula mamaria en lactación, los resultados de estos estudios identifican a esta proteína como responsable de la transferencia de fármacos, carcinógenos y toxinas dietéticas hacia la leche en ratones, vacas y humanos, siendo especialmente relevante el estudio de la implicación de la ABCG2/BCRP en la excreción/secreción de fármacos hacia la leche.

La presente memoria de Tesis Doctoral tiene como **objetivo principal** conocer si la proteína ABCG2/BCRP regula el paso a leche de fármacos muy utilizados en clínica veterinaria y si este transporte puede modularse mediante la suplementación con isoflavonas como la genisteína y daidzeína, presentes en la soja, con el fin de disminuir el tiempo de espera en el ganado lechero. Los fármacos estudiados son la moxidectina, una lactona macrocíclica de uso generalizado como antiparasitario en ganado ovino, cuya administración exige un elevado tiempo de espera en leche, y la danofloxacina una fluoroquinolona de amplio espectro, fármaco de elección en el tratamiento de la mastitis. Para ello, realizamos un conjunto de experimentos que se ven recogidos en cada uno de los artículos de esta memoria.

En nuestro **primer artículo** caracterizamos la interacción entre ABCG2/BCRP y

moxidectina en cultivos celulares, en oocitos de *Xenopus laevis* y en estudios farmacocinéticos en ratones wildtype y Bcrp1 (-/-). Los estudios se realizaron en hembras y machos con el fin de establecer el papel del transportador en la secreción de la leche y en la distribución en los tejidos.

En cultivos celulares MDCKII transducidos con ABCG2/BCRP, el transporte de moxidectina fue muy escaso debido a la baja permeabilidad del fármaco. En cambio, en oocitos de *Xenopus laevis* sobreexpresando ABCG2/BCRP, el transporte de moxidectina fue eficiente y bloqueado por un derivado de la acridona, un nuevo inhibidor de ABCG2/BCRP.

El paso de moxidectina a leche fue significativamente menor en las hembras Bcrp1(-/-) y el ratio leche/plasma fue dos veces mayor en las hembras wild-type después de la administración intravenosa. La acumulación de moxidectina en contenido intestinal, bilis e intestino fue mayor en los machos wild-type pero la concentración plasmática de moxidectina no fue diferente en ambos tipos de ratones.

Identificamos en este primer resultado a la moxidectina como un sustrato de ABCG2/BCRP, pudiendo regular su presencia en leche mediante el empleo de flavonoides, inhibidores de ABCG2/BCRP. La alta variedad interindividual en ovejas de raza Assaf solo nos permitió alcanzar una inhibición significativa del paso a leche de la moxidectina tras la coadministración de isoflavonas de la soja, en la fase final de eliminación del fármaco en la leche. Estudios previos de nuestro equipo de investigación, habían mostrado una inhibición más completa en ovejas de raza Merina.

Estas diferencias interespecíficas nos plantean un **segundo artículo** con el objetivo de clarificar la inhibición de las isoflavonas de la soja en el transporte de nitrofurantoina, sustrato tipo de ABCG2/BCRP. Para ello, determinamos la inhibición *in vitro*

RESUMEN

por las isoflavonas genisteína y daidzeína del transporte mediado por ABCG2/BCRP de nitrofurantoína en células MDCKII y en ratones wildtype y Bcrp1 (-/-). Nuestros resultados mostraron una alta inhibición *in vitro* por las isoflavonas. *In vivo*, la concentración plasmática de nitrofurantoína a los 30 minutos fue casi dos veces superior en las hembras wildtype a las que se les había administrado las isoflavonas y el ratio leche/plasma disminuyó desde $7,1 \pm 4,2$ en los animales no tratados con isoflavonas a $4,2 \pm 1,6$ en los ratones administrados. Los niveles de nitrofurantoína en bilis fueron significativamente menores en los animales wildtype tras la administración de isoflavonas ($8,8 \pm 3,4 \mu\text{g/ml}$ vs $3,7 \pm 3,3 \mu\text{g/ml}$). Nuestros resultados muestran que la interacción *in vivo* de altas dosis de isoflavonas de la soja con sustratos de ABCG2/BCRP puede afectar su perfil farmacocinético, con variaciones de los niveles plasmáticos, la secreción biliar y su paso a leche.

Una vez demostrado el efecto inhibitorio de los fitoquímicos en el transporte de la nitrofurantoína *in vitro* e *in vivo* en ratones deficientes en el transportador ABCG2/BCRP, en el **tercer artículo**, estudiamos la inhibición de las isoflavonas genisteína y daidzeína en ovejas de la raza Assaf; para ello establecimos 4 grupos experimentales: G1- ovejas alimentadas con una dieta con isoflavonas; G2-ovejas alimentadas con una dieta con isoflavonas más una administración exógena de genisteína y daidzeína; G3- ovejas alimentadas con una dieta sin isoflavonas; G4- ovejas alimentadas con una dieta sin isoflavonas más una administración exógena de genisteína y daidzeína. Los resultados muestran un aumento de los niveles de nitrofurantoína en la leche de las ovejas alimentadas sin isoflavonas (G3) disminuyendo los residuos de nitrofurantoína en leche cuando las isoflavonas estaban presentes en la alimentación (G1 y G2) o administradas vía intragástrica (G4). Los valores de Cmax en la leche fueron signifi-

cativamente mayores en los grupos sin isoflavonas en el forraje (G3, G4). Los niveles plasmáticos de nitrofurantoína no fueron diferentes entre los grupos mostrando una alta variación interindividual. Todos estos resultados parecen apuntar a un control viable de la secreción de la leche a través de las isoflavonas en la dieta cuando el fármaco es un buen sustrato ABCG2/BCRP.

Por ello, en el **cuarto artículo**, determinamos si genisteína y daidzeína pueden disminuir el paso a leche de la danofloxacina. En un primer estudio *in vitro* en células MDCKII transducidas con ABCG2/BCRP demostramos que ambas isoflavonas inhiben el transporte de danofloxacina. Además, el transporte de danofloxacina en leche fue estudiado en ovejas Assaf. El diseño experimental incluía tres grupos: ovejas alimentadas con un forraje estándar, ovejas alimentadas con un forraje enriquecido con isoflavonas 15 días previos al experimento, y ovejas alimentadas con un forraje estándar más una coadministración intragástrica de genisteína y daidzeína. Los niveles de danofloxacina en leche del grupo con la dieta enriquecida en soja fueron menores. El AUC (0-24h) fue $9,3 \pm 4,6$ versus $16,58 \pm 4,44 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ con respecto al grupo alimentado con forraje estándar. Los niveles plasmáticos no se vieron modificados. El ratio AUC (0-24h) leche/AUC (0-24h) plasma, disminuyó hasta en un 50% en el grupo con la dieta enriquecida en soja con respecto al grupo control ($4,90 \pm 2,65$ vs. $9,58 \pm 2,17$). La administración exógena de isoflavonas no modificó la secreción de danofloxacina a leche. La conclusión relevante de este estudio es que la excreción en leche de un sustrato específico de ABCG2/BCRP como la danofloxacina puede disminuir con la presencia de isoflavonas en la dieta.

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1) TRANSPORTADORES ABC: ABCG2/BCRP

El transportador ABCG2/BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) es un miembro de la familia de los transportadores de membrana dependientes de ATP, denominados transportadores ABC, debido a su denominación en inglés: ATP-Binding Cassette.

Este grupo de transportadores constituyen una super familia de proteínas que actúan como transportadores activos o «bombas exportadoras». Son proteínas ampliamente distribuidas que participan en procesos de transporte y detoxificación celular (Schnepp *et al.*, 2013). De forma fundamental transportan metabolitos y tóxicos cuya expulsión fuera de la célula beneficia y protege las funciones celulares. Se caracterizan por tener amplia especificidad de sustratos pudiendo transportar de forma activa compuestos de distinta naturaleza, muchos de ellos con importantes acciones terapéuticas en dianas celulares.

La relevancia farmacológica de este importante grupo de transportadores, se debe a que alguno de ellos, tales como la glicoproteína P (MDR1/ABCB1), los MRPs/ABCCs y la ABCG2/BCRP, son responsables de la «multirresistencia» frente a compuestos antitumorales debilitando su acción quimioterapéutica en las células.

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

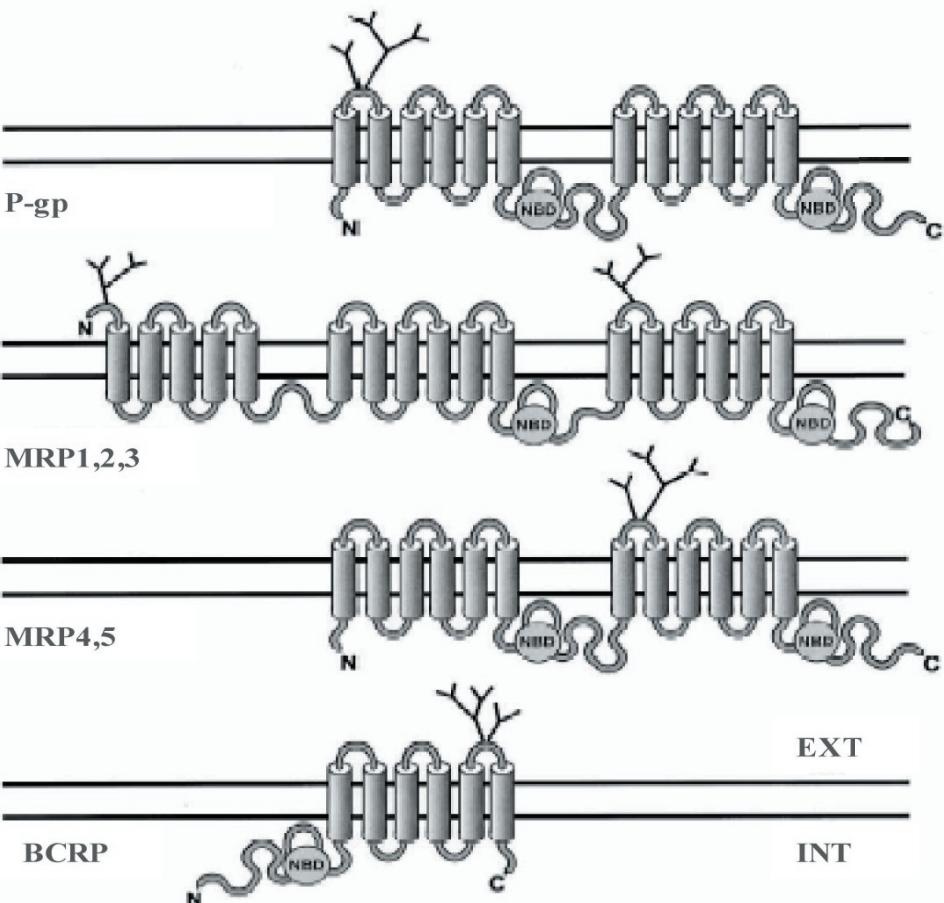
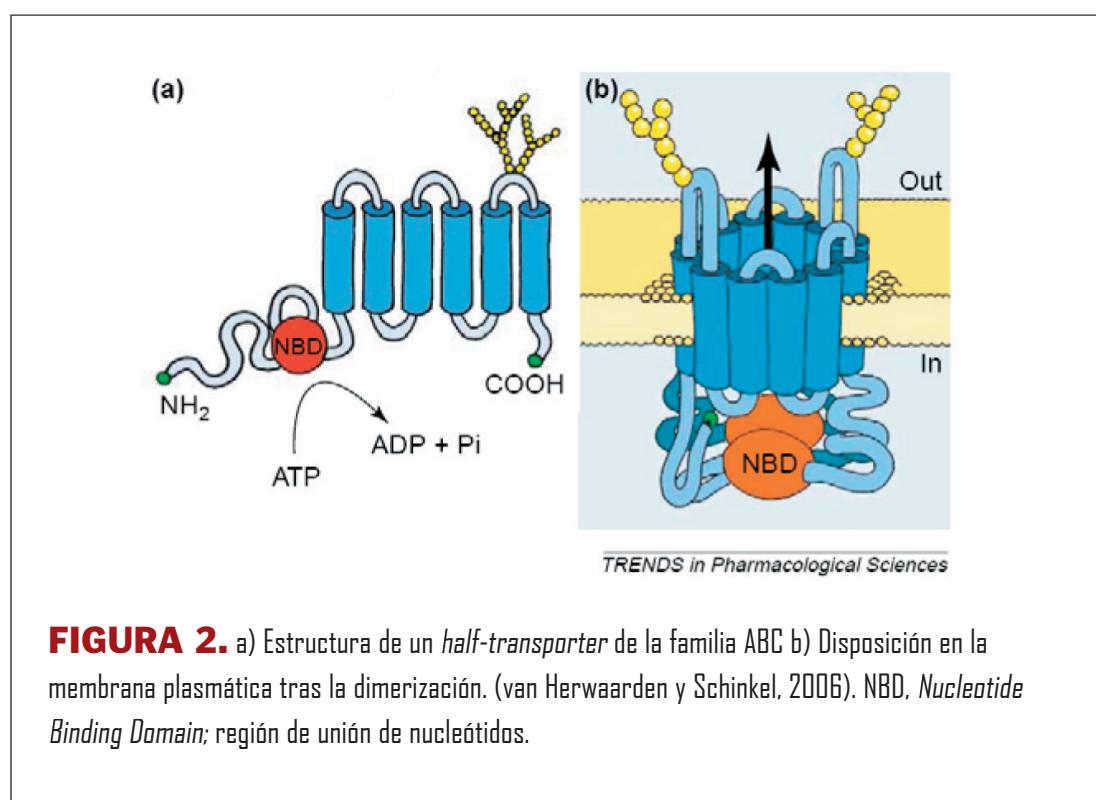


FIGURA 1. Estructura general de la familia de transportadores ABC. Se muestran 4 tipos en los que se engloban glicoproteína P, MRP1-6 y BCRP. La orientación intracelular (INT) y extracelular (EXT) indicada para ABCG2/BCRP es válida para el resto de los transportadores. (Schinkel y Jonker, 2002). NBD, *Nucleotide Binding Domain*; región de unión de nucleótidos.

La amplia presencia de estas proteínas, prácticamente en todos los organismos vivos (Glavinas *et al.* 2004) con una estructura muy conservada, apoya su papel esencial en la protección de los organismos frente a metabolitos tóxicos y determinados compuestos exógenos, algunos de ellos, incluso presentes en la dieta. Algunos de estos transportadores están implicados en el transporte de diversas sustancias en el intestino, barrera hematoencefálica, placenta, etc. Su ámbito fisiológico se circunscribe al

transporte de lípidos, sales biliares, colesterol, hormonas, esteroides y diversos metabolitos (Fukuda *et al.* 2012).

La estructura básica que define a los miembros de esta familia de proteínas es la combinación de un lugar de unión al ATP y diferentes dominios transmembrana. En mamíferos, las proteínas ABC funcionalmente activas contienen doce dominios transmembrana distribuidos en dos mitades homólogas, dos zonas de unión al ATP ubicadas en la parte citoplasmática y un sitio de glicosilación. Esta estructura básica puede estar presente en una única proteína de una cadena polipeptídica («full-transporters»), o en dos proteínas separadas («half-transporters»), en este último caso los transportadores ABC necesitan una dimerización específica para su función (Glavinas *et al.* 2004). El transporte de compuestos se produce en contra de un gradiente de concentración siendo dependiente de ATP.



INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Estudios realizados en *Xenopus laevis* por Nakanishi *et al.*, (2003) confirman que ABCG2 es un half-transporter. La existencia del transportador en forma de homotetrámero fue demostrada por Hu *et al.*, (2004), esta estructura puede actuar como modulador de la forma homodímera.

1.1) Sustratos e inhibidores de ABCG2/BCRP

La proteína ABCG2/BCRP está implicada en el fenómeno de multirresistencia a fármacos (Polgar *et al.* 2008), y participa en la defensa frente a compuestos tóxicos y metabolitos de células y órganos.

La caracterización de los compuestos que actúan como sustratos e inhibidores de ABCG2/BCRP puede ser compleja considerando que dicho transportador presenta múltiples sitios de unión con distinta afinidad para sus sustratos (Muenster *et al.*, 2008). Es capaz de transportar un amplio espectro de compuestos, solapándose en algunos casos con sustratos de glicoproteína P y MRP1.

Los principales sustratos de la proteína son los antitumorales mitoxantrona, topotecan, metotrexato, irinotecan, indolcarbazoles, antifolatos e inhibidores de tirosina quinasas como imatinib, gefitinib y erlotinib, confiriendo a las células resistencia frente a estas citotoxinas (Van Herwaarden *et al.* 2006), ya que la mayoría de las células que sobreexpresan ABCG2/BCRP son resistentes a agentes quimioterapéuticos (Polgar *et al.* 2008).

Las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina y danofloxacina (Merino et al. 2006; Real *et al.* 2011), enrofloxacina (Pulido *et al.*, 2006), difloxacina y marbofloxacina (González-Lobato, 2012-Tesis Doctoral) y el antibiótico nitrofurantoína (Merino *et al.* 2005), son sustratos de ABCG2/BCRP, por

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

lo que su interacción con el transportador podría afectar a su biodisponibilidad y a su distribución tisular.

En cuanto a las características estructurales de los sustratos de ABCG2/BCRP, varios estudios han reflejado que moléculas con el anillo de las camptotecinas, o análogos estructurales, son sustratos de ABCG2/BCRP (Bates *et al.* 2004). También se ha sugerido que la presencia de un grupo amino unido a un anillo heterocíclico, así como la fusión de anillos heterocíclicos es determinante en las interacciones de compuestos con el transportador. Giacomini *et al.* (2010), por otra parte, argumentan que es común que las moléculas que interactúan con el transportador tengan una elevada polaridad.

ABCG2/BCRP también es transportador de la vitamina B2 y la biotina (Krishnamurthy *et al.* 2004), el ácido úrico y los ácidos biliares (Nakayama *et al.*, 2011), así como de la feoforbida que es un metabolito clorofílico empleado como fotosensibilizador en el tratamiento de tumores (Robey *et al.* 2004).

ABCG2/BCRP aumenta su expresión en condiciones de hipoxia y es capaz de proteger a las células y a los tejidos de la acumulación tóxica de protoporfirinas (Krishnamurthy y Schuetz *et al.*, 2006; Pick *et al.*, 2010).

La inhibición de la proteína permite la modulación de la biodisponibilidad de los fármacos, modificando su distribución tisular y por tanto la eficacia de sus sustratos. El primer inhibidor de ABCG2/BCRP descrito fue la fumitremorgina C (Rabindran *et al.* 2000), una toxina aislada de *Aspergillus fumigatus*, su análogo Ko143, es un inhibidor de ABCG2/BCRP ampliamente utilizado en ensayos de laboratorio (Allen *et al.* 2002).

Existe un amplio grupo de compuestos naturales capaces de actuar como inhibidores del transportador, entre los que se encuentra la curcumina, que produce un aumento

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

en la biodisponibilidad intestinal de la sulfasalazina (Shukla *et al.* 2009); así como los flavonoides naringenina, daidzeína y genisteína presentes en la dieta (Polgar *et al.* 2008). En relación con la inhibición de estos compuestos (Zhang *et al.* 2004), se ha observado que la interacción de ABCG2/BCRP con los distintos flavonoides está determinada por la presencia de un doble enlace en el anillo C, una hidroxilación en la posición 5, la ausencia de hidroxilación en la posición 3 y el residuo del anillo B en la posición 2.

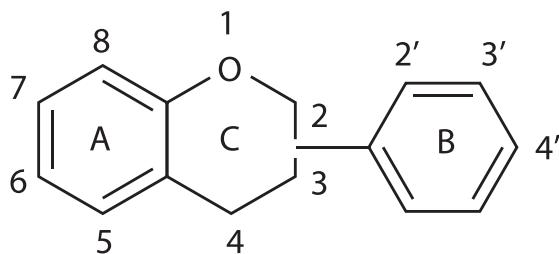


FIGURA 3. Estructura básica de los flavonoides.

Entre otros inhibidores de ABCG2/BCRP destacan compuestos antitumorales y antirretrovirales como el tariquidar (Mindermann *et al.* 2004), que también inhibe el transporte mediado por glicoproteína P y MRP1, así como fármacos como docetaxel, vinblastina, etopósido, digoxina, indinavir, saquinavir, tacrolimus, nelfinavir, talinolol e irinotecan (Oostendorp *et al.*, 2009).

Los inhibidores de ABCG2/BCRP tienen dos importantes implicaciones clínicas; primero, pueden mediar en la resistencia a fármacos en células tumorales (Henrich *et al.*, 2007), segundo, si son coadministrados con fármacos que son sustratos de ABCG2/BCRP pueden alterar su disposición (absorción, distribución y excreción)

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

(Breedveld *et al.*, 2004; Kuppens *et al.*, 2007). Muchos de los inhibidores de ABCG2/BCRP son también sustratos. En relación a la terapeútica veterinaria se ha descrito que los inhibidores de ABCG2/BCRP humana y de ratón también parecen ser inhibidores de ABCG2/BCRP en especies veterinarias estudiadas hasta la fecha como el gato (Ramirez *et al.*, 2011), aunque la mayoría de los inhibidores no son agentes que sean utilizados normalmente en clínica veterinaria, con la excepción de los inhibidores de tirosina kinasas, entre los que se encuentran imatinib, masitinib y el toceranib utilizados en la terapia antitumoral.

1.2) Distribución tisular de ABCG2/BCRP

La mayoría de los autores coinciden en la función protectora de ABCG2/BCRP frente a sustancias tóxicas (Nakanishi *et al.*, 2012) debido a que ABCG2/BCRP se expresa mayoritariamente en la membrana apical tanto de células secretoras (como en la zona reticular de la glándula adrenal, células de Sertoli/Leydig de los testículos o sincitiotrofoblastos en la placenta) como de células de órganos clave para la biodisponibilidad de fármacos como el intestino y el hígado. Otros tejidos donde se expresa el transportador son el tejido hematopoyético, la barrera hematoencefálica limitando la entrada de sus sustratos en el SNC y la glándula mamaria. De todos los tejidos donde podemos encontrar ABCG2/BCRP, la máxima expresión se encuentra en la placenta (Doyle y Ross, 2003), donde restringe la penetración de fármacos al feto (Schinkel *et al.*, 2003) y es destacable que también está presente en las células SP (side population) que es una subpoblación de las células stem (Zhou *et al.*, 2002), presentes en la médula ósea (Ding *et al.*, 2010).

En el tracto gastrointestinal, estudios iniciales revelaron altos niveles del

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

transportador en el intestino. Estudios sobre la expresión de ABCG2/BCRP a lo largo del tracto gastrointestinal humano revelaron que los niveles del transportador fueron más altos en el duodeno, y luego decrecían a lo largo del tracto gastrointestinal hasta llegar al ileo terminal, colon ascendente, transverso y descendente, y recto, donde se

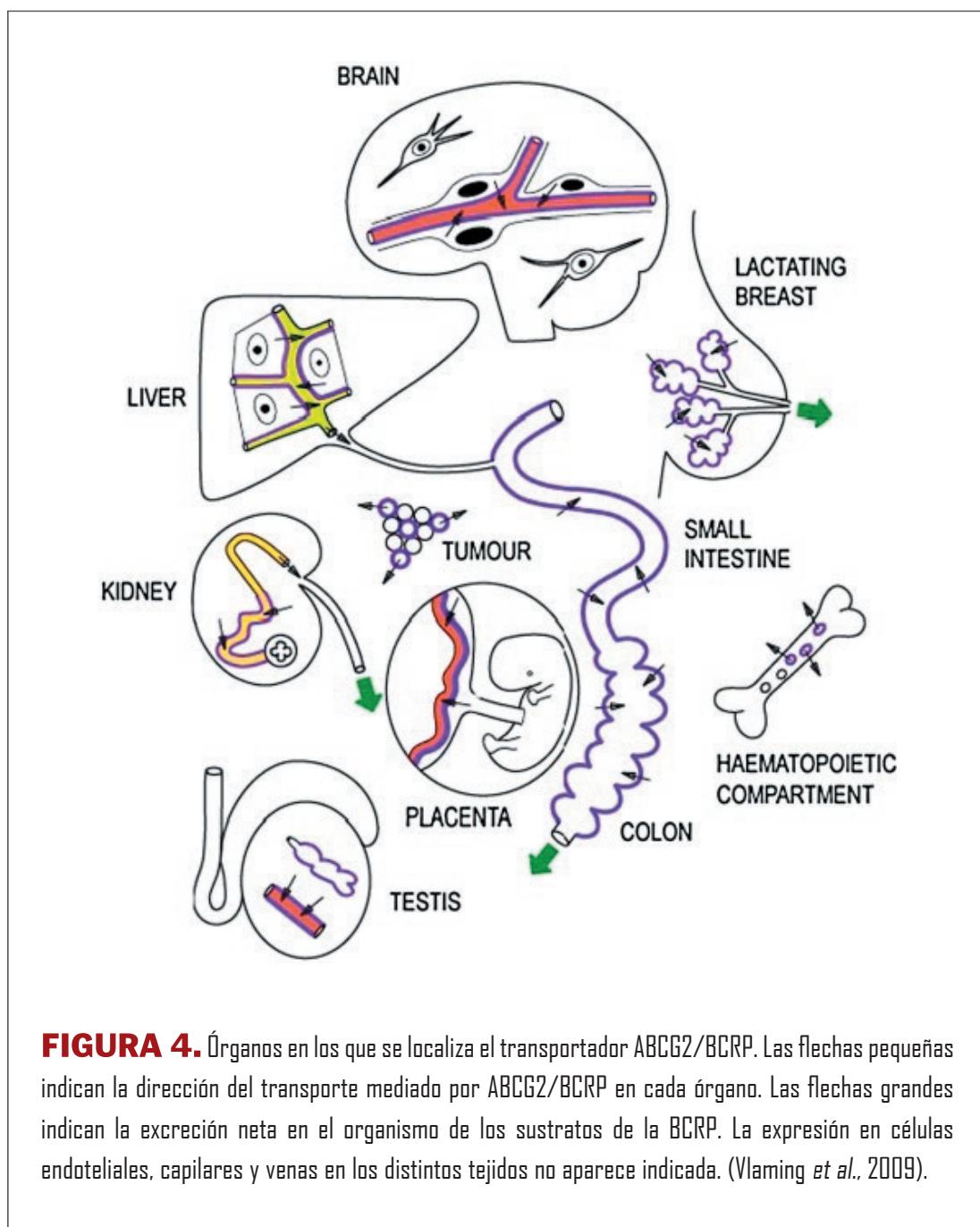


FIGURA 4. Órganos en los que se localiza el transportador ABCG2/BCRP. Las flechas pequeñas indican la dirección del transporte mediado por ABCG2/BCRP en cada órgano. Las flechas grandes indican la excreción neta en el organismo de los sustratos de la BCRP. La expresión en células endoteliales, capilares y venas en los distintos tejidos no aparece indicada. (Vlaming *et al.*, 2009).

encontraron menores niveles (Gutmann *et al.* 2005). La expresión de ABCG2/BCRP en el tracto intestinal sugiere que juega un papel determinante, limitando la absorción oral de sus sustratos.

En cuanto a su influencia en los procesos absorción, distribución y eliminación de fármacos, el hecho de que ABCG2/BCRP se exprese en el epitelio de los principales órganos relacionados con los citados procesos, hace que los fármacos que son sustrato de dicha proteína, puedan sufrir procesos de secreción activa en hígado, riñón, y si son administrados oralmente, sufrir una menor captación intestinal (Schinkel *et al.*, 2003).

2) IMPORTANCIA DE ABCG2/BCRP EN LA EXCRECIÓN DE FÁRMACOS A LECHE

La acumulación en la glándula mamaria de toxinas de la dieta y carcinógenos, además de los fármacos administrados a los animales puede causar problemas durante la producción láctea en el ganado lechero (Anderson *et al.* 1991; Grover *et al.* 2002), asociado a la aparición de residuos en leche. Los peligros para la salud a causa de estos residuos pueden ser tóxicos, microbiológicos e inmunopatológicos, al provocar alergias, hipersensibilidad o ser mutagénicos, teratogénicos y/o carcinogénicos (McManaman y Neville, 2003). Además, cada vez existen más estudios (Martin *et al.*, 2000; Williams y Philips, 2000; Mukherjee *et al.*, 2006) que evidencian un origen epigenético en el incremento del cáncer de mama, como resultado de alteraciones medioambientales y presencia de tóxicos en los alimentos. Por otra parte es importante destacar, que estos residuos causan graves daños económicos en la industria láctea, ya que la elaboración de derivados de la leche, como queso y yogur, necesita el desarrollo de la flora ácido-láctica, que es inhibida por la presencia de pequeñas concentraciones de antibióticos.

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el caso de los animales, los niveles de residuos de fármacos en leche están regulados, de forma explícita, a través de las agencias de control del medicamento. Así, la normativa legal dictaminada por la EMEA (European Medicine Agency) exige la espera, por parte de los productores, de un tiempo mínimo que garantice la eliminación del fármaco hasta niveles inferiores a los límites máximos de residuos. Sin embargo, este tiempo de espera que se asocia a pérdidas económicas por parte de los ganaderos, no siempre se cumple (Imperiale *et al.*, 2004).

La transferencia de fármacos a leche puede estar determinada inicialmente por la difusión pasiva que sería resultado de una distribución diferencial de los fármacos entre la leche y el plasma en función de sus diferentes propiedades físico-químicas. Se han desarrollado ecuaciones de regresión empíricas para predecir los niveles en leche de estos compuestos considerando parámetros tales como la unión a proteínas plasmáticas del fármaco, la lipofilicidad y la ionización (Ito *et al.*, 2003). En el caso de la secreción activa de fármacos hacia la leche, Cheng *et al.*, (2002), proponen la utilización del cociente entre las concentraciones de fármaco en leche y en plasma (ratio leche/plasma); generalmente, los fármacos secretados activamente hacia la leche presentan ratios leche/plasma por encima de la unidad.

La proteína ABCG2/BCRP ha sido identificada como transportador implicado en el transporte activo de xenotoxinas hacia la leche. Las determinaciones experimentales realizadas en mamíferos incluyen a rumiantes. Sin embargo este transportador no se expresa en el tejido epitelial mamario de hembras no lactantes. Estudios inmunohistoquímicos y por western-blot realizados en diferentes estados de desarrollo de la glándula mamaria, revelaron que ABCG2/BCRP no se expresa en ratones hembra de 8 ó 14 semanas de edad, pero en la lactación aumenta su expresión considerablemente,

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

disminuyendo durante la involución de la glándula. Esta proteína está localizada en la membrana apical de los alveolos (el principal sitio de producción de leche) pero no en los conductos (Jonker *et al.*, 2005).

La importancia de ABCG2/BCRP en la secreción láctea de diversos sustratos del transportador, entre los que se incluyen fármacos y toxinas, se demuestra al comparar ratones wild-type y ratones *Bcrp1*^{-/-} que no expresan el transportador. Los estudios realizados con el fármaco antitumoral topotecan y el carcinógeno presente en la dieta PhIP mostraron niveles muy elevados en la leche de ratones wild-type, mientras que en ratones *Bcrp1*^{-/-} la excreción en leche fue casi nula. Lo mismo ocurrió con los antibióticos aciclovir, cimetidina y nitrofurantoína (Jonker *et al.*, 2005; Merino *et al.*, 2005). Estas interacciones sugieren que ABCG2/BCRP es probablemente uno de los principales factores implicados en la secreción activa de xenotoxinas en leche.

Por otra parte, los fármacos identificados como sustratos para ABCG2/BCRP humana y de ratón también parecen ser sustratos de ABCG2/BCRP en especies veterinarias (Ramirez *et al.*, 2011), por lo que convendría su estudio en ganado productor de leche.

Si se tiene en cuenta que otros transportadores ABC localizados en la membrana apical como la glicoproteína P y MRP2 no están presentes en la glándula mamaria en lactación, los resultados de todos estos estudios identifican a ABCG2/BCRP como responsable de la transferencia de fármacos, carcinógenos y toxinas dietéticas hacia la leche.

Existen diferentes teorías acerca de la inducción de la expresión de ABCG2/BCRP en la glándula mamaria en lactación. La primera de ellas y la más aceptada es que aumenta su expresión para transportar nutrientes de la madre al feto, como los folatos y

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

la vitamina B12, pero no es la única; también se ha sugerido la necesidad de las madres lactantes de tener rutas extra de eliminación de compuestos tóxicos. Estudios recientes han demostrado la presencia de la proteína en la submucosa intestinal de las crías, lo que podría indicar la restricción de la absorción intestinal de los sustratos de ABCG2/BCRP administrados en la leche. Otra hipótesis asume la transferencia de xenobióticos a la leche para inducir los sistemas de detoxificación de sustancias de las crías, esta teoría tiene un sentido biológico ya que las crías cuando sean adultas recibirán la misma alimentación que sus madres. Por último, se ha barajado la posibilidad de que la transferencia de pequeñas cantidades de xenobióticos en la leche puede reducir la probabilidad de desarrollar intolerancias o alergias durante el desarrollo posnatal y el crecimiento (Vlaming *et al.*, 2009).

La implicación de ABCG2/BCRP en la excreción de fármacos a la leche también ha sido demostrada en animales domésticos. Pulido *et al.*, (2006) demostraron que la coadministración de enrofloxacina con inhibidores de ABCG2/BCRP en ovejas de producción lechera disminuyó el paso del fármaco a la leche sin verse afectados los niveles plasmáticos del mismo.

Los contaminantes medioambientales persistentes, como las dioxinas y los PCB, pueden acumularse en la leche y provocar exposiciones en los consumidores. También se hallan en la leche metales pesados tales como el metilmercurio y el plomo (Molen *et al.* 1996). Además de los compuestos ya comentados, diversas sustancias consideradas (pro)carcinogénicas entre las que se encuentran aminas heterocíclicas, micotoxinas de tipo aflatoxina, determinados compuestos fototóxicos y metabolitos del benzopireno, considerado como uno de los principales carcinógenos asociado a la dieta, son sustratos de ABCG2/BCRP (Ebert *et al.*, 2006). La elevada expresión de

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ABCG2/BCRP en la glándula mamaria hace necesario profundizar en el estudio de la modulación de su función en la secreción de fármacos y tóxicos hacia la leche.

Ebert *et al.*, (2006), han demostrado una posible vía de inducción de ABCG2/BCRP a través la vía de señalización del receptor aril hidrocarbonado (AhR). Este receptor está implicado en la señalización de numerosas vías detoxificantes incluyendo sistemas de biotransformación tanto de fase I como de fase II. Diversos derivados fitoquímicos (quercitina, crisina, flavona, indol-3- carbinol) son capaces de inducir ABCG2/BCRP a través de AhR, y, consecuentemente el transporte de sus sustratos. Recientemente se ha demostrado que tanto la dioxina, como el fungicida procloraz son capaces de inducir la expresión de ABCG2/BCRP en células epiteliales mamarias de bovino a través de la activación del receptor nuclear AhR (Halwachs *et al.*, 2013). Los autores destacan que el conocimiento del gen ABCG2/BCRP como «diana» de este tipo de compuestos ayudará a aumentar la protección frente a este tipo de compuestos tanto a los consumidores de productos lácteos como a los lactantes.

En contraste, la concentración del antiviral aciclovir en la leche mediado por el transportador ejerce un beneficio en la terapia farmacológica, ya que reduce la transmisión de virus de la madre a la cría (Boalaert *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2003), esto resulta muy beneficioso en países en vías de desarrollo donde los medios para prevenir enfermedades son mucho menores.

Uno de los fármacos más estudiados en relación a ABCG2/BCRP y su elevada transferencia a leche es la nitrofurantoína, que tiene una excreción 20 veces más alta en la leche humana que la predicha para la difusión pasiva (Gerk *et al.*, 2001). La nitrofurantoína se prescribe a mujeres lactantes en caso de infección, el bebé ingiere un 6% de la dosis materna (0,2 mg/kg/día), aunque es una modesta exposición, puede

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ser importante para los niños con hipersensibilidad a la nitrofurantoína. Merino *et al.*, (2005), demostraron administrando nitrofurantoina a una dosis de 5 mg/kg que ese fármaco se concentraba 76 veces más en leche de ratones wild-type que en Bcrp1^{-/-}. Estos resultados han permitido que la nitrofurantoina sea considerada por distintos autores como sustrato tipo de ABCG2/BCRP (Wright *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012; Barrera *et al.*, 2012).

En el caso de las lactonas macrocíclicas como la moxidectina o la ivermectina, tienen propiedades farmacocinéticas que las hacen adecuadas para actuar contra los endo- y ectoparásitos en animales y en el hombre ya que tienen una alta solubilidad lipídica lo que las permite llegar con facilidad a la glándula mamaria, siendo potenciales sustratos de ABCG2/BCRP. Actualmente se han hecho sutiles cambios en su formulación para reducir su distribución tanto en glándula mamaria como en el sistema nervioso central, permitiendo el uso de la selamectina en razas de perro «Collie», así como el uso de la eprinomectina en el ganado lechero con un tiempo de espera nulo en la leche (McKellar *et al.*, 2012).

Las fluoroquinolonas como la enrofloxacin y la danofloxacin son utilizadas en hembras en lactación y su paso a leche está mediado por ABCG2/BCRP (Pulido *et al.*, 2006; Schrickx *et al.*, 2007; Real *et al.*, 2011). Estudios realizados en esplenocitos de pollo que sobreexpresaban glicoproteína P, MRPs y ABCG2/BCRP, demostraron que de las fluoroquinolonas evaluadas, la danofloxacin era la que mayor interacción tenía con ABCG2/BCRP (Haritova *et al.*, 2008), por lo que su estudio en ovejas productoras de leche sería muy interesante. Ambos fármacos son administrados por vía parenteral en procesos severos de inflamación aguda de la glándula mamaria causados por bacterias gram-negativas que alcanzan niveles terapéuticos en la leche

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de vaca (Kaartinen *et al.*, 1995; Rantala *et al.*, 2002; Shem-Tov *et al.*, 1998) y en otros rumiantes (Escudero *et al.*, 2007). El transporte activo de fármacos a través de ABCG2/BCRP puede ser utilizado en el desarrollo de nuevos fármacos indicados para el tratamiento de la mastitis, en particular para infecciones causadas por patógenos extracelulares. Por otro lado, los fármacos que son sustratos de ABCG2/BCRP e indicados para el tratamiento de patologías en otros órganos serán excretados a la leche, resultando en su contaminación y en el establecimiento de periodos de espera para el ganado lechero.

La proteína ABCG2/BCRP al igual que otros transportadores ABC presenta polimorfismos genéticos, que son variaciones de DNA entre los distintos individuos de una población. Pueden existir variaciones individuales en la secuencia, ya sean inserciones/deleciones o sustituciones de una sola base nitrogenada (Single Nucleotide Polymorphism; SNP). El estudio de los SNP resulta de gran interés para la investigación biomédica, en especial los que afectan a proteínas que participan en el metabolismo y transporte de estos fármacos. Dentro de los polimorfismos presentes en el transportador ABCG2/BCRP, Cohen-Zinder *et al.*, (2005), descubrieron en rumiantes el polimorfismo Y581S que se localizó en el exón 14 del gen bovino. Estos autores relacionaron el SNP con un mayor contenido en grasa y proteínas en leche y una menor producción en vacas de raza Holstein. Estos resultados fueron confirmados más adelante en estudios realizados por Olsen *et al.*, (2007) en vacas Rojas Noruegas. Los efectos del SNP fueron similares en las dos poblaciones, con un aumento del 0,15% de proteína y 0,14% de grasa en vacas Rojas Noruegas y del 0,13% de proteína y 0,09% de grasa en vacas Holstein respecto a los valores correspondientes a las poblaciones que expresaban el alelo wildtype. Estudios realizados por Ron *et al.*,

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

(2006), para conocer la prevalencia de cada una de las variantes, mostraron que la Y581 fue predominante en la mayoría de las razas estudiadas.

En cuanto al efecto del SNP Y581S bovino sobre el transporte de fármacos, estudios iniciales de nuestro grupo de investigación, tras su clonación y expresión transitoria, demostraron diferencias significativas en la acumulación de mitoxantrona entre ambas variantes (Merino *et al.*, 2009). Posteriormente, la generación de células MDCKII con expresión estable de ambas variantes, permitió demostrar que la variante Y581S bovina muestra un mayor transporte *in vitro* de algunas fluoroquinolonas (Real *et al.*, 2011), siendo estos resultados extrapolables a la situación *in vivo* al menos en el caso de la danofloxacina (Otero *et al.*, 2013). En cuanto a ABCG2/BCRP de oveja, Duncan *et al.*, (2007) secuenciaron el cDNA del transportador en oveja a partir de muestras de hígado, y hallaron dos polimorfismos sinónimos, G554A y C973T. García-Fernández *et al.*, (2011) han identificado nueve SNPs sinónimos de ABCG2 en ovejas Churras, tres de los cuales (localizados en el intrón 3, exón 6 y exón 9) podrían intervenir en el porcentaje de grasa de la leche. En la actualidad se desconoce si estos polimorfismos pueden afectar el transporte de fármacos sustratos de ABCG2/BCRP hacia la leche.

3) POLIFENOLES

Los polifenoles constituyen un amplio grupo de productos naturales presentes en los vegetales, muchos de ellos sintetizados por las plantas como arma biológica eficaz en la protección frente a la radiación UV, infecciones fúngicas, etc. Se han descrito más de 6500 compuestos diferentes, agrupados en distintas familias. Los flavonoides constituyen el grupo más importante; su estructura está caracterizada por la presencia de un anillo de cromano al que se une un anillo aromático en posición 2, 3

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

o 4 y se clasifican basándose en las diferentes sustituciones y en el estado de oxidación del anillo C del cromano distinguiéndose: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y chalconas. Otros grupos relacionados son: Lignanos y Estilbenos.

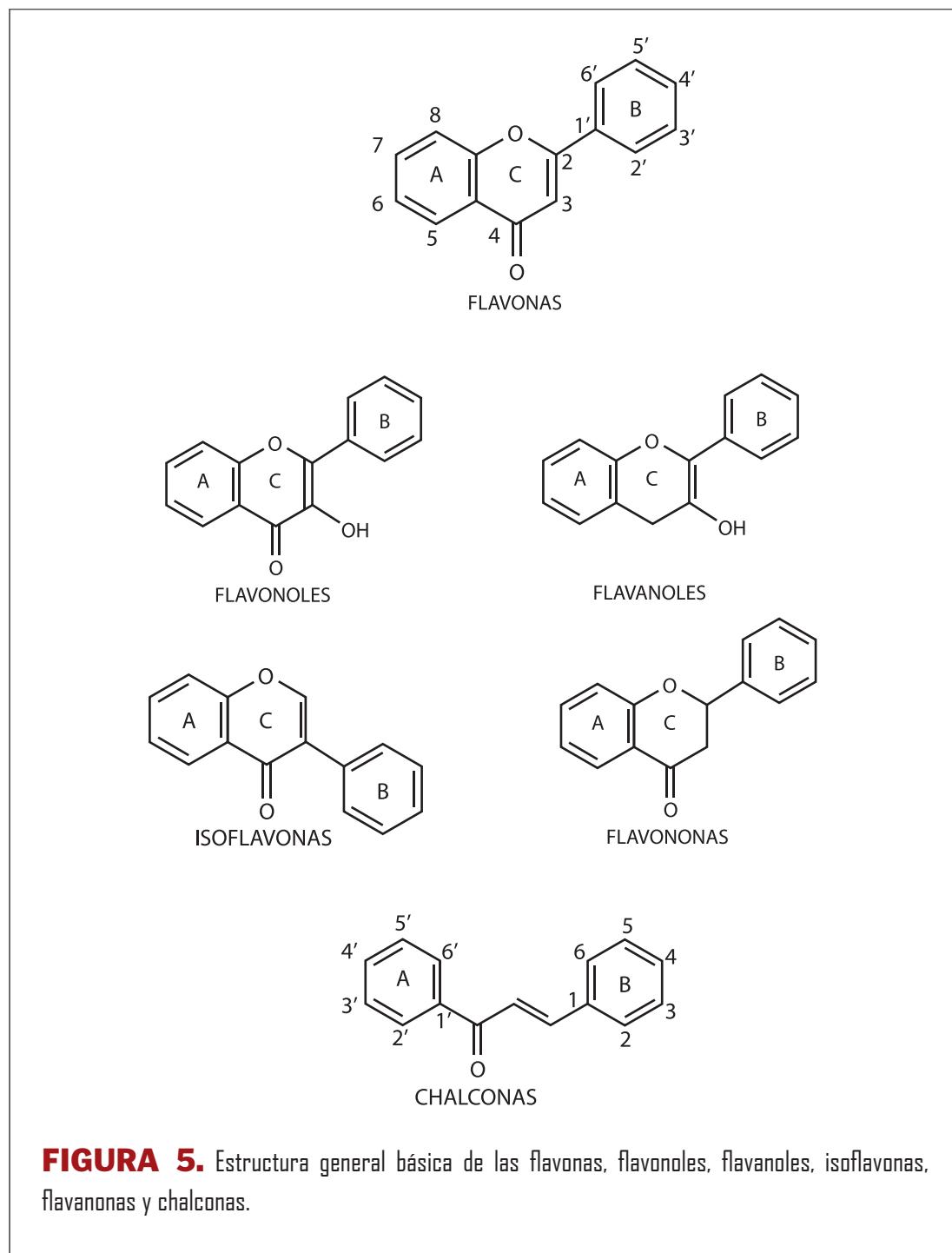


FIGURA 5. Estructura general básica de las flavonas, flavonoles, flavanoles, isoflavonas, flavanonas y chalconas.

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las isoflavonas constituyen un grupo particularmente abundante en la soja (100g de soja contienen 100-200 mg de isoflavonas). Las isoflavonas daidzeína y genisteína, y las flavonas apigenina y luteolina han sido identificadas como los principales flavonoides acumulados en los cotiledones de la soja. La soja es ampliamente usada como aporte proteico en el forraje para la alimentación animal (Broderick *et al.*, 1995) y las isoflavonas son encontradas en leche en el rango de µg/ml (Antignac *et al.*, 2003).

En el caso de las agliconas genisteína y daidzeína que se presentan como glucósidos en los extractos de soja (denominados genistina y daidzina), su elevada polaridad y su tamaño hace necesario su hidrólisis por glucosidasas presentes en la mucosa o secretadas por la flora presente en el colon (Day *et al.*, 1998). El tiempo necesario para obtener concentraciones máximas plasmáticas tras administraciones orales de genistina y daidzina es mucho mayor que el obtenido cuando se suministran las correspondientes agliconas (9h vs 2h) sin detectarse nunca niveles de glucósidos en plasma (Setchell *et al.*, 2001).

Una vez absorbidos, estos compuestos sufren extensos procesos de glucuronidación y sulfación intestinal y hepática (Zhang *et al.*, 2007) siendo los derivados conjugados las especies predominantes en el plasma tras administración oral. Las agliconas están presentes en la circulación en un rango de concentración muy bajo aunque su presencia es persistente debido, en la mayoría de los casos, a la circulación enterohepática de los metabolitos conjugados, a la acción conjunta de proteínas exportadoras y procesos de deconjugación intestinales y hepáticos (Chen *et al.*, 2005). De forma simultánea, todos estos compuestos pueden ser metabolizados por el citocromo P450, como se ha demostrado en estudios *in vitro* mediante microsomas (Hu *et al.*, 2003; Moon *et al.*,

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2006), aunque se desconoce la importancia de dichos procesos *in vivo*, ya que estos metabolitos no se detectan en el plasma.

Los estudios de biodisponibilidad consideran generalmente que las agliconas son los principales compuestos activos, aunque cada vez existen más evidencias que describen la actividad biológica de los glucurónidos (quercetina y epicatequina) (Jeong *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Zhang *et al.*, (1999) demuestran que los glucurónidos de genisteína y daidzeína activan a las células NK en un rango de concentraciones nutricionales. Por otra parte, estos compuestos pueden ejercer sus acciones celulares tras deconjugarse a través de las actividades sulfatasas y glucuronidasas presentes en el retículo endoplásmico, junto con las actividades UDP-glucuronil transferasas y sulfotransferasas (Manach *et al.*, 2004). Es importante señalar la importancia de los experimentos *in vivo* en los estudios de biotransformación y biodisponibilidad de los polifenoles dietéticos y de la actividad biológica de los metabolitos (Chung *et al.*, 2008; Mortensen *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2010).

Los fitoquímicos han sido estudiados por su potente efecto terapéutico en la inactivación de las cascadas de señalización, como la NF-kB, relacionadas con el desarrollo de tumores (Banerjee *et al.*, 2005, 2009; Kunnumakkara *et al.*, 2007) y por su escasa toxicidad en ensayos clínicos; por ejemplo, CBT-1, alcaloide empleado en la terapia antitumoral, resultó ser un buen inhibidor del transporte de paclitaxel mediado por glicoproteína P (Oldham *et al.*, 2000) y la curcumina mostró efectos biológicos positivos como modulador de los transportadores ABC en pacientes con cáncer pancreático (Dhillon *et al.*, 2009).

La interacción de los transportadores ABC con los polifenoles tiene su mayor aplicabilidad en el campo de la terapia antitumoral en relación con la multirresistencia.

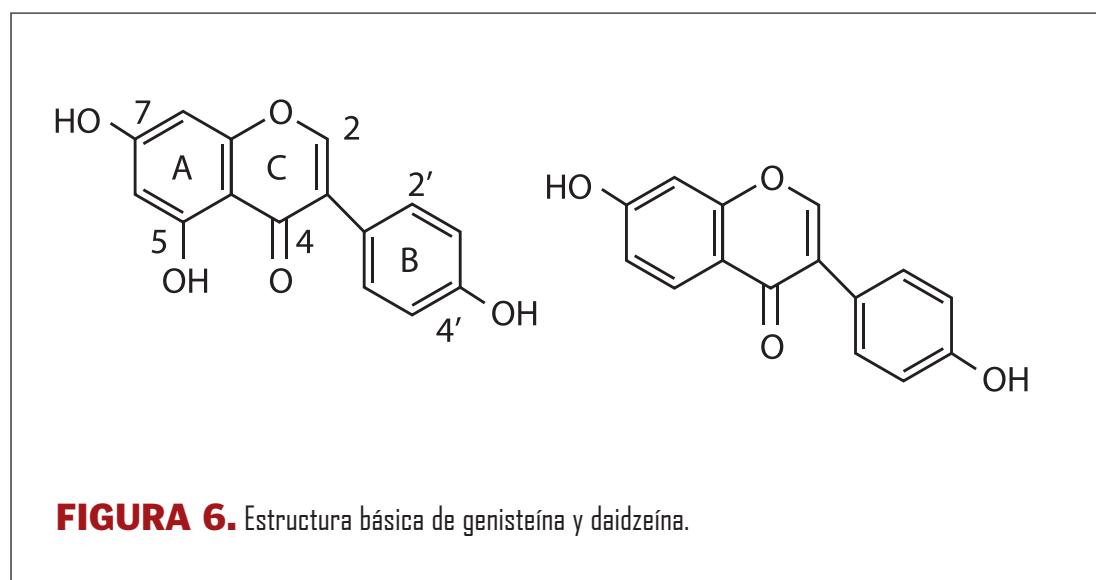
INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la última década más del 70% de las sustancias identificadas como sustratos e inhibidores de los transportadores ABC son productos naturales o derivados sintéticos de los mismos (Shukla *et al.*, 2008). Existen diversas revisiones acerca de la interacción de los este tipo de compuestos también conocidos como «fitoquímicos» con los transportadores ABC y su potencial aplicación en el cáncer (Li *et al.*, 2010; Shukla et al., 2011; Li *et al.*, 2013). Entre estas interacciones podemos citar la actividad de genisteína, naringenina, acacetina y kampferol inhibiendo el transporte de mitoxantrona en una línea celular tumoral sanguínea que expresa ABCG2/BCRP (Imai *et al.*, 2003, 2004), o la actividad de indol-3-carbinol, curcumina, resveratrol y epigalocatequina inhibiendo el paso de fármacos citotóxicos en diversos tipos de células tumorales (Imai *et al.*, 2003; Nabekura *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005; Chearwae *et al.*, 2006).

En relación a la interacción de los flavonoides con ABCG2/BCRP, se ha descrito también que 3,4,7-trimetoxiflavona, crisina, biochanina A, silimarina, hesperetina, quercitina y daidzeína son potentes inhibidores de la proteína, mostrando una alta afinidad (Cooray *et al.*, 2004 ; Imai *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2004). Más recientemente, se ha demostrado que los flavonoides crisoenoíl, laricitrina, myricetina trimetileter, pirocembrina, quercitrina, tamarixetina, tricetina y tricetina trimetileter son inhibidores de ABCG2/BCRP (Tan *et al.* 2013). Los estudios han indicado que estas interacciones ocurren también *in vivo*. En ratas, la coadministración con crisina incrementó significativamente la biodisponibilidad de la nitrofurantoína, sustrato específico de ABCG2/BCRP (Wang y Morris, 2007). En un estudio de perfusión cerebral en ratas, la acumulación de quercitina se incrementó tras el pretratamiento con GF120918, inhibidor de ABCG2/BCRP y glicoproteína P, pero no tras la

administración de PSC833, inhibidor de glicoproteína P, lo que demostraría la clara interacción en la barrera hematoencefálica entre los flavonoides y ABCG2/BCRP (Youdim *et al.*, 2004).

Las interacciones *in vitro* de las isoflavonas genisteína y daidzeína, con varios transportadores ABC, incluyendo ABCG2/BCRP han sido también muy estudiadas (Morris *et al.*, 2006).



Zhang *et al.*, (2004) investigaron el efecto inhibitorio de 20 flavonoides, entre ellos, genisteína y daidzeína, mediante la acumulación de mitoxantrona en células MCF-7 sobreexpresando ABCG2/BCRP. La mayoría de estos compuestos evaluados a una concentración de 50 µM podían incrementar significativamente la acumulación de mitoxantrona. Como control para verificar el efecto inhibitorio de los flavonoides se empleó fumitremorgin C, inhibidor tipo de ABCG2/BCRP. La inhibición de glicoproteína P por parte de genisteína fue demostrada por Zhang *et al.*, (2003) utilizando sustratos fotoactivos, y la inhibición de MRP se demostró en vesículas

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de membrana donde la conjugación de este flavonoide no tiene lugar (Leslie *et al.*, 2001).

Los resultados presentados por Imai *et al.*, (2004), confirman que la genisteína y la daidzeína, muestran un significativo efecto inhibitorio de ABCG2/BCRP. Por otra parte, se han obtenido efectos aditivos de múltiples flavonoides sobre la inhibición del transportador (Zhang *et al.*, 2004).

El mecanismo de inhibición de los flavonoides puede seguir una doble vía: a través de la inhibición competitiva en el sitio de unión del sustrato (dominio NBD) o interfiriendo la actividad ATPasa de ABCG2/BCRP (Cooray *et al.*, 2004). Este primer mecanismo se confirmó en experimentos realizados por Zhang *et al.*, (2005), en los que demostraron que crisina y 7,8-benzoflavona inhibían el transporte de nitrofurantoína en ratas pero no el transporte de topotecan, indicando que la interacción de los flavonoides con ABCG2/BCRP podría ser dependiente del sustrato. Estudios recientes también han demostrado que los flavonoides con O-metilación en las posiciones 3', 4' o 5' presentan mejor inhibición de ABCG2/BCRP que sus análogos hidroxilados (Tan *et al.*, 2013).

Por otra parte la coadministración de flavonoides con sustratos de transportadores ABC puede alterar la farmacocinética y consecuentemente incrementar la efectividad o la toxicidad de los sustratos del transportador (Li *et al.*, 2010). En el caso de ABCG2/BCRP, al presentar una expresión muy elevada en el tracto intestinal, la interacción del transportador con sus sustratos puede modificar la absorción de los mismos. En un trabajo ya comentado anteriormente, la curcumina que actúa como inhibidor de ABCG2/BCRP aumenta la biodisponibilidad de la sulfasalazina en ratones wild-type pero no en Bcrp1^{-/-}. Así mismo los transportadores ABC también pueden actuar

como una barrera para la absorción de fármacos y de fitoquímicos al exportar al tracto gastrointestinal derivados glucurónidos y sulfatos, vinculados a los sistemas de biotransformación de fase II. (Zhang *et al.*, 2007).

La mayoría de los experimentos realizados con flavonoides señalan dentro de los transportadores ABC a MRP2 como el principal transportador implicado en el transporte intestinal de los glucurónidos, mientras que el transporte de sulfatos se realiza de forma preferente por ABCG2/BCRP (van de Wetering *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2008; Juan *et al.*, 2010). Recientemente se ha demostrado también la importancia de ABCG2/BCRP en el transporte de glucurónidos y sulfatos utilizando ratones Bcrp1^{-/-} en los que se obtenían valores plasmáticos muy elevados para estos metabolitos tras administración oral de las isoflavonas genisteína y daidzeína, lo que avala la importancia del transporte intestinal de los conjugados mediado por el transportador (Alvarez *et al.*, 2011). Por último señalar que este tipo de compuestos tienen ventajas en la terapia antitumoral debido a su escasa toxicidad habiéndose descrito en modelos animales resultados favorables a dosis elevadas de los mismos (Middleton *et al.*, 2000; Juan *et al.*, 2002).

4) SUSTRATOS DE ABCG2/BCRP UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

4.1. MOXIDECTINA

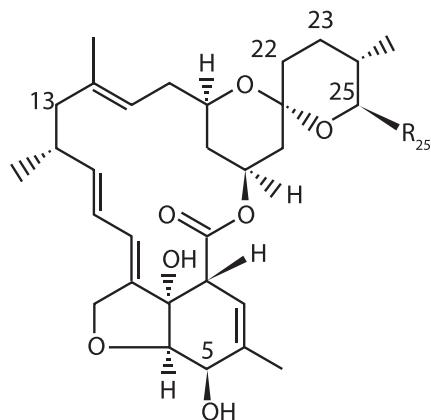
La moxidectina es una lactona macrocíclica perteneciente a la familia de las milbemicinas.

El descubrimiento de la actividad frente a nematodos de este grupo abrió una nueva etapa en el tratamiento de infecciones endo y ecto parasitarias en medicina animal y humana (Shoop *et al.*, 1995).

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 7.

Estructura química general de la familia de las milbemicinas y sus principales componentes.



Milbemicina D: $R_5 = OH$ $R_{25} = CH(CH_3)_2$

Milbemicina A₃/A₄: $R_5 = OH$ $R_{25} = CH_3$ y C_2H_5

Milbemicina A₃/A₄ 5-Oxime: $R_5 = OH$ $R_{25} = CH_3$ y C_2H_5

Moxidectina D: $R_5 = OH$ $R_{25} = \text{Y}=\text{Y}R_{23} = NOCH_5$

La moxidectina es un compuesto de naturaleza lipofílica. Esta característica es la causa de su rápida absorción en ovejas. Estudios en terneros, han revelado que una formulación menos acuosa de moxidectina tiene un bajo ratio de absorción, bajos niveles en el plasma, pero un tiempo de permanencia en el organismo mayor en comparación con la formulación acuosa (Mckellar *et al.*, 2012).

El desarrollo de resistencias a este compuesto está relacionado con mutaciones que afectan la capacidad del fármaco para unirse al segmento diana de los canales de Cl^- (Blackhall *et al.*, 1998). Otra hipótesis que se estudia en el desarrollo de resistencias a esta familia de fármacos es la posible implicación de transportadores ABC. Xu *et al.*, (1998), encontraron que el verapamilo, agente que invierte el fenómeno de multirresistencia de fármacos y conocido inhibidor de la glicoproteína P, mejora la eficacia de la ivermectina y la moxidectina un 13 y 26%, respectivamente. Molento y Prichard (2001), avalan los resultados obtenidos por Xu *et al.*, (1998), en que la

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ivermectina y moxidectina mostraron un incremento significativo de su eficacia (52,8 y 58,5% respectivamente) cuando se usaron en combinación con el verapamilo frente a cepas seleccionadas con moxidectina; el CL347,099, análogo del verapamilo, también incrementó significativamente la eficacia de la ivermectina y moxidectina en 24,2 y 40%, respectivamente, frente a cepas seleccionadas con ivermectina y en un 40 y 75,6%, en el caso de la moxidectina.

Entre las macrolactonas comercializadas, la eprinomectina, doramectina y abamectina inhiben el transporte llevado a cabo por la glicoproteína P y su actividad ATPasa, al igual que la ivermectina. Sin embargo, la moxidectina presenta menor afinidad por glicoproteína P y menor inhibición. La selamectina muestra un comportamiento intermedio; se parece a la ivermectina en términos de inhibición (Lespine *et al.*, 2007) y transporte (Griffin *et al.*, 2005; Brayden *et al.*, 2008), pero presenta menor afinidad por el transportador. Lespine *et al.*, (2007), sugirieron que la menor afinidad de la selamectina y la moxidectina por la glicoproteína P podría estar relacionada con la variación de los residuos de azúcares presentes en su estructura. Así mismo, Griffin *et al.*, (2005), estudiaron el transporte *in vitro* de la ivermectina, selamectina y moxidectina en dos modelos celulares que expresan glicoproteína P en células epiteliales de intestino (Caco-2) y linfocitos caninos. Los autores observaron que ivermectina, selamectina y moxidectina son sustratos de la glicoproteína P con ratios absorción/secreción de 7,5; 4,7; y 2,6, pero el verapamilo, inhibidor de la glicoproteína P, solamente inhibió el transporte de la ivermectina y la selamectina.

También se ha estudiado, en cultivos de hepatocitos de rata, la influencia del verapamilo sobre la moxidectina, observándose que la cantidad de moxidectina en las células se incrementa después de 24, 48, y 72 horas de cultivo, resultado que hace pensar

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

que la glicoproteína P puede estar implicada en el transporte de la moxidectina (Dupuy *et al.*, 2001). Posteriormente, estos autores investigaron, utilizando estos mismos cultivos primarios y mediante estudios farmacocinéticos realizados en corderos, la interacción de la ivermectina, quercitina y ketoconazol en la biodisponibilidad de la moxidectina. En este caso, los estudios *in vivo* e *in vitro* sólo fueron positivos en el caso de la quercitina que incrementó significativamente la acumulación de moxidectina en los cultivos, y la biodisponibilidad del fármaco (Dupuy *et al.*, 2003). Por otra parte el trabajo realizado por Molento *et al.*, (2004), demostró que la disposición plasmática de moxidectina, en ovejas, no se modifica por la coadministración de verapamilo.

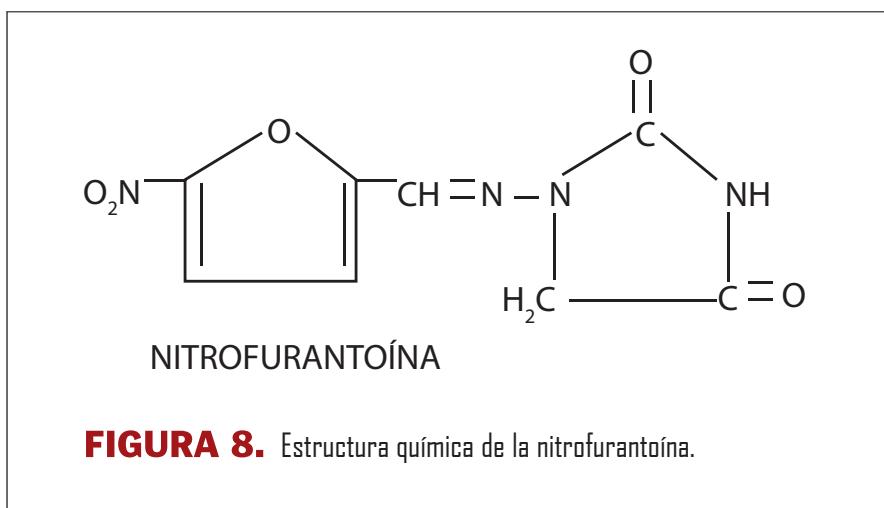
Todos estos trabajos reflejan resultados contradictorios que no permiten confirmar con certeza a través de qué mecanismos se produce la interacción de la glicoproteína P con estos compuestos.

En cuanto al transporte de las lactonas macrocíclicas en glándula mamaria, se presume que este fármaco podría ser transportado a leche por su alto ratio leche/plasma. Imperiale *et al.*, (2004) han encontrado concentraciones de moxidectina del orden de 40 ng/ml en leche en ovejas en lactación 35 días después de la administración subcutánea de 0,2 mg/kg de dicho fármaco. Estos experimentos presumiblemente podrían indicar la interacción de la moxidectina con el transportador ABCG2/BCRP, ya que este último aumenta su expresión en hembras en lactación.

4.2. NITROFURANTOÍNA

La nitrofurantoína es un nitrofurano utilizado únicamente en medicina humana para combatir infecciones urinarias.

Los nitrofuranos tienen restricciones de uso en salud pública debido a que son



considerados como agentes mutagénicos y carcinogénicos (Anon *et al.*, 1991). La nitrofurantoína se prescribe a mujeres lactantes. La transferencia del fármaco de la glándula mamaria a la leche puede crear problemas de resistencias en el feto (Merino *et al.* 2005). En la presente memoria se ha elegido como sustrato modelo de ABCG2/BCRP debido a que este fármaco es eficientemente transportado por BCRP/Bcrp1 pero no por otros transportadores de tipo ABC tales como la glicoproteína P o MRP2, además de su importante transferencia hacia la leche. McNamara *et al.*, (1992; 1996) y Oo *et al.*, (1995), demostraron, tanto en animales de experimentación como en mujeres lactantes, que cationes orgánicos y algunos compuestos aniónicos como los antibióticos benzilpenicilina y nitrofurantoína mostraban niveles de excreción en leche compatibles con un mecanismo de transporte activo. En estudios realizados en ratas en lactación a las que administraron nitrofurantoína por vía oral, Kari *et al.*, (1997), comprobaron que la concentración de antibiótico en leche era superior a la obtenida en plasma. Además el ratio leche/plasma alcanzó un valor de 23, el cual era 100 veces mayor que el predicho por el modelo de difusión pasiva. De forma similar, en un estudio realizado en rata por Gerk *et al.*, (2001), en el que se utilizó un modelo

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

in vivo de infusión continua, se observó que las concentraciones de nitrofurantoína en leche fueron del orden de 100 veces superiores que las predichas por difusión. Los estudios realizados en humanos corroboraron los estudios anteriores aunque con ratios menores (Gerk *et al.*, 2001).

La naturaleza del transporte activo implicado en estos procesos permaneció sin dilucidar hasta que los estudios de Jonker *et al.*, (2005), demostraron, por primera vez, el papel funcional de la Bcrp1 de ratón en la glándula mamaria. Posteriormente y utilizando ratones wildtype se pudo ver que la nitrofurantoina era excretada activamente hacia la leche y que esta excreción disminuía drásticamente en los ratones deficientes en Bcrp1, como se ha comentado anteriormente (Merino *et al.*, 2005). La implicación de ABCG2/BCRP en la secreción activa de nitrofurantoína y cimetidina respectivamente, también se demostró utilizando células MDCKII transfectadas con el gen de HBCRP y BCRP/Bcrp1. Los fármacos presentaron un transporte preferencial en la dirección basal-apical, que fue inhibido por Ko143, inhibidor específico de la ABCG2/BCRP (Merino *et al.*, 2005; Pavek *et al.*, 2005).

La importancia de la secreción de nitrofurantoina por ABCG2/BCRP también se ha puesto de manifiesto al observar la excreción biliar del antibiótico nitrofurantoína que fue casi indetectable en los ratones Bcrp1-/- en comparación con animales wild-type (Merino *et al.*, 2005) demostrando el papel del transportador en la excreción biliar de compuestos. Este modelo también ha servido para demostrar en ratones una mayor actividad del transportador en la secreción biliar en el caso de animales macho (Merino *et al.*, 2005). Además, cuando se examinó el papel de ABCG2/BCRP en la exposición fetal de nitrofurantoína en ratones gestantes, se vio claramente que ABCG2/BCRP limita significativamente la distribución de nitrofurantoína al feto (Zhang *et al.*, 2007).

Por otra parte Wang y Morris (2007), han demostrado la interacción *in vitro* de nitrofurantoína y crisina, y el papel inhibidor de la crisina en el transporte de la nitrofurantoína mediado por ABCG2/BCRP. Para extrapolar estos resultados a condiciones *in vivo*, se analizaron los niveles plasmáticos y se realizaron farmacocinéticas tras la administración de crisina y nitrofurantoína a ratas. Los resultados demostraron que la administración oral de crisina, un flavonoide de tipo dihidroflavona, es capaz de modificar (a dosis elevadas, 100 mg/kg) la farmacocinética de la nitrofurantoína. Los autores explican estos resultados a través de mecanismos a nivel intestinal (ya que altas dosis de crisina modificarían la absorción del fármaco) y de su distinta eliminación. Tanto la absorción como la eliminación de la nitrofurantoína están mediados por ABCG2/BCRP demostrando que puede existir interacción entre flavonoides y fármacos *in vivo* y que los experimentos con nitrofurantoína, como sustrato específico de ABCG2/BCRP, pueden poner de manifiesto esta interacción (ABCG2/BCRP –secreción láctea– isoflavona) así, como las posibilidades de su modulación.

4.3. DANOFLOXACINA

La danofloxacina es una fluoroquinolona de uso en medicina veterinaria caracterizada por su amplia utilización en patologías bacterianas que afectan al aparato urinario, piel, partes blandas, hueso, aparato respiratorio y glándula mamaria en animales domésticos, especialmente en bovinos y aves, pero también en perros, gatos y otros rumiantes, como las ovejas.

Su espectro de actividad incluye la mayoría de bacterias gram-negativas, algunas gram-positivas, micoplasmas y patógenos intracelulares peritenecientes a

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

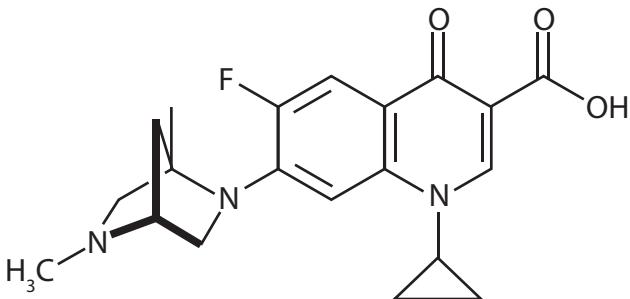


FIGURA 8. Estructura química de la danofloxacina.

los géneros *Brucella* o *Chlamydia*; sin embargo, apenas presenta actividad frente anaerobios (Hannan *et al.*, 1989; Wolfson *et al.*, 1989; Neu, 1991; Appelbaum *et al.*, 2000).

Se utiliza en el tratamiento de enfermedades respiratorias en vacas, ovejas y pollos, ya que tiende a concentrarse en pulmón (Giles *et al.*, 1998), y es efectiva frente a los patógenos respiratorios más importantes en vacas, como *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma bovis*, y *M. dispar*. McKellar *et al.* (1998), demostraron que la danofloxacina también es efectiva contra gastroenteritis y septicemia en ovejas, y Poutrel *et al.*, (2008), recomiendan su empleo en el tratamiento de mastitis.

En especies monogástricas la danofloxacina se absorbe rápidamente tras administración oral, mientras que, en rumiantes, la concentración sistémica tras administración oral suele ser inferior a los niveles terapéuticos, por lo que su administración suele ser por vía parenteral. Por ambas vías alcanza concentraciones plasmáticas máximas entre 1 y 2 horas tras la administración. Tras su absorción, es ampliamente distribuida por órganos y tejidos alcanzando concentraciones tisulares superiores a las plasmáticas. Parte de esta danofloxacina aparece metabolizada como N-desmetil-danofloxacina (Karablut *et al.*, 1993).

La danofloxacina es excretada por vía renal y biliar (Karablut *et al.*, 1993). Otra posible vía de eliminación es la secreción activa intestinal.

INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Algunos estudios han indicado que la danofloxacina es excretada activamente en el lumen intestinal (McKellar *et al.*, 1998; Lindecrona *et al.*, 2000), los transportadores ABC regulan esta excreción (Schrickx *et al.*, 2007), lo que parece indicar que los miembros de la familia de transportadores ABC (glicoproteína P, MRP y ABCG2) afectan significativamente a la disposición farmacocinética de las quinolonas. Además, se ha sugerido la existencia de procesos competitivos entre ellas por los sitios de unión a los transportadores (Alvarez *et al.*, 2008). La implicación de ABCG2/BCRP en el transporte a leche de danofloxacina se ha demostrado recientemente utilizando ratones knockout (Real *et al.* 2011).

Experimentos realizados en esplenocitos de pollo, reflejaron que la danofloxacina y el mesilato de danofloxacina interactuaron significativamente con la glicoproteína P de origen aviar (Haritova *et al.*, 2007).

Escudero *et al.*, (2007), administraron danofloxacina 18% vía subcutánea a ovejas y cabras lactantes a una dosis de 6 mg/kg. La danofloxacina es caracterizada por su extensiva absorción, su alta disponibilidad sistémica y su gran distribución debido a su penetración celular, características que dan como resultado mayores concentraciones del fármaco en leche que en plasma. En ovejas la concentración de danofloxacina en leche fue 10 veces mayor que en el plasma 12 horas tras la administración y 8 veces mayor tras 24 horas. En cabras, la concentración de danofloxacina fue 13 veces mayor en leche que en el plasma 12 horas tras la administración y 4 veces mayor a las 24 horas. Esta larga permanencia en leche de la danofloxacina ha hecho necesario que la EMEA establezca un límite de residuos máximo en leche de 30 µg/Kg (EMEA/MRL/818/02-FINAL).

OBJETIVOS

1. INTERACCIÓN DE MOXIDECTINA CON EL TRANSPORTADOR ABCG2/BCRP.

- 1.1. Transporte de moxidectina en distintos modelos celulares sobreexpresados con ABCG2/BCRP.
- 1.2. Interacción de moxidectina con ABCG2/BCRP en ratones wildtype y knockout (*Bcrp1-/-*).
 - 1.2.1. Secreción Láctea de la Moxidectina: Estudio comparativo en hembras de ratones wild y knockout (*Bcrp1 -/-*). Niveles de acumulación de moxidectina en tejidos.
 - 1.2.2. Distribución tisular, hepatobiliar y excreción intestinal de moxidectina tras su administración subcutánea en machos.
- 1.3. Consecuencias en la secreción láctea de la moxidectina en rumiantes. (Anexo I).

2. PAPEL DE LAS ISOFLAVONAS, GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA EN LA MODULACIÓN DEL TRANSPORTE DE LOS FÁRMACOS NITROFURANTOÍNA Y DANOFLOXACINA MEDIADO POR ABCG2/BCRP

- 2.1. Estudio de la inhibición de las isoflavonas genisteína y daidzeína del transporte de la nitrofurantoina y danofloxacina en cultivos celulares transducidos con BCRP humana y de ratón.

OBJETIVOS

2.2. Estudio en ratones wildtype y knockout de la influencia de las isoflavonas en la excreción de nitrofurantoína.

2.2.1. Estudios farmacocinéticos y de secreción en leche de nitrofurantoína en ratones wildtype y knockout en situación control (sin flavonoides) y en presencia de isoflavonas.

2.2.2. Estudio de la secreción biliar de nitrofurantoína en presencia de las isoflavonas en ratones wildtype en comparación con ratones *Bcrp1(-/-)*.

3. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE ISOFLAVONAS PRESENTES EN LA DIETA Y ADMINISTRADAS ORALMENTE EN LA SECRECIÓN LÁCTEA DE FÁRMACOS EN GANADO OVINO

3.1. Estudio de la secreción láctea de nitrofurantoína en ovejas con dietas bajas en isoflavonas. Correlación con niveles plasmáticos de isoflavonas.

3.2. Estudio de la secreción láctea de danofloxacina en ovejas con dietas enriquecidas en isoflavonas y con suplementaciones orales de genisteína y daidzeína.

ARTÍCULO 1

IN VITRO AND IN VIVO INTERACTION OF MOXIDECTIN WITH BCRP/ABCG2

In vitro and in vivo interaction of moxidectin with BCRP/ABCG2

Chemico-Biological Interactions 180:106-112; 2009

Miriam Perez¹, Alba G. Blazquez², Rebeca Real¹, Gracia Mendoza¹, Julio G. Prieto¹,
Gracia Merino³, Ana I. Alvarez¹

(1) Departamento de Ciencias Biomedicas -Fisiologia, Facultad de Veterinaria,
Universidad de Leon, Leon, Spain.

(2) Departament of Experimental Hepatology and Drug Targeting, Centro de
Investigaciones Biomedicas en Red de Enfermedades Hepaticas y Digestivas
(CIBERehd). Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

(3) Instituto de Sanidad Animal y Desarrollo Ganadero, Universidad de Leon, Leon,
Spain.

Corresponding Author: Dr. Ana I. Alvarez, Departamento de Ciencias Biomédicas
-Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Leon, 24071 Leon (Spain).

Phone.: (34) 987 291265; Fax (34) 987 291267; E-mail: aialvf@unileon.es

The study characterizes the interaction between BCRP/ABCG2 and moxidectin by means of cellular transport, and pharmacokinetic studies in *Bcrp1* (-/-) and wild-type mice. Milbemycin moxidectin ($[^3\text{H}]$ -moxidectin) was tested for its ability to be transported across MCDK epithelial monolayer cultures transfected with BCRP. In a second approach, accumulation assays by BCRP-expressing *Xenopus laevis* oocytes were carried out. Finally, pharmacokinetic studies were performed on female and male mice in order to establish the role of the transporter in milk secretion and tissue distribution. The efflux was negligible in polarized cells but moxidectin was efficiently transported in BCRP-expressing *Xenopus laevis* oocytes. The transport was blocked by an acridone derivative, a novel BCRP inhibitor. Moxidectin secretion into breast milk was decreased in *Bcrp1*-knockout mice and the milk to plasma ratio was two-fold higher in wild-type mice after i.v. administration. Drug accumulation in intestinal content, bile, and intestine was higher in wild-type mice but the plasma concentration was not different.

Moxidectin is identified as a BCRP substrate since its *Bcrp1*-mediated secretion into breast milk and the involvement of *Bcrp1* in intestinal and bile secretion has been demonstrated. This interaction has pharmacokinetic and toxicological consequences. The most important toxicological consequences of the interaction between BCRP and moxidectin may be related with the presence of drug residues in milk.

Keywords: Moxidectin, BCRP/ABCG2, milk secretion, cellular transport, efflux.

INTRODUCTION

The family of ATP-binding cassette (ABC) transporters consists of several transmembrane proteins that use ATP hydrolysis as an energy source for the active extrusion of a variety of drugs, carcinogens and other xenotoxins across the cellular plasma membrane. ABC drug transporters play an important role in cancer drug resistance, protection against xenobiotics, and in general in the passage of drugs through cellular and tissue barriers (Szakács *et al.*, 2008). Efflux transporters significantly influence drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. P-glycoprotein (P-gp), BCRP (ABCG2) and MRPs are among the best-characterized drug transporters (Schinkel *et al.*, 2003). Macroyclic lactones (MLs) such as ivermectin, selamectin or moxidectin belong to a large family of structurally related compounds widely used in livestock, pets, and human antiparasitic therapy (Shoop *et al.*, 2002). These drugs are so effective (98-99%) against a very broad spectrum of susceptible parasites that it is unlikely that novel anthelmintic compounds could be produced with a significant commercial advantage in terms of either efficacy or spectrum. MLs act on ligand-gated channels, including glutamate and GABA-gated chloride channels. Moxidectin

ARTÍCULO 1

is a member of the milbemycin family currently under development for use in humans (Cotreau *et al.*, 2003), and differs structurally from avermectins in the lack of sugar moiety attached to the C13 of the macrocyclic ring (Fig.1). MLs are subjected to active transport by efflux pumps (Lespine *et al.*, 2007; Griffin *et al.*, 2005). The main interaction of such drugs with ABC transporters, seems to be mediated by P-gp and is specially relevant for ivermectin due to its consequences at the blood-brain level and intestinal secretion (Laffont *et al.*, 2002; Didier *et al.*, 1996; Schinkel *et al.*, 1994). BCRP/ABCG2 is a high-capacity efflux transporter with broad substrate specificity. The tissue distribution of BCRP overlaps extensively with that of P-glycoprotein, which suggests a similar role in substrate transport (Schinkel *et al.*, 2003). Muester *et al.* (Muenster *et al.*, 2008) recently reported that ivermectin and other P-gp inhibitors can block Bcrp-mediated substrate efflux. In addition, BCRP is responsible for the active secretion of clinically and toxicologically important substrates into milk (Jonker *et al.*, 2005). Although Bcrp1 is not expressed in mammary epithelial tissue of virgin mice, its expression is strongly induced during late pregnancy and particularly during lactation. The expression of BCRP in the mammary gland during lactation is conserved in humans, cows and goats (Jonker *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2006). Using Bcrp1-knockout mice, the important role of BCRP in the active secretion of environmental and dietary xenotoxins as well as carcinogenic substances has been demonstrated (Jonker *et al.*, 2002; Van Heerwaarden *et al.*, 2006). Some secretion of these toxins into milk was mediated by BCRP (Jonker *et al.*, 2005; Van Heerwaarden *et al.*, 2006). All these studies encourage the research into the function of this transporter in the mammary gland related to its potential role in the presence of drugs in milk.

Drugs with steady-state concentrations in milk higher than those predicted based

on physicochemical properties are presumably subjected to active transport; of these, cimetidine, ranitidine and nitrofurantoin are actively transported into human and rat milk (Agatonovic-Krustin *et al.*, 2000; Gerk *et al.*, 2001). In domestic species a high milk/plasma (M/P) ratio for some drugs such as moxidectin (Imperiale *et al.*, 2004) has been reported, and it is possible that these drugs could be actively transported into milk. Imperiale *et al.* (2004) have shown moxidectin residual concentrations of about 40 ng/ml after 35 days post-treatment of subcutaneous (0.2 mg/kg) administration to lactating dairy sheep.

The objective of the present study is to characterize the interaction of moxidectin with BCRP. We combined cellular transport, and pharmacokinetic studies in *Bcrp1* (-/-) approaches in an attempt to establish a relationship between BCRP/ABCG2 and moxidectin. Milbemycin moxidectin was tested for its ability to be transported across MCDK epithelial monolayer cultures transfected with BCRP. In the second approach, accumulation assays by BCRP-expressing *Xenopus laevis* oocytes were carried out. In these experiments, mitoxantrone, a typical BCRP substrate, was used as a positive control of the BCRP function. Finally, pharmacokinetic studies were performed on female and male *Bcrp1* -/- mice in order to establish differences in milk secretion and tissue accumulation of moxidectin.

MATERIALS and METHODS

Animals

Mice were housed and handled according to procedures approved by the Research Committee of Animal Use of the University of Leon (Spain) and performed according to the «Principles of Laboratory Animal Care» and the European guidelines described in the EC Directive 86/609.

All the animals used in the experiments were Bcrp1, and wild-type mice, all of »99% FVB genetic background between 9 and 14 weeks of age. (The mice were kindly supplied by Dr. AH Schinkel from the Netherlands Cancer Institute). Animals were kept in a temperature-controlled environment with a 12-h light/12-h dark cycle. They received a standard rodent diet (Panlab SA, Barcelona, Spain) and water was available ad libitum.

Adult female frogs (*Xenopus laevis*) were purchased from Regine Olig (Hamburg, Germany). The animals received human care as outlined in the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (2nd ed, 2002) and were used in experimental protocols approved by the Ethical Committee for Laboratory Animals of the University of Salamanca.

Chemicals

[³H]-moxidectin [17 Ci/mmol, 629 GBq/mmol; PM:641] were provided by Pfizer Animal Health (Sandwich, UK) along with unlabelled compounds. Radiolabelling was performed by Amersham (Chakfont-St Giles, Bucks, UK). Isoflurane (Isovet®) was from Schering-Plough (Madrid, Spain); Fumitremorgin C (FTC) and mitoxantrone from Sigma-Aldrich as BCRP inhibitors (Rabindran *et al.*, 2000), 9-Oxo-9,10-dihydroacridine-4-carboxylic acid 4-methoxyphenethyl amide (4a), an acridone analog which is a potent inhibitor of BCRP, from Boumendjel *et al.* (2007).

Cell and tissue cultures. The polarized canine kidney cell line MDCK-II was used in the transport assays. Human BCRP- and murine Bcrp1-transduced MDCK-II subclones have been previously described (Jonker *et al.*, 2000; Merino *et al.*, 2005). The MDCK-II cells and transduced subclones were kindly supplied by Dr. AH Schinkel from the Netherlands Cancer Institute. The cells were cultured in DMEM containing glutamax (Life Technologies, Inc.) and supplemented with penicillin (50 units/ml), streptomycin (50 µg/ml), and 10% (v/v) fetal calf serum (Life Technologies, Inc.) at 37°C in the presence of 5% CO₂. The cells were trypsinized every 3 to 4 days for subculturing.

Transport assays. Transport assays were carried out as described by Merino *et al.* (2005), with minor modifications. Cells were seeded on microporous membrane filters (3.0 µm pore size, 24 mm diameter; Transwell polycarbonate inserts 3414; Costar, Corning, NY) at a density of 1.0 x 10⁶ cells per well. Cells were grown for 3 days, and medium was replaced daily. Transepithelial resistance was measured across monolayers in each well using a Millicell ERS ohmmeter (Millipore, Bedford, MA); wells registering a resistance of 200 ohms or greater, after correcting for the resistance measured in control blank wells, were used in the transport experiments.

ARTÍCULO 1

The measurement was repeated at the end of experiment to check the integrity of the monolayer. Two hours before the start of the experiment, medium on both the apical and basolateral sides of the monolayer was replaced by 2 ml of Optimem medium (Life Technologies, Inc.), without serum. The experiment was started ($t = 0$) by replacing the medium in either the apical (A), or basolateral (B) compartment with fresh Optimem medium containing 0.1 μM [^3H]-moxidectin. Cells were incubated at 37°C in 5% CO_2 and 50- μl aliquots were taken at $t = 1, 2, 3$ and 4 hours. The concentration of drug recovered in the samples was evaluated by liquid scintillation counting.

Accumulation assays in *Xenopus laevis* oocytes.

Harvesting and preparation of oocytes were carried out as described elsewhere (Briz *et al.*, 2002). Capped and poly(A)-tailed cRNA of human BCRP, from recombinant plasmid BCRP-pSPRT1 containing the cDNA of the open reading frame of BCRP, was synthesized using the T7 mMessage mMachine Ultra kit (Ambion) and single-strand binding protein (T4 Gene 32 Protein; Ambion) was used to avoid the formation of truncated transcripts (Briz *et al.*, 2002). Oocytes were injected with 9 ng of cRNA and maintained in modified Barth's solution supplemented with gentamicin (50 mg/l), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l) and amphotericin B (0.25 mg/l) for 2 days at 18°C . Incubation time after injection of the cRNA in oocytes was selected based on preliminary experiments on the time-course of the functional expression for this carrier (data not shown). Uptake studies were carried out using at least two groups of ≥ 8 oocytes per data point and experiments were repeated using at least two different frogs.

Oocytes were washed with substrate-free uptake medium (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, and pH adjusted to 7.5 with Tris)

and were incubated with 100 µl of uptake medium containing the desired amount of the substrate alone; mitoxantrone (10 µM unlabelled mitoxantrone plus 1 µCi/ml [³H]-mitoxantrone) or moxidectin (30 nM 0.5 µCi/ml [³H]-moxidectin) or, with 5 µM of fumitremorgin C (FTC) – a specific inhibitor of BCRP – or 5 µM of 9-Oxo-9,10-dihydroacridine-4-carboxylic acid 4-methoxyphenethyl – an acridone analog which is a potent inhibitor of BCRP – at 25 °C for 1 h. Transport processes were stopped by the addition of 4 ml ice-cold uptake medium and oocytes were washed three more times before being collected. To determine radiolabelled compounds in oocytes, each cell was homogenized in 10% SDS, then the radioactivity of this cell lysate was measured by liquid scintillation counting.

Mice (wild and Bcrp1 -/-) experiments For animal experiments, [³H]-moxidectin (1 µC per animal) was added to a moxidectin solution (Cydectin, Fort Dodge Veterinaria SA, Girona, Spain) diluted in physiological saline. A 5 µl drug solution per gram body weight (0.5 mg/kg) was administered to wild-type and Bcrp1 -/- mice.

Milk secretion experiments For milk secretion experiments, lactating wild-type or Bcrp1-/- females with ~10-day-old pups were used. Female mice were administered i.v. (tail vein) after having been lightly anesthetized with isoflurane. Radiolabelled compounds were administered by the i.v. route together with a subcutaneous administration of oxytocin (200 µl of a 1 IU/ml solution) to stimulate milk secretion. After the iv administration plasma samples (about 100 µl) were obtained at 30 min (n= 3-5 in each group of wild and knock out) and 60 min (n= 3-5 in each group of wild and knock out) by retroorbital puncture. After blood extraction, milk samples were collected (10-50 µg) bilaterally from all five (thoracic and inguinal) mammary glands by gentle vacuum suction and animals were sacrificed by cervical dislocation. The corresponding

ARTÍCULO 1

Milk/Plasma ratio values had been obtained at 30 and 60 min after iv moxidectin administration. At the end of the experiments (30 and 60 min) the intestinal content (IC) as well as the bile were obtained and weighted (aprox. 0.15 g IC and 0.04 g of bile). Samples of tissues (0.2 g) were obtained : kidney, liver, brain, and proximal intestine.

Pharmacokinetic Experiments.

Male mice (n= 3-5 in each group of wild and knock out) were administered radiolabeled moxidectin s.c. after having been lightly anesthetized with isoflurane. After s.c. injection, plasma samples obtained by retroorbital puncture (30 and 90 min), and cardiac puncture (180 min). Mice were subsequently killed by cervical dislocation. At the end of the experiment (180 min) whole intestinal contents were separated from the intestinal tissue. The intestinal content (IC) as well as the bile into gall-bladder were obtained and weighed. The small intestine was excised into three similar portions from pilorous to ileocaecal sphincter (proximal, medium, and distal intestine) and samples were obtained (0.2 g). The other tissues samples (0.2 g) were obtained from kidney, liver and brain.

For tissue analyses, organs as well as the bile content and the IC were solubilized in ‘Solvable’ (Perkin Elmer, MA). Levels of radioactivity and plasma, milk and tissue homogenates were determined by liquid scintillation counting.

Statistical analyses

All values are given as average \pm SD, unless indicated otherwise. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), using the Newman-Keuls test. Differences were considered to be statistically significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

***In vitro* transport of [³H]-moxidectin.**

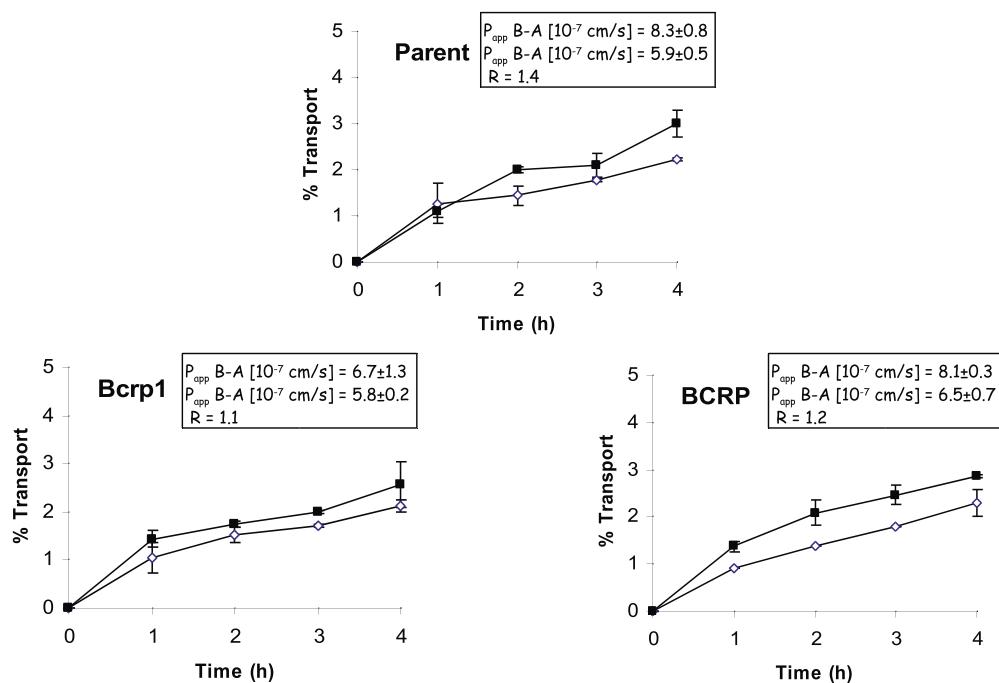
The parental and transduced cell lines were grown to confluent polarized monolayers on porous membrane filters, and vectorial transport of the [³H]-moxidectin (0.1 µM) across the monolayers was determined in order to assess whether Bcrp1/BCRP is involved in the transport of moxidectin *in vitro*. The results obtained in the MDCK-II parental, Bcrp1-transduced MDCK-II and BCRP-transduced MDCK-II cell lines, show that both apically and basolaterally directed translocation are similar and quite poor (2%) (Fig.1). These results show a negligible transport of moxidectin by Bcrp1/BCRP when directly measuring the bidirectional fluxes of radiolabeled drug in the transduced cell lines. The low transport of moxidectin in monolayer cultures suggests that the transepithelial model was not optimal to study moxidectin transport.

Transport of [³H]-moxidectin in *Xenopus laevis* oocytes expressing human BCRP.

To further elucidate whether BCRP may be involved in moxidectin transport, accumulation assays by BCRP-expressing *Xenopus laevis* oocytes were carried out. As a positive control of BCRP function, mitoxantrone, a typical BCRP substrate, was

FIGURE 1. Transepithelial transport of [³H]-moxidectin (0.1 µM) in MDCKII (parent)

MDCKII-Bcrp1 and MDCKII-BCRP monolayers. The experiment was started with the addition of the drug to one compartment (basolateral or apical). After 4 h, the radioactivity appearing in the opposite compartment was measured and plotted. Results are the means; error bars (sometimes smaller than the symbols) indicate the standard deviations ($n = 3-4$). Closed symbol: translocation from the basolateral to the apical compartment; open symbol: translocation from the apical to the basolateral compartment.



used. As expected, the cell load of mitoxantrone was 38 percent lower in BCRP-expressing oocytes than in wild-type cells (2.0 ± 0.1 pmol versus 3.2 ± 0.1 pmol respectively) (Fig. 2). Moreover, when FTC, a well known BCRP inhibitor, was added to the incubation medium the ability of BCRP to reduce mitoxantrone cell content was abolished. When the oocytes were incubated with moxidectin, the cell content of this compound was reduced by 18 percent in BCRP-expressing oocytes as compared with wild-type cells (43.2 ± 1.9 fmol versus 52.7 ± 1.9 fmol respectively). This effect was also prevented by FTC and the acridone derivative 4a (I1), a novel BCRP inhibitor.

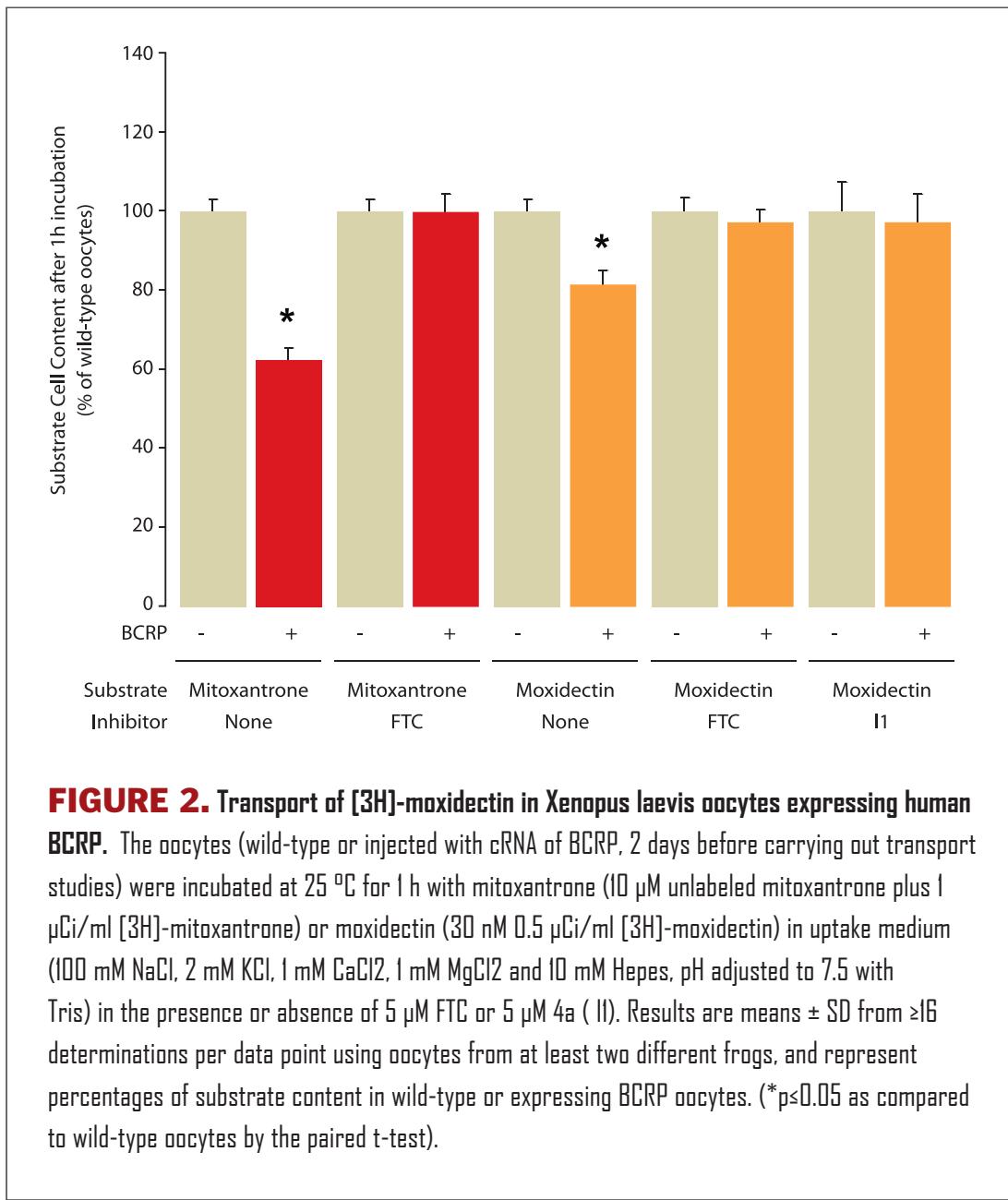


FIGURE 2. Transport of [³H]-moxidectin in *Xenopus laevis* oocytes expressing human BCRP. The oocytes (wild-type or injected with cRNA of BCRP, 2 days before carrying out transport studies) were incubated at 25 °C for 1 h with mitoxantrone (10 µM unlabeled mitoxantrone plus 1 µCi/ml [³H]-mitoxantrone) or moxidectin (30 nM 0.5 µCi/ml [³H]-moxidectin) in uptake medium (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ and 10 mM Hepes, pH adjusted to 7.5 with Tris) in the presence or absence of 5 µM FTC or 5 µM 4a (I1). Results are means ± SD from ≥16 determinations per data point using oocytes from at least two different frogs, and represent percentages of substrate content in wild-type or expressing BCRP oocytes. (*p≤0.05 as compared to wild-type oocytes by the paired t-test).

[³H]moxidectin transported into breast milk by Bcrp1

Xenotoxin and carcinogen accumulation in breast milk and dairy products is a major public health concern. During lactation, Bcrp1/BCRP is expressed in the mammary gland (12). We investigated the consequences of this expression for the transfer to breast milk of moxidectin circulating in maternal blood. We administered

ARTÍCULO 1

[³H]moxidectin (0.5 mg/kg) to female lactating wild-type and Bcrp1^{-/-} mice. Milk and maternal plasma samples were obtained at 30 and 60 min after i.v. administration and milk to plasma (M/P) concentration ratios were calculated (Fig. 3). M/P ratios of [³H]moxidectin at 30 and 60 min were two fold higher approx. ($p \leq 0.05$) in wild-type versus Bcrp1^{-/-} mice; 1.03 ± 0.3 vs. 0.6 ± 0.3 (30 min.) and 2 ± 0.3 vs. 1.3 ± 0.5 (60 min.).

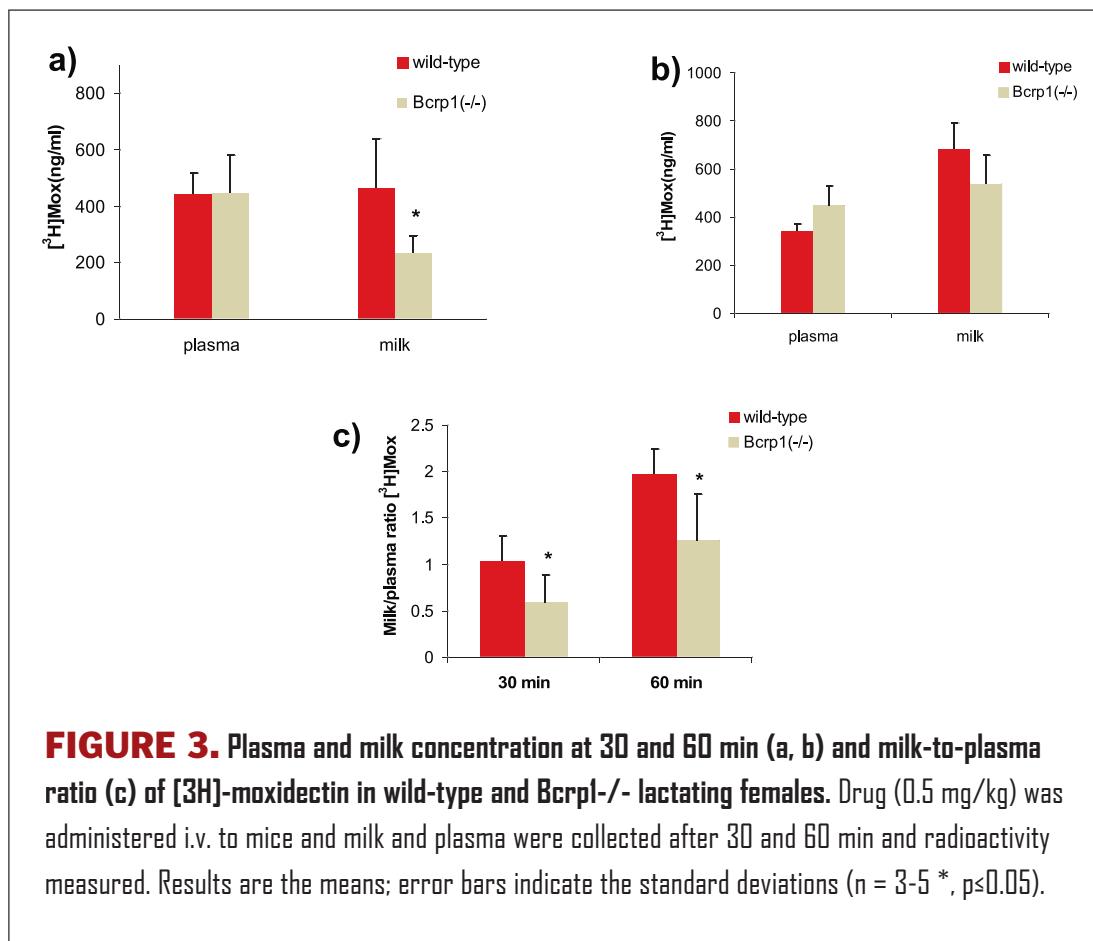


FIGURE 3. Plasma and milk concentration at 30 and 60 min (a, b) and milk-to-plasma ratio (c) of [³H]-moxidectin in wild-type and Bcrp1^{-/-} lactating females. Drug (0.5 mg/kg) was administered i.v. to mice and milk and plasma were collected after 30 and 60 min and radioactivity measured. Results are the means; error bars indicate the standard deviations ($n = 3-5$ *, $p \leq 0.05$).

Plasma and tissue distribution [³H]moxidectin in Bcrp1^{-/-} versus wild-type.

To investigate the role of Bcrp1 in the tissue distribution and elimination of moxidectin we administered [³H]moxidectin (0.5 mg/kg) s.c. to male wild-type and Bcrp1^{-/-}

mice. Radioactivity was measured in plasma (obtained by retroorbital puncture 30 and 90 min), and cardiac puncture (180 min), in whole intestinal contents (separated from intestinal tissue) and in tissues such as: intestine (proximal, medium, distal), liver, kidney and brain. Sample tissues were obtained at the end of experiment (180 min) (Fig. 4 and Table 1).

Table 1.

Levels of radioactivity in male mice after subcutaneous injection of [³H]-moxidectin.

Tissue	Wild-type	Bcrp1 ^{-/-}	Ratio ^{-/-} /wt
Plasma 30 min	130±25	129±26	0.9
Plasma 90 min	139±30	105±8	0.7
Plasma 180 min	97±20	82±19	0.8
Liver	960±318	599±272	0.6
Kidney	436±178	287.4±67.8	0.6
Brain	16±6	10±3	0.6

Results are expressed as average [³H]-concentrations (ng ml⁻¹ or g⁻¹) ± SD (n=3-5)

Overall, the results did not show plasma differences, comparing the levels plasma and moxidectin in various compartments, tissues distribution between Bcrp1^{-/-} and wild-type mice was qualitatively similar. The only exception was the differences in intestinal content, bile and intestine in male mice (Fig. 4).

There was a relatively high accumulation of radioactivity in liver, kidney and small intestine for both genotypes (Table 1, and Fig. 4). Radioactivity levels in liver between in wild-type and Bcrp1^{-/-} mice were not different. In contrast to the liver, radioactivity retrieved from the content of small intestine and bile after 180 min in male was 1.2-fold and 1.5-fold respectively higher in wild-type compared with Bcrp1^{-/-} mice (640

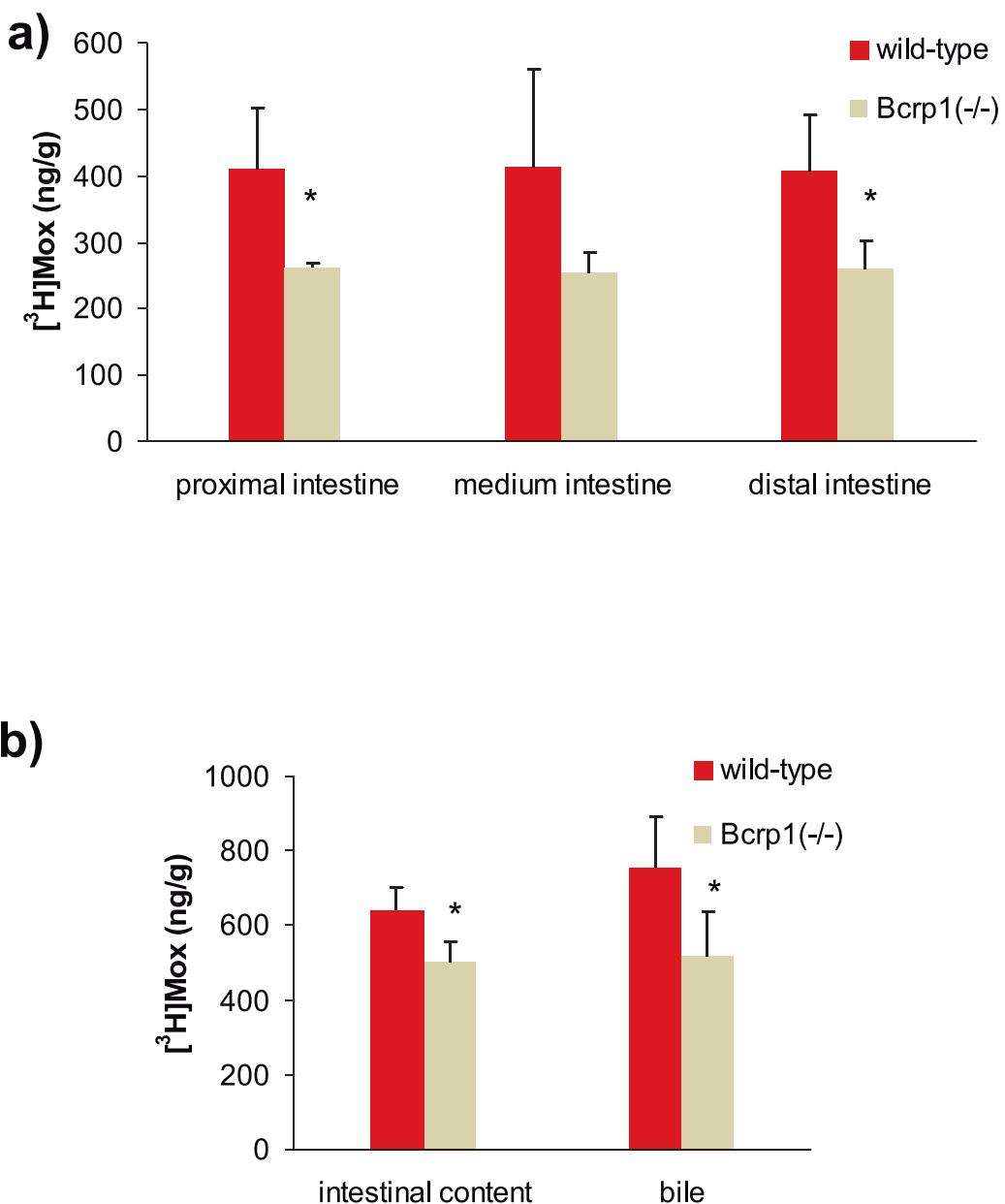


FIGURE 4. Levels of radioactivity in a) intestine (tissue) and b) intestinal content and bile in male wild-type and Bcrp1(-/-) mice. [³H]-moxidectin (0.5 mg/kg) was administered s.c. and 180 min after the samples were collected. Results are the means; error bars indicate the standard deviations (n = 3-5 *, p ≤ 0.05).

± 63 versus 504 ± 55 ng/g intestinal content and 754 ± 133 versus 518 ± 119 ng/g bile content, $p \leq 0.05$), indicating Bcrp1-mediated hepatobiliary and possibly direct intestinal transport of moxidectin into the lumen of this organ. Therefore intestinal accumulation in the intestine was significantly higher in male wild-type compared with Bcrp1 $^{-/-}$ mice in proximal and distal intestine (Fig. 4). This tissue level reflects the higher accumulation of moxidectin in the contents of small intestine indicating that BCRP could mediate transport. Radioactivity levels in tissues of female mice (i.v. moxidectin administration) were measured at the end of the experiment, without any significant difference between wild-type and Bcrp1 $^{-/-}$ mice. (Data not shown)

DISCUSSION

Some drugs widely used in antiparasitic therapy are transported by ABC transporters; i.e. ivermectin and selamectin by P-glycoprotein (Laffont *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2005), albendazole sulfoxide, oxfendazole by BCRP/ABCG2 (Muenster *et al.*, 2008; Merino *et al.*, 2005). In particular, our results show that moxidectin is transported by BCRP. P-gp and Bcrp play a critical role in pharmacokinetic interactions (Schinkel *et al.*, 2003; Schrickx *et al.*, 2008). Inhibition of ABC transport increases drug bioavailability of ivermectin and moxidectin in sheep and cows, raising the plasmatic levels of the drugs (Molento *et al.*, 2004; Dupuy *et al.*, 2003). From a toxicological point of view, the main findings are related with ivermectin as substrate for P-gp and the increased permeability of the blood-brain barrier. Knock-out mice mdr1a (-/-) and collie dogs lacking a functional form of P-gp are seriously affected by ivermectin administration (Schrickx *et al.*, 2008). Other macrocyclic lactones such as selamectin and moxidectin seem does not cause effects in ivermectine-sensitive collies (Paul *et al.*, 2004), but considering the extremely susceptible to toxicosis induced by substrate

drugs in P-gp mutant animals (Mealey *et al.*, 2008), their dosage should be made with caution (Griffin *et al.*, 2005). Moxidectin belongs to the milbemycin family and differs structurally from avermectins by lacking the disaccharide moiety on the C13 of the macrocycle. Lespine at al. (Lespine *et al.*, 2007) have shown that in spite of structural similarities between macrocyclic lactones (MLs), differences in their substituents significantly affected their interaction with P-gp, since the potency of moxidectin to inhibit P-gp function was 10 time lower than the other MLs. Muenster *et al.* (2008) have shown that P-gp inhibitors PSC833, LY335979 and ivermectin can block Bcrp-mediated substrate efflux of ABZSO (Merino *et al.*, 2005). They also established that the fact that all the inhibitors blocked only ABZSO, but not topotecan transport, and at the same time topotecan and ABZSO were unable to interact with each others' transport; this suggests that physically separate binding sites for different substrates and inhibitors underlie the complexity of such interactions (Muenster *et al.*, 2008). With regard to moxidectin, Lespine *et al.* (2007) also showed that this drug was also a weak inhibitor of rhodamine 123 secretion by transfected LLC-PK1-MDR1 cells. In contrast, Dupuy *et al.* (Dupuy *et al.*, 2001; Dupuy *et al.*, 2006) report the interaction of moxidectin with P-gp and MRPs in primary cultures of rat hepatocytes, measuring the intracellular accumulation of moxidectin, in the presence of specific inhibitors, whereas the fumitremorgin C, as specific inhibitor of BCRP, had no effect (Dupuy *et al.*, 2006). With its long terminal half life and very high log octanol, water coefficient, interaction of moxidectin with ABC transporters seems likely, although evidence to date suggests that potency is low (Brayden *et al.*, 2008). These authors were not able to obtain evidence that moxidectin is a substrate for P-gp in MDR1 and MRP transfected canine kidney epithelial monolayers (MCDK) at physiological

ARTÍCULO 1

concentrations; they considered that this may be due in part to detection issues arising from low solubility and low basal fluxes per se. Our results showed that transepithelial transport in MDCK transduced cultures was low, lacking a preferential transport by BCRP (Fig. 1), although that may be due in part to low solubility and low basal fluxes across monolayers. The *Xenopus laevis* oocytes expression system previously was used to investigate the substrate specificity of human BCRP in the absence of heterologous partner proteins (Nakanishi *et al.*, 2003). Another ABC transporters such as human MDR1 (Morin *et al.*, 1995) rat Bsep (Vallejo *et al.*, 2006) and recently, human MRP4 (Janke *et al.*, 2008) have been expressed functionally in *X. laevis* oocytes. This model is well suited to characterize ABC transporters and the transport properties of wild-type BCRP. We used this model to elucidate whether BCRP may be involved in moxidectin transport. The functional expression of BCRP in the oocytes was confirmed by using FTC-modulation of mitoxantrone accumulation (Fig. 2). The ability of oocytes expressing BCRP to reduce load of moxidectin with regard to wild-type cells and the fact that FTC and the acridone derivative I1 modulation accumulation of this compound resulted in higher moxidectin content in these cells (Fig. 2), showed that BCRP was responsible for transport of this compound. The knockout mouse model is a valuable tool to study the role of these transporters for the bioavailability of various compounds (Szakács *et al.*, 2008). Bcrp1 knockout studies show the pharmacokinetic consequences of such interaction, including drug secretion into milk, since the transporter expression is strongly induced during late pregnancy and particularly during lactation (Jonker *et al.*, 2005). The presence of this protein in the mammary glands of ruminants was related to the presence of xenobiotic residues in milk (Pulido *et al.*, 2006). Bcrp1 mediates transfer of toxins such as [¹⁴C]IQ,

[¹⁴C]Trp-P-1 and [³H]aflatoxin into milk, with 3.4 ± 0.6 , 2.6 ± 0.3 and 3.8 ± 0.5 -fold higher milk to plasma ratios, respectively, in lactating wild-type versus Bcrp1-/- mice (Van Herwaarden *et al.*, 2006). One of the most outstanding consequences of the interaction between BCRP and moxidectin are related with the presence of drug residues in milk. This is a problem that is focused mainly on antimicrobial agents due to their impact on industrial milk processing. Nevertheless, it is necessary to know the consequences that the residues of other substances, used extensively in dairy animals, could have. Moxidectin has a long elimination half-life, Imperiale *et al.* (2004) have shown moxidectin residual concentrations of about 40ng/ml in milk after 35 days post-treatment of subcutaneous (0.2 mg/kg) administration to lactating dairy sheep (MRLs of 40 µg/kg EMEA(MRL/906/04-final)). Since BCRP could facilitate the excretion of moxidectin to the milk, BCRP inhibition could regulate the moxidectin withdrawal periods for dairy cows and sheep.

Our results in mice corresponding to moxidectin i.v. administration was 2.2 ± 1.2 fold higher for milk plasma ratios, but plasma levels were not statistically different in knockout vs wild type. Plasma differences were absent in our study. Some authors have shown that Bcrp1 significantly limits drug fetal distribution or secretion of drugs or toxins into breast milk, but has only a minor effect on their systemic clearance, without differences in systemic profile between wild-type and knockout (Jonker *et al.*, 2005; Van Herwaarden *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008).

Zulalian *et al.* (1994) and Lifschitz *et al.* (1999) showed massive bile, intestinal and faecal elimination of moxidectin. Our results show that [³H]moxidectin was higher in intestinal content, bile and intestine after subcutaneous administration. BCRP plays a pivotal role in the bioavailability and tissue distribution due to its presence on the

ARTÍCULO 1

intestinal epithelium and on bile canalicules in mice (Tanaka *et al.*, 2004), and so could contribute to moxidectin excretion.

Differences in intestinal and bile secretion of moxidectin between wild-type and Bcrp1 *-/-* are only significant in the case of male mice. This is probably due to the different tissue expression of the transporters in both sexes. Hepatic Bcrp1 is higher in males, and so is the hepatobiliary excretion of Bcrp substrates (Merino *et al.*, 2005). It could well be that the differences in intestinal content in males is mainly due to biliary excretion. Other BCRP substrates have not shown differences in tissues levels (liver, intestine and kidney) between Bcrp1 *-/-* and wild-type such as micotoxin aflatoxin. In contrast, the intestinal content (measured as drug percentage) of this compound was 2.2 times higher in wild-type than Bcrp1 *(-/-)* (Van Herwaardeen *et al.*, 2006). These authors reported that this result showed that micotoxin hepatobiliar secretion was mediated by Bcrp1 with the possibility of direct transport into the intestinal lumen. The higher tissue levels of moxidectin in proximal and distal intestine in wild mice could reflect the accumulation of drug in intestinal contents (Van Herwaardeen *et al.*, 2003).

A recent pharmacokinetic study in sheep suggests that moxidectin distribution following oral administration was unaffected by co-administration of the P-gp inhibitor, verapamil (Molento *et al.*, 2004). Dupuy *et al.* (2003) showed that the co-administration of the P-gp interacting agents ivermectin or ketoconazole had no effect on the pharmacokinetics of moxidectin in plasma of lambs. Nevertheless, the co-administration of quercetin, considered by authors like a P-gp inhibitor but a known BCRP inhibitor (Yoshikawa *et al.*, 2004), did result in a significant increase in the area under the curve of moxidectin in plasma of lambs. Large amounts of moxidectin are

excreted in faeces (Dupuy *et al.*, 2001; Dupuy *et al.*, 2006) and two main routes could be involved: the biliary (Hennessy *et al.*, 2000) and the intestinal (Laffont *et al.*, 2002) both biliary and intestinal secretion processes could be mediated by BCRP (Szakács *et al.*, 2008; Van Herwaardeen *et al.*, 2003).

The knowledge about the mechanism of transport involved into milk secretion may provide important benefits since BCRP inhibitors, such as flavonoids, are available and should be evaluated in further research.

In this study we identify moxidectin as BCRP substrate, and demonstrate its Bcrp1-mediated secretion into breast milk. Our results reveal that BCRP should be included in the list of ABC transporters that interact with macrocyclic lactones and should be considered in the study of drug interactions involving this group of antiparasitic drugs.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Jose J. G. Marin (CIBERehd, University of Salamanca, Spain) for his collaboration in the study of transport of [³H]-moxidectin in *Xenopus laevis* oocytes, Simon Blanchflower from Pfizer Animal Health (Sandwich, UK) for their generous contribution in obtaining the [³H]-moxidectin, Dr A. Boumendjel (CNRS/Universite Joseph Fourier-Grenoble I, Meylan, France) who gave us the acridone derivative and finally Dr. A.H. Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) who provided us MDCK cells and Bcrp1 knockout mice.

We are grateful to Prof. James McCue for assistance in language editing.

This study was supported in part by research grants by the Ministry of Science and Technology (Spain) with the research project AGL2006-13186 (to AIA and MP) and Ramon y Cajal fellowship (to GM); by the Instituto de Salud Carlos III, FIS (Grant PI051547), Junta de Castilla y León (Spain) Grants SA021B06 and SAN/191/2006 (to AGB).

Conflict of Interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

1. INTERACCIÓN DE MOXIDECTINA CON EL TRANSPORTADOR ABCG2/BCRP.

1.3. Consecuencias en la secreción láctea del compuesto en rumiantes.

ANEXO I

FARMACOCINÉTICA DE LA MOXIDECTINA EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE ABCG2/BCRP EN OVEJAS DE RAZA ASSAF

Farmacocinética de la moxidectina en presencia de inhibidores de ABCG2/BCRP en ovejas de raza Assaf

Los resultados presentados en el presente anexo se relacionan con el primer resultado expuesto y que muestra a la moxidectina como un sustrato de ABCG2/BCRP. Tras este hallazgo nos planteamos las consecuencias que podría tener su inhibición a efectos de la secreción láctea en ovejas productoras de leche (Assaf). Estudios previos con una serie de inhibidores en ovejas merinas habían demostrado que la administración intravenosa de moxidectina (Cydectin) a una dosis de 0,2 mg/kg junto con su administración con nitrofurantoina a una dosis de 2 mg/kg y quercitina a una dosis de 10 mg/kg reducían significativamente la excreción de moxidectina a leche en ovejas merinas (Pulido - Tesis Doctoral, 2006). Con estos antecedentes nos planteamos la realización de un experimento con 4 grupos experimentales a los que administramos moxidectina junto con las isoflavonas de la soja (genisteína y daidzeína) y de nuevo el flavonol quercitina. El presente Anexo recoge la metodología utilizada en este experimento, así como los resultados obtenidos.

1) Grupos experimentales

Los experimentos se realizaron en la granja experimental de la Facultad de Veterinaria

ANEXO 1

de la ULE. Se utilizaron 16 ovejas de la raza Assaf divididas en 4 grupos experimentales (4 animales por grupo experimental):

MOXI: Grupo control que recibió moxidectina a una dosis de 0,2 mg/kg.

MOXI-DAID: Grupo MOXI 0,2 mg/kg coadministrado con daidzeína 3 mg/kg.

MOXI-GEN: Grupo MOXI 0,2 mg/kg coadministrado con genisteína 3 mg/kg.

MOXI-QUER: Grupo MOXI 0,2 mg/kg coadministrado con quercitina 3 mg/kg.

Tras determinar el peso y realizar una identificación individual de cada animal, la moxidectina se administró vía intravenosa a través de la vena yugular, la daidzeína y la genisteína a través de la vía intramuscular y la quercitina a través de la vía subcutánea.

2) Toma de muestras y análisis cromatográfico

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante una punción en la vena yugular opuesta al lado de la administración, recogiéndose en tubos heparinizados. Los tiempos de muestreo fueron 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24; 36; 48; 60; y 72 horas tras la administración. La sangre se centrifugó inmediatamente a 1000g durante 10 minutos y el plasma se congeló a -20°C hasta el momento de su análisis.

Las muestras de leche se obtuvieron mediante ordeño y se congelaron a -20°C hasta el momento del análisis. Los tiempos de muestreo fueron 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 24; 36; 48; 60 y 72 horas tras la administración.

La moxidectina se extrajo y se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método descrito por Prieto et al., (2003). La ivermectina fue utilizada como patrón interno y las muestras fueron extraídas con metanol y posteriormente derivatizadas. La fase móvil estuvo constituida por acetonitrilo: metanol:agua con un 0,2% de ácido acético a un flujo de 1,8 ml/min.

Tabla 1.

Los resultados recogen los parámetros farmacocinéticos en plasma y leche para la moxidectina y su coadministración con daidzeína (MOXI+DAID), con genisteína (MOXI+GEN) y con quercitina (MOXI+QUER). Los datos son la media ± DS (n=4). *diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto al control.

Plasma	Moxi	Moxi+Daid	Moxi + Gen	Moxi+Quer
AUC (ng·d/ml)	291 ±81	307±70	251 ± 15	282± 9
Cmax (ng/ml)	575 ±287	500±542	250± 129	433 ± 57
MRT (d)	22,97 ± 6,22	23,42 ± 15,5	24,28± 34,6	26,05± 14,94
Leche				
AUC (ng·d/ml)	1054 ± 417	928± 323	1010±631	752,7± 573
Cmáx (ng/ml)	1225±866	1450± 192	1700±949	1200± 693
t 1/2 (d)	0,9 ± 0,6	2,2± 2,1	2,5±3,5	0,6± 0,1
MRT (d)	1,20±0,11	1,71 ±0,08	1,07± 0,87	1± 0,15
AUC Leche/Plasma	3,8±1,9	2,3± 1,2	3,9± 2,34	2,7 ± 2,2

Como fase estacionaria empleamos una precolumna que incorpora dos filtros de 2 μm de poro y un relleno NUCLEOSIL C18 con un tamaño de partícula de 10 μm , y una columna «Scharlau», LiChrospher 100 RP-18, 10 μm de partícula, 250X4 nm.

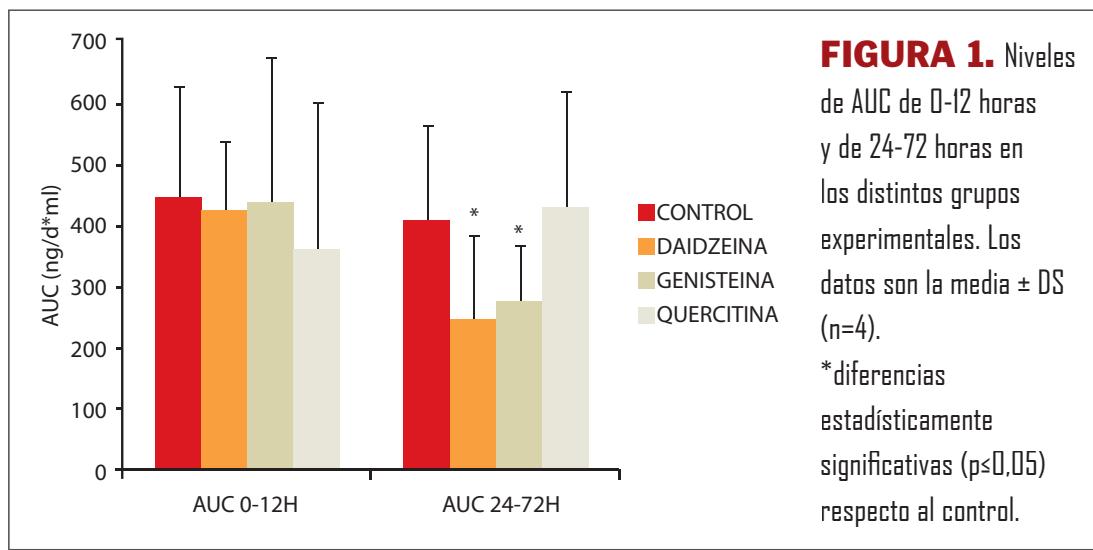
La detección de la moxidectina y el patrón interno ivermectina se realizó por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 475 nm, a una temperatura de 35°C.

Las curvas de calibración fueron preparadas a un rango de concentración de 0,05-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el plasma y a un rango de concentración de 0,02-1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la leche. Los niveles de extracción de la moxidectina en la curva de calibración fueron de un 82% en el plasma y un 85% en la leche.

3) Resultados

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas para el AUC entre los distintos grupos experimentales ni en plasma, ni en leche, frente a las ovejas control que solo recibían moxidectina sin la correspondiente co-administración de flavonoides (Tabla 1).

ANEXO 1



A pesar de no existir diferencias significativas en el valor de AUC total (desde 0 a 72 horas) en los distintos tratamientos, los flavonoides genisteína y daidzeína sí que modifican los niveles de moxidectina en leche de las Assaf en el intervalo de 24 a 72 h. Así al estudiar la fase final de la disposición la moxidectina en leche se obtuvieron los valores de AUC en el intervalo de 24 a 72 horas significativamente menores en el caso de co-administración con genisteína y daidzeína (Figura 1).

Por último la Tabla 2 muestra un estudio comparativo de los niveles de moxidectina

(μ g) excretados en leche en relación

Tabla 2.

Niveles de moxidectina (μ g) excretados en leche en relación a la dosis así como la fracción (%) recuperada en leche tanto en ovejas Assaf.

Tratamientos (Assaf)	Assaf (μ g)	(%)
Controles	1490	10,6
Daidzeína	1269	9,3
Genisteína	812	6
Quercitina	1432	10

a la dosis así como la fracción (%) recuperada en leche en ovejas Assaf. Los niveles de residuos disminuyeron desde 1490 μ g a 1269 y a 812 μ g en la coadministración de moxidectina con daidzeína y genisteína respectivamente en el caso de las ovejas Assaf.

ARTÍCULO 2

IN VIVO INHIBITION OF BCRP/ABCG2 MEDIATED TRANSPORT OF NITROFURANTOIN BY THE ISOFLAVONES GENISTEIN AND DAIDZEIN: A COMPARATIVE STUDY IN BCRP1 -/- MICE

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): 2098-105; 2010

Gracia Merino², **Miriam Perez**^{1,2}, Rebeca Real¹, Estefania Egido², Julio G. Prieto¹, Ana I. Alvarez^{1,2,3}

(1) Departamento de Ciencias Biomédicas -Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León, Spain.

(2) Instituto de Sanidad Animal y Desarrollo Ganadero, Universidad de León, León, Spain.

(3) whom correspondence should be addressed: . Ana I. Alvarez, Departamento de Ciencias Biomédicas -Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 Leon (Spain). Phone.: (34) 987291265; Fax (34) 987291267; E-mail: aialvf@unileon.es

Running head: In vivo inhibition of BCRP by isoflavones

Abstract

Purpose. The aim of this study was to determine in vivo inhibition by the isoflavones genistein and daidzein of nitrofurantoin (NTF), a well-known substrate of the ABC transporter BCRP/ABCG2.

Methods. MDCKII cells and their human BCRP- and murine *Bcrp1*-transduced subclones were used to establish inhibition in transepithelial transport assays. *Bcrp1*^{-/-} and wild-type mice were coadministered with nitrofurantoin (20 mg/kg) and a mixture of genistein (100 mg/kg) and daidzein (100 mg/kg).

Results. Transepithelial NFT transport was inhibited by the isoflavones. Plasma concentration of NTF at 30 min was 1.7-fold higher ($p \leq 0.05$) in wild-type mice after isoflavone administration. AUC values were not significantly different. BCRP/ABCG2 mediated secretion into milk was inhibited since milk/plasma ratios were lower in wild-type mice with isoflavones (7.1 ± 4.2 vs 4.2 ± 1.6 , $p \leq 0.05$). NTF bile levels were significantly decreased by isoflavone administration in wild-type animals (8.8 ± 3.4 µg/ml with isoflavones vs 3.7 ± 3.3 µg/ml without isoflavones).

Conclusion. Our data showed that in vivo interaction of high doses of soy isoflavones with BCRP substrates may affect plasma levels but the main effect occurs in specific target organs, in our case, liver and mammary glands.

Key words: BCRP/ABCG2, MDCKII cells, nitrofurantoin, *Bcrp1*^{-/-}, isoflavones

INTRODUCTION

BCRP, the protein encoded by the ABCG2 gene, may play a significant role in the disposition and pharmacological activity of a broad range of compounds and in the development of multidrug resistance in cancer (Ishikawa *et al.*, 2009 ; Robey *et al.*, 2009). Consistent with this notion, a plethora of studies on the tissue distribution of ABCG2, its expression and activity, as well as its pharmacokinetic interaction, have been performed (Ishikawa *et al.*, 2009; Hardwick *et al.*, 2009). BCRP/ABCG2 protein is expressed mainly in the apical membrane of cells in tissues with secretory functions (liver, kidney, intestine, breast), apical membranes of capillary vessels in the blood-brain barrier and apical membrane of trophoblasts (Robey *et al.*, 2009; Robey *et al.*, 2007). Studies on knock-out mice have indicated that Bcrp1 plays an important role in the milk transport of drugs and xenotoxins, chemotherapeutic agents such as topotecan, cimetidine, fluoroquinolones and vitamins (Van Herwaarden *et al.*, 2006; Jonker *et al.*, 2005). Nitrofurantoin is a nitrofuran-derivate antibacterial agent widely used as a urinary tract antibiotic prescribed for lactating women which is actively extruded into milk by BCRP/ABCG2 (Merino *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). The

ARTÍCULO 2

relevance of nitrofurantoin-BCRP/ABCG2 interaction is evidenced through reports such as the effect of pregnancy on nitrofurantoin disposition (Zhang *et al.*, 2009), nitrofurantoin fetal distribution (Zhan *et al.*, 2007), nitrofurantoin hepatobiliary excretion and sex difference (Merino *et al.*, 2005), all of them performed on *Bcrp1^{-/-}* mice, and also as a rat chemical knock-out model (Wang *et al.*, 2008). Genistein and daidzein are isoflavones, polyphenolic compounds belonging to the flavonoid class; they are abundant in soybeans, they represent the major active components in soy products, although the amount of each isoflavone can vary depending on the soy supplement, and they appear as a mixture in red clover. High intake of soy has been associated with a variety of beneficial effects in several common diseases (Jacobs *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2007). A number of studies have demonstrated inhibition of drug transporters by flavonoids (Morris *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2010). The effect of flavonoids on the pharmacokinetics of nitrofurantoin has been reported in rats by Wang and Morris (2007); these authors showed that oral administration of chrysins (at the high dose of 200 mg/kg), can modify the pharmacokinetics profile of nitrofurantoin. Dihydroflavone is one of the most potent BCRP inhibitors (Zhang *et al.*, 2004). However, neither chrysins nor the flavonoid 7,8- benzoflavone significantly altered the pharmacokinetics of topotecan, a *Bcrp1* substrate, in rats or *mdr1a/1b^{-/-}* (Zhang *et al.*, 2005). A novel recent study on the effect of flavonoid chrysins on nitrofurantoin pharmacokinetics showed that this interaction occurs in rats but not in mice possibly due to the higher levels of BCRP in the small intestine in rats compared with mice (Kawase *et al.*, 2009). We obtained positive results regarding the role of exogenous isoflavones administration in milk secretion of nitrofurantoin in ewes, but interindividual variation made the interpretation of results difficult (Perez *et al.*, 2009).

In vivo inhibition of BCRP/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: a comparative study in Bcrp1^{-/-} mice

The objective of this study was to clarify the proof-of-concept previously observed related to the specific role of BCRP inhibition by isoflavones and its consequences in drug excretion in milk. In addition, the role of soy isoflavones in transport pharmacokinetics and bile and milk secretion of the antibiotic NFT will be assessed. In order to achieve this goal the effects of genistein and daidzein on human BCRP and murine Bcrp1-mediated transport of nitrofurantoin using polarized cell lines was studied. The *in vivo* interaction between genistein-daidzein and NFT was studied through nitrofurantoin concentration in plasma, bile and milk in Bcrp1^{-/-} and wild-type mice.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and Drugs

Nitrofurantoin was purchased from Sigma Chemical Co. (Steinheim, Germany); Genistein and daidzein were purchased from LC Laboratories (PKC Pharmaceuticals, Inc Woburn Ma USA); Isoflurane (Isovet[®]) from Schering-Plough (Madrid, Spain) and oxytocin (Oxiton[®]) from Ovejero (León, Spain). Ko143 has been previously described (23), and was kindly provided by Dr. A.H. Schinkel, Netherlands Cancer Institute (Amsterdam, The Netherlands). All the other chemicals were analytical grade and available from commercial sources.

Animals

Female lactating mice were housed and handled according to procedures approved by the Research Committee of Animal Use of the University of Leon (Spain) and carried out according to the «Principles of Laboratory Animal Care» and the European guidelines described in the EC Directive 86/609. The animals used in the experiments were *Bcrp1*^{-/-} and wild-type mice (9-14 wk), all of >99% FVB genetic background.

The Bcrp1^{-/-} mice were kindly supplied by Dr. AH Schinkel from the Netherlands Cancer Institute. Animals were kept in a temperature-controlled environment with a 12-h light/12-h dark cycle. They received a standard rodent diet (Panlab SA, Barcelona, Spain) and water was available *ad libitum*.

Cell cultures

The polarized canine kidney cell line MDCK-II was used in the transport assays. Human BCRP- and murine Bcrp1-transduced MDCK-II subclones have been previously described (Van Herwaarden *et al.*, 2006; Merino *et al.*, 2006). The MDCK-II cells and transduced subclones were kindly supplied by Dr. AH Schinkel from the Netherlands Cancer Institute. The cells were cultured in DMEM containing glutamax (2 mM L-alanyl-L-glutamine) (Life Technologies, Inc.) and supplemented with penicillin (50 units/ml), streptomycin (50 µg/ml), and 10% (v/v) fetal calf serum (Life Technologies, Inc.) at 37 °C in the presence of 5% CO₂. The cells were trypsinized every 3 to 4 days for subculturing.

Transport studies

Transport assays were carried out as described by Merino *et al.* (2005), with minor modifications. Cells were seeded on microporous membrane filters (3.0 µm pore size, 24 mm diameter; Transwell 3414; Costar, Corning, NY) at a density of 1.0 x 10⁶ cells per well. Cells were grown for 3 days, and the medium was replaced daily. Transepithelial resistance was measured in each well using a Millicell ERS ohmmeter (Millipore, Bedford, MA); wells registering a resistance of 200 ohms or greater, after correcting for the resistance measured in control blank wells, were

ARTÍCULO 2

used in the transport experiments. The measurement was repeated at the end of the experiment to check the integrity of the monolayer. Two hours before the start of the experiment, medium on both the apical and basolateral sides of the monolayer was replaced by 2 ml of Optimem medium (Life Technologies, Inc.), without serum, either with or without 1 μ M Ko143, and the isoflavones at different concentrations: Gen (50 μ M), Daid (50 μ M), Gen(50 μ M)-Daid(50 μ M), or Gen(100 μ M)-Daid(100 μ M). The experiment was started ($t = 0$) by replacing the medium in either the apical or basolateral compartment with fresh Optimem medium, either with or without Ko143, or the different concentrations of flavonoids, and 10 μ M nitrofurantoin content. Aliquots of 100- μ l were taken at $t = 2$ and 4 h, and stored at -20 °C until HPLC analysis. The appearance of nitrofurantoin in the acceptor compartment was presented as the fraction of total nitrofurantoin added to the donor compartment at the beginning of the experiment. The apparent permeability coefficient was calculated as follows:

$$P_{app} = (\Delta Q/\Delta t) \times [1/(A \times C_0)],$$
 where $\Delta Q/\Delta t$ is the rate of nitrofurantoin appearing in the receiver chamber, which was obtained from the slope of the regression line on the transport-time profile of nitrofurantoin across MDCKII cell monolayers, C_0 being the initial concentration of nitrofurantoin loaded in the donor chamber, and A the cell monolayer surface area (4.71 cm²).

The quotient Papp Basolateral-Apical (BL-AP) /Papp Apical-Basolateral (AP-BL) was used as Secretory/Absorptive ratio.

Plasma and milk levels of nitrofurantoin

Nitrofurantoin and isoflavones (Gen-Daid) were administered intragastrically to wild and Bcrp1^{-/-} lactating female mice by oral gavage feeding in four hours fasted

mice, as a solution of 25% ethanol, 25% polyethylenglycol and 50% saline. The oral administration consisted of 100 µl of solution per 30 g body weight.

The mixture Gen (100 mg/kg) - Daid (100 mg/kg) was administered 5 min before NTF (20 mg/kg). The dose administered was 20 mg/kg of NTF in order to make sure of its secretion into milk after oral administration. Blood was collected by orbital bleeding after anesthesia with isoflurane at different time points (10, 30, 60 and 120 min). Two time-points were obtained from each animal. Heparinized blood samples were centrifuged immediately at 1000 x g for 10 min. For milk experiments, pups of approximately 10 days old were separated from their mother approximately 4 hours before the start of the experiment. Oxytocin (200 µl of 1 I.U./ml solution) was administered subcutaneously to lactating dams in order to stimulate milk secretion. Milk was collected at t = 30 min from the mammary glands by gentle vacuum suction. At the end of the experiment mice were subsequently killed by cervical dislocation and the bile in the gall-bladder was obtained and weighed (Perez *et al.*, 2009). The samples collected from plasma, milk and bile were stored at -20 °C until HPLC analysis. Between 4 and 7 animals were used for each experiment.

HPLC Analysis

The conditions for HPLC analysis of nitrofurantoin were modified based on a previously published method (Merino *et al.*, 2005). Samples were thawed and kept protected from light in brown Eppendorf tubes during preparation. To each 50-µl aliquot of sample, 5 µl of a 12.5 µg/ml furazolidone solution was added as an internal standard in a 1.5-ml reaction tube. The mixture was vortexed vigorously, and 50 µl of methanol at -20 °C was added for protein precipitation. Extraction was carried out by

ARTÍCULO 2

vigorously shaking the reaction tube for 60 s and incubating at –30 °C for 15 min. The organic and water phases were separated by centrifugation at 16,000g for 5 min at 4 °C, and 50 µl of the organic phase was injected into the HPLC system.

Separation was performed at 30 °C on a reversed-phase column (Nucleosil 120 C18, 10-µm particle size, 250 x 4 mm), preceded by a precolumn cartridge. The composition of the mobile phase was 25 mM potassium phosphate buffer, pH 3/acetonitrile (75: 25). The flow rate of the mobile phase was set to 1.2 ml/min. UV absorbance was measured at 366 nm. Peak area ratios (nitrofurantoin/furazolidone) were used for comparison with the standard curve. Standard samples in the appropriate drug-free matrix were prepared at concentrations ranging from 1 to 120 µg/ml.

Statistical analysis

Statistical analysis for significant differences was performed using the Anova LSD test. A probability of $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Effects of Genistein and Daidzein on in vitro Transport of Nitrofurantoin

It is known that the flavonoids genistein and daidzein interact as inhibitors of BCRP-mediated efflux of mitoxantrone (Zhang *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2004). However, the effects of genistein and daidzein on BCRP mediated efflux of nitrofurantoin have not been evaluated. Therefore, we first looked at the effects of flavonoids on nitrofurantoin transport in both MDCK parental cells (MDCK-PAR) and MDCK cells expressing either murine Bcrp1 (MDCK-Bcrp1) or human BCRP (MDCK-BCRP).

As can be seen in Fig. 1, and reported by Merino *et al.* (2005), the polarized transport of nitrofurantoin (10 µM) was observed in both MDCK-Bcrp1 and MDCK-BCRP cells in the absence of inhibitors. NTF is a good Bcrp1/BCRP substrate with secretory/absorptive ratios of 6.63 ± 0.96 and 3.80 ± 0.81 in MDCK-Bcrp1, MDCK-BCRP respectively, while the ratio was 0.57 ± 0.06 in the parental cells. This ratio below 1 in the MDCK-II parental cell line suggests low endogenous basally directed transport (Merino *et al.*, 2005). When the specific Bcrp1/BCRP inhibitor Ko143 (1µM) was used, the Bcrp1/BCRP-mediated transport was completely inhibited,

ARTÍCULO 2

resulting in vectorial transport patterns similar to those of the parent MDCK-II cells.

Our results showed that the BL-to-AP transport of NTF (10 μ M) was significantly inhibited by the presence of isoflavones. The BL-AP/AP-BL ratios in presence of Gen(50 μ M)-Daid(50 μ M) decreased significantly with respect to experiments without isoflavones (2.30 ± 0.39 in MDCK-Bcrp1, 0.91 ± 0.03 MDCK-BCRP). The same significant effects were shown when Gen (50 μ M) (BL-AP/AP-BL ratios of 2.55 ± 0.27 in MDCK-Bcrp1, 0.91 ± 0.03 in MDCK-BCRP) and Gen(100 μ M)-Daid(100 μ M) (BL-AP/AP-BL ratios of 2.11 ± 0.35 in MDCK-Bcrp1, 0.80 ± 0.70 in MDCK-BCRP) were added. No effects were seen in the parental cell line. These results suggest that isoflavones genistein and daidzein indeed inhibit both human BCRP and murine Bcrp1 mediated transport of nitrofurantoin in MDCK-cells.

Effects of Genistein and Daidzein on Nitrofurantoin plasma and milk levels in Bcrp1^{-/-} and wild-type mice

In order to attempt to establish a potential correlation between in vitro and in vivo results, we determined inhibition by isoflavones (genistein and daidzein) of NTF disposition mediated by the Bcrp1 protein in wild-type mice compared with Bcrp1 knockout mice. Results showed that plasma concentrations of NTF were significantly higher in wild-type mice after isoflavone administration at 30 min (Table 1). Plasma concentration at 30 min of NTF was unmodified in Bcrp1^{-/-} in both experimental conditions and their values were in the range obtained from wild-type after isoflavone administration. AUC values did not show significant differences after isoflavone treatment.

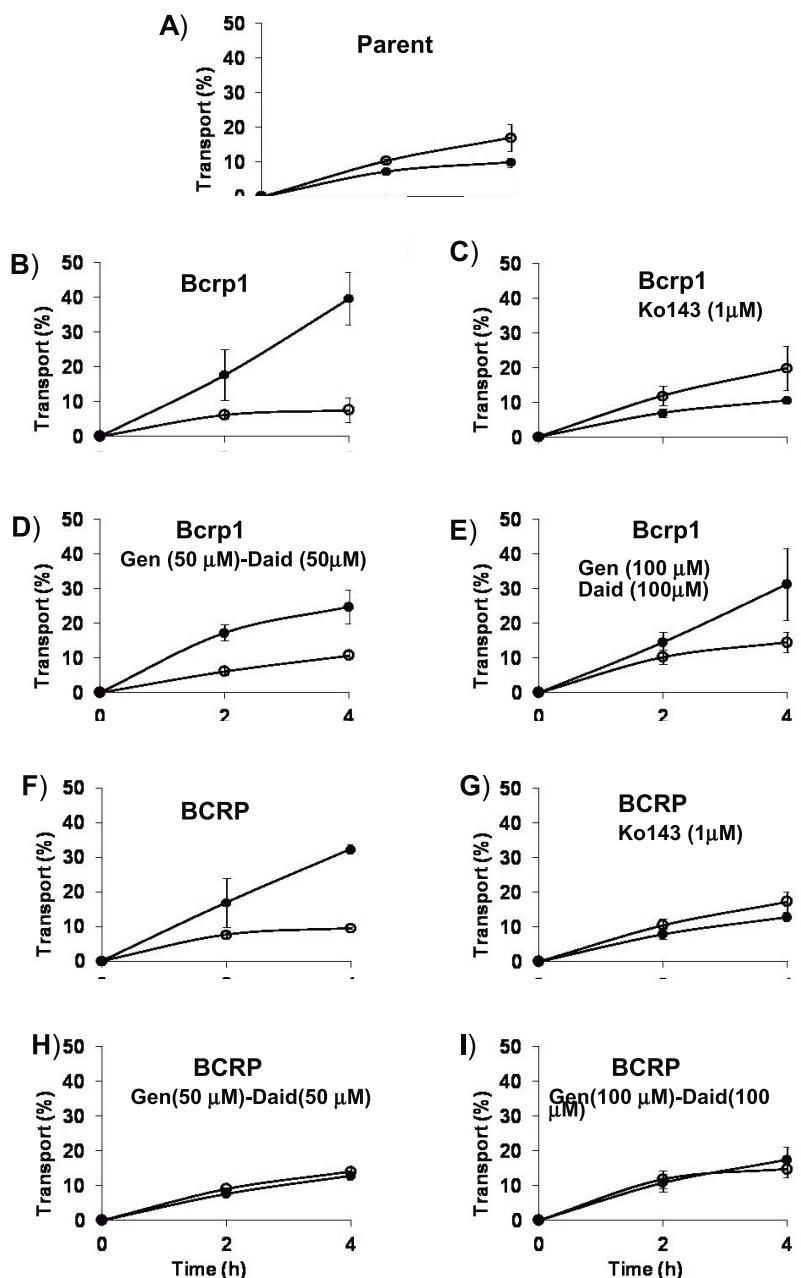


Fig.1. Transwell transport of nitrofurantoin. Transepithelial transport of 10 μ M nitrofurantoin in MDCKII (parent) (A), MDCKII-Bcrp1 (B) and MDCKII-BCRP (F), monolayers. The experiment was started with the addition of nitrofurantoin to one compartment (basolateral or apical). After 2 and 4 h, the percentage of drug in the opposite compartment was measured by HPLC and plotted. BCRP inhibitors, Ko143 (C and G), Gen (50 μ M)-Daid (50 μ M) (D and H) and Gen (100 μ M)-Daid (100 μ M) (E and I) were present as indicated. Results are the means; error bars (sometimes smaller than the symbols) indicate the standard deviations ($n=3$). ●, transport from the basolateral to apical compartment; ○, transport from the apical to basolateral compartment.

ARTÍCULO 2

Regarding milk experiments (Fig. 2), despite the significantly higher plasma level, the concentration of NFT into milk in wild-type mice after the dose of isoflavones was significantly lower than the control wild-type mice group ($55.3 \pm 21.1 \mu\text{g/ml}$ vs $93.5 \pm 19.8 \mu\text{g/ml}$ $p \leq 0.05$). Significant inhibition of active transport of nitrofurantoin in milk was reflected in milk/plasma ratios that were significantly diminished in wild-type lactating females with isoflavones: 4.2 ± 1.6 (NTF+ Gen-Daid) vs 7.1 ± 4.2 (NTF, control), $p \leq 0.05$. (Fig. 2). NTF excretion into milk in knock-out was very low, as was expected, since Bcrp1 is the main mechanism involved in secretion into milk (Merino *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008), with no differences between the two experimental groups (Fig. 2). These results indicate that isoflavones interact with nitrofurantoin *in vivo*.

Table I. Effect of Genistein and Daidzein on plasma nitrofurantoin concentration in female lactating wild-type and Bcrp1^{-/-}

Time (min)	Wild-type	Wild-type Gen-Daid	Bcrp1 ^{-/-}	Bcrp1 ^{-/-} Gen-Daid
10	17.9 ± 3.5	16.1 ± 3.5	26.4 ± 7.7	18.3 ± 2.5
30	10.4 ± 2.1	$17.6 \pm 7.7^*$	$22.4 \pm 13.9^*$	$21.4 \pm 7.0^*$
60	9.3 ± 2.2	9.1 ± 2.8	$15.3 \pm 2.4^*$	17.8 ± 7.2
120	6.6 ± 0.5	6.5 ± 0.4	$9.9 \pm 2.6^*$	$10.5 \pm 2.2^*$
AUC(0-120)	19.1 ± 2.0	21.4 ± 3.4	$32.4 \pm 7.5^*$	$32.1 \pm 7.2^*$

Plasma samples were obtained after oral administration of nitrofurantoin (20 mg /kg) with or without isoflavones (Genistein 100 mg/kg-Daidzein (100mg/kg). Values of nitrofurantoin concentration ($\mu\text{g/ml}$) and AUC ($\mu\text{g/ml h}$) are means \pm SD

* $p \leq 0.05$ significantly different from wild-type without isoflavones.

In addition, *Bcrp1* plays a predominant role in the hepatobiliary excretion of NFT (Merino *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Inhibition by isoflavones of bile excretion of NTF was shown since NTF levels in bile were significantly decreased by isoflavone administration: $8.8 \pm 3.4 \mu\text{g/ml}$ in wild-type (NTF, control) vs $3.7 \pm 3.3 \mu\text{g/ml}$ in wild-type mice (NTF+ Gen-Daid), $p \leq 0.05$ (Fig. 3). In *Bcrp1*^{-/-} mice, as expected, the levels of NTF were very low ($0.64 \pm 0.19 \mu\text{g/ml}$ in the control group and $0.46 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$ after isoflavone administration) without significant differences.

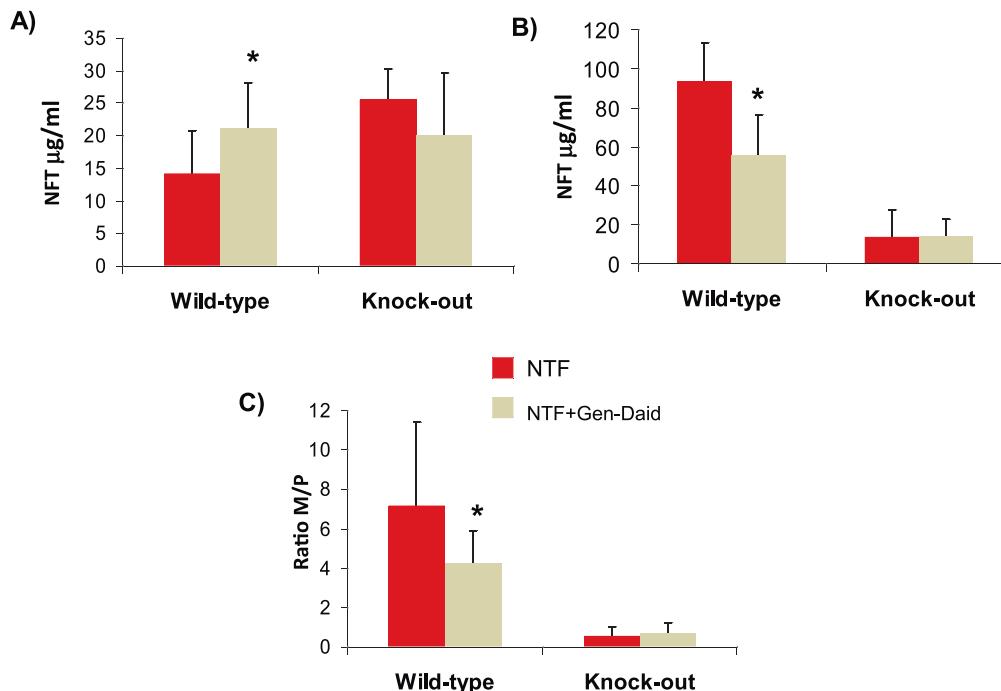
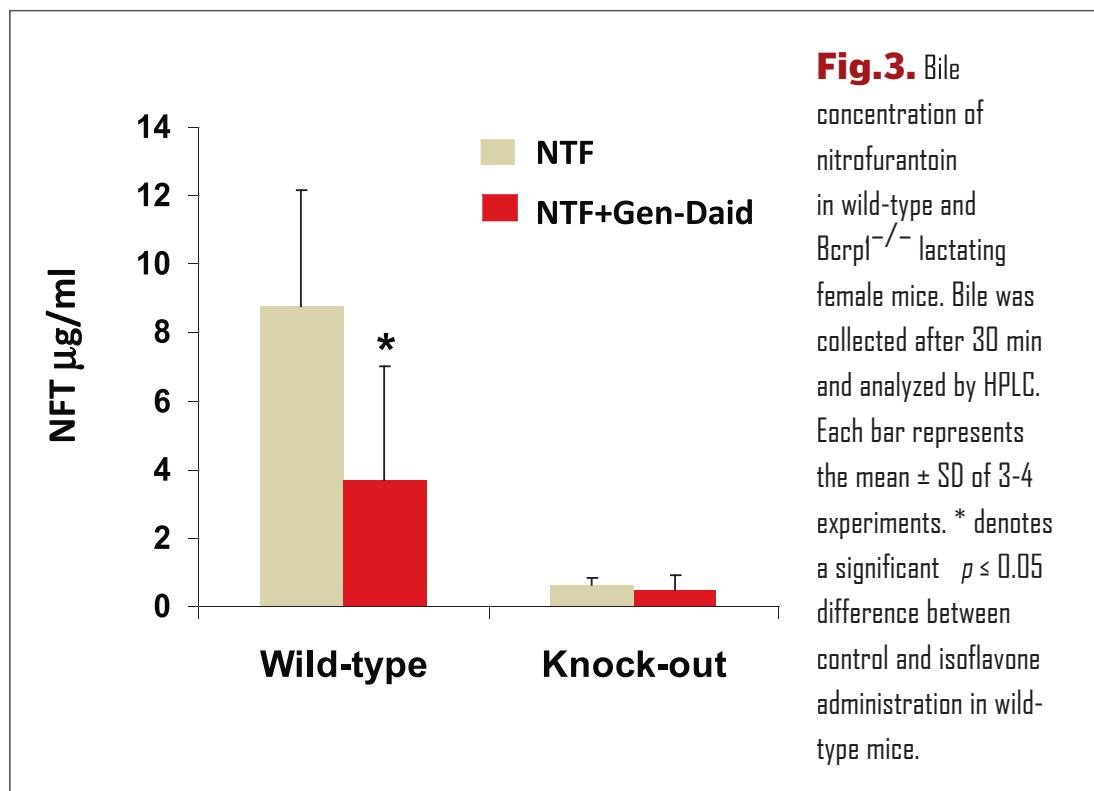


Fig.2. Plasma (A) and milk concentration (B) and milk-to-plasma ratio (C) of nitrofurantoin in wild-type and *Bcrp1*^{-/-} lactating female mice. Nitrofurantoin (20 mg/kg) was administered p.o. to mice 5 min after Gen (100mg/kg)-Daid (100mg/kg) oral administration. Milk and plasma were collected after 30 min and analyzed by HPLC. Each bar represents the mean \pm SD of 3-4 experiments. * denotes a significant $p \leq 0.05$ difference between control and isoflavone administration in wild-type mice.

ARTÍCULO 2

These results accurately support the *in vivo* modulation of Bcrp1 by isoflavones such as genistein and daidzein when the drug, such as nitrofurantoin, is a good substrate of this transporter.



DISCUSSION

The growing interest in flavonoids has resulted in a dramatic increase in the consumption of flavonoid-containing products in the general population for health maintenance and disease prevention, but evidence from animal and human studies has indicated that flavonoids may interact with many clinically important drugs, causing favourable or adverse pharmacokinetic interactions. Some flavonoid-drug interactions are mediated by major efflux drug transporters (Alvarez *et al.*, 2010).

In spite of the results showing in vitro interaction of flavonoids with efflux transporters (Zhang *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2004), there is a disconnection between in vitro and in vivo drug inhibition (Zhang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). In this respect, it is important to consider the potential species differences with regard to flavonoid-BCRP interaction (Zhang *et al.*, 2005; Kawase *et al.*, 2009), and the fact that this interaction could depend on the substrate (Muenster *et al.*, 2008), as well as the effects that these compounds may have on other transporters and enzymes that may be important in the disposition of a drug (Telang *et al.*, 2009). Mouse *Bcrp1* shares only 81% amino acid identity with human BCRP (Allen *et al.*, 1999), and even

ARTÍCULO 2

a single amino acid mutation at position 482 of BCRP was shown to significantly alter BCRP substrate and antagonist specificity (Robey *et al.*, 2009). In corroboration of this, results from the inhibition of nitrofurantoin transport by chrysin administration have shown that the inhibition profile, for the same transporter, is different in mice and rats (Kawase *et al.*, 2009). Even our in vitro data also reveal a species difference regarding the effect of genistein and daidzein on nitrofurantoin transport. In this case, inhibition is higher in cells transduced with human BCRP than the ones with mouse Bcrp1. This species differential inhibition interaction has been previously reported by Wang and Morris (Wang *et al.*, 2007) with NTF and chrysin.

Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2009) add a new element of discussion since efflux transporters Mrp2 and Bcrp1 are shown to compensate for each other and enable the intestinal excretion of flavonoids (naringenin) and presumably other BCRP substrates such as topotecan. The existence of a compensatory mechanism in Bcrp1^{-/-} pregnant mice has also been argued by Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2009) to explain the low AUC values for nitrofurantoin.

Our in vitro results show that isoflavones' main BCRP-mediated inhibition occurs in cells transduced with human BCRP where concentrations of 50µM of genistein and 50µM daidzein completely inhibited nitrofurantoin transport. Notwithstanding these in vitro results, the in vivo inhibition in mice of nitrofurantoin mediated by genistein and daidzein is very significant, and presumably in vivo inhibition of BCRP-mediated NFT transport in humans could occur with high doses of isoflavones.

Our results clearly show that soy isoflavones, genistein and daidzein, through Bcrp1 inhibition, significantly diminished the excretion of nitrofurantoin into milk. The BCRP/ABCG2 function in drug excretion and in drug transfer into milk has been

demonstrated specifically with nitrofurantoin. Bcrp1 plays a major role in the secretion of nitrofurantoin into milk, as indicated by large differences in milk-to-plasma ratios between wild-type and Bcrp1^{-/-} mice; in fact, in the absence of Bcrp1, the only remaining component of the transport is passive diffusion (Merino *et al.*, 2005). Our results, in agreement with those previously published, showed a large difference in the concentration of nitrofurantoin into milk between wild-type and Bcrp1^{-/-} (9-fold higher in the wild-type mice) but we also observed a significant difference between wild-type animals with or without isoflavones, the excretion of NTF into milk being reduced two-fold. These results agree with our preliminary results obtained from lactating sheep (Perez *et al.*, 2009; Pulido *et al.*, 2006), thus confirming that when a drug is a specific substrate of BCRP, milk secretion can be modulated by these isoflavones.

Lactating mice have a high expression of BCRP in the mammary gland, as do other mammalian species (man, sheep, cow) (Jonker *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2006), but BCRP expression elsewhere in the mouse body (liver, kidney, small intestine) is not altered during pregnancy and lactation (Merino *et al.*, 2005). The decreased content of nitrofurantoin in bile in the presence of daidzein and genistein highlights the magnitude of such isoflavone inhibition. Bcrp1 expression in the liver of female mice has been shown to be significantly lower than in male mice; and the role of Bcrp1 in hepatobiliary excretion of NTF in female wild-type mice was almost completely diminished compared to male wild-type mice (Merino *et al.*, 2005). However we observed a significant decrease in NTF levels in bile in the lactating wild-type group with isoflavones: $3.7 \pm 3.2 \mu\text{g/ml}$ vs $8.9 \pm 3.3 \mu\text{g/ml}$ in lactating wild-type control. This indicates that even with relatively low BCRP levels, isoflavones can effectively inhibit BCRP transport (Fig 3).

ARTÍCULO 2

The absence of variations in plasma, bile and milk levels in $Bcrp1^{-/-}$ in the presence of isoflavones underlines the specific participation of the $Bcrp1$ protein in inhibition.

Reports on nitrofurantoin- $Bcrp1$ interaction have highlighted the important contribution of $Bcrp1$ to NFT intestinal elimination, but intestinal degradation and drug enterohepatic circulation could be important contributors to plasma levels (Merino *et al.*, 2005). Therefore, inhibiting $Bcrp1$ by genistein and daidzein might also possibly interfere with nitrofurantoin enterohepatic circulation.

Both isoflavones, genistein and daidzein, act as $Bcrp$ inhibitors in vitro and in vivo (Enokizono *et al.*, 2007), although in vivo they are extensively metabolized to glucuronide and sulphate forms (Zhang *et al.*, 2007). In fact, in rats considerable conjugation activity of genistein has been shown to result in a very low amount in blood circulation as unconjugated compound (Zhou *et al.*, 2008), resulting in low bioavailability (Moon *et al.*, 2006). Presumably, therefore, part of the nitrofurantoin- $Bcrp1$ interaction could involve conjugated forms (Zhang *et al.*, 2007).

The effect of other transporters or enzymes on this reported interaction should not be discounted. Nitrofurantoin is a selective substrate for BCRP/ $Bcrp1$, but not for P-gp and MRP2 (Merino *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). CYP1A mediates the metabolism of nitrofurantoin, although this does not represent a major metabolic pathway (Wang *et al.*, 2007). Isoflavones such as genistein and daidzein do not induce CYPs in either the transcriptional step or through post-transcriptional mRNA (Kishida *et al.*, 2004). On the other hand, the lack of variation in nitrofurantoin levels in knock-out mice after isoflavone administration supports the specificity of the interaction with $Bcrp1$.

Our results reveal that high doses of the main isoflavones present in soy (genistein and daidzein) may be able to modify the disposition of BCRP/ABCG2 substrates.

For clinical implications of our findings, physiological levels of isoflavones in diet should be taken into account. It has been shown that plasma levels that might be reached from a dose of 50 mg of either daidzein or genistein, as typically used in intervention studies (ranging from 37–128 mg per person per day), yield a peak plasma concentration of \sim 2 $\mu\text{mol/L}$ at \sim 6 h (Jacobs *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007). The glycosides are not present in plasma, and most of the isoflavones are conjugated as sulfates or glucuronides (Williamson *et al.*, 2005). Many in vitro studies report inhibition concentrations for BCRP interaction at this concentration range (Zhang *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2004). However, in vivo correlation of these data is very controversial (Zhang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010), and points to the possibility that high doses are needed to show an in vivo interaction. The plasma free-fraction of isoflavones is relatively low and it can be speculated that concentrations of isoflavones were lower than IC_{50} , although it is known that conjugated forms are also active in BCRP interaction (Tamaki *et al.*, 2010) and active deconjugation could occur in the relevant tissues (Imai *et al.*, 2004). Recently, IC_{50} values of 0.24 μM and 2.4 μM for genistein and daidzein respectively, have been reported, and that the inhibitory potency of daidzein was decreased 100-fold by 7-glucuronidation but virtually unaffected by 4'-sulfation (Tamaki *et al.*, 2010). Enokizono (2007) reported that a tissue-to-plasma concentration of genistein and daidzein of 1.5 nM in mice at steady state can interact in vivo with Bcrp1 in brain, testis, epididymus and fetus. In humans after intake of soy milk and soy supplements, isoflavones (genistein and daidzein) reach exposure levels in breast tissue at which potential health effects may occur (Bolca *et al.*, 2010). All this suggests that protein unbound fractions of genistein and daidzein aglycones and metabolites reach target

ARTÍCULO 2

tissues where they might be clearly active and affect Bcrp1 function. Considering dose translation from mice to humans based on body surface area (BSA) (Reagan-Shaw *et al.*, 2007), our doses are approximately equivalent to 16 mg/kg in humans. Using body weight to scale up, our doses give an equivalent dose in humans of 14000 mg (200 mg/kg, 100 mg/kg genistein plus 100 mg/kg daidzein). Experimental works reporting aglycone and total plasma concentrations in mice and humans (Andrade *et al.*, 2010; Setchell *et al.*, 2001) indicate that aglycone concentrations are in the same range for both species after ingestion of similar doses of isoflavones. In any case, one should consider that there are significant interspecies differences in isoflavone metabolism (Gu *et al.*, 2006). For instance, genistein is metabolized more rapidly in mice than in humans (Cimafranca *et al.*, 2010). In addition, UDP-glucuronosyltransferases(UGTs)-efflux transporters coupling in both the intestine and the liver may result in enterohepatic circulation and enteric recycling, leading to longer lasting, and thus accumulation of flavonoids in the body, in particular with repeated intake. Therefore, despite low oral bioavailabilities, flavonoids and some of their bioactive phase II conjugates may accumulate an adequate amount in the body to produce their pharmacological activities (Zhang *et al.*, 2007).

Current research clearly shows that the soy isoflavones genistein and daidzein, through Bcrp1 inhibition, significantly decrease the excretion of nitrofurantoin into milk, thereby opening up new perspectives for future research. BCRP/ABCG2 is expressed in the mammary gland and is induced in lactation. The mammary gland is a target organ of isoflavones, and their metabolites and isoflavones may interact with BCRP/ABCG2. Another of the most outstanding consequences of the interaction between BCRP/ABCG2 and isoflavones is related to the presence of drug residues

in milk, since secretion can be modulated in a feasible manner. In addition, from a therapeutic point of view, soy presence in the diet of lactating females together with the administration of nitrofurantoin in infectious processes must be considered.

Acknowledgements

The authors thank Dr. A.H. Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) who provided MDCK cells and their transduced cell lines, and Bcrp1 knockout mice. We wish to thank Dr. Juan Carlos Espín (CEBAS-CSIC, Murcia, Spain) for assistance in the revision of the manuscript. We are grateful to Prof. James McCue for assistance in language editing. This study was partially supported by the Ministry of Science and Technology (Spain) with the research projects AGL2006-13186, AGL2009-11730 and Ramon y Cajal grant to (GM), Junta de Castilla y León (Research grant LE028A08 to AIA, Research group of Excellence grant GR132 to JGP, predoctoral fellowship to EE) and Diputación de Leon (predoctoral fellowship to RR).

ARTÍCULO 3

MILK SECRETION OF NITROFURANTOIN, AS A SPECIFIC BCRP/ABCG2 SUBSTRATE, IN ASSAF SHEEP: MODULATION BY ISOFLAVONES

Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: modulation by isoflavones

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 32(5):498-502; 2009

Miriam Pérez, Rebeca Real, Gracia Mendoza, Gracia Merino, Julio G. Prieto & Ana I. Alvarez

Department of Biomedical Sciences-Physiology. Faculty of Veterinary Medicine,
Campus Vegazana s/n University of León 24071. Spain.

Running title: Milk secretion of nitrofurantoin

Corresponding Author: Dr. Ana I. Alvarez, Department of Biomedical Sciences-
Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leon, 24071 Leon (Spain).
Phone.: (34) 987 291265; Fax (34) 987 291267; E-mail: aialvf@unileon.es

Abstract

Studies on residues in milk used for human consumption have increased as priority due to health concerns and priority interest in the control of potentially risky drugs. The protein BCRP/ABCG2, present in the mammary epithelia, actively extrudes drugs into the milk and can be modulated by isoflavones. Nitrofurantoin is a specific BCRP substrate which is actively excreted into the milk by this transporter. In this article, nitrofurantoin transport into the milk is studied in four experimental groups: G1-ewes fed with forage with isoflavones; G2-ewes fed with forage with isoflavones and administered exogenous genistein and daidzein; G3-ewes fed with forage without isoflavones; G4-ewes fed with forage without isoflavones and administered exogenous genistein and daidzein. Results show increased levels of nitrofurantoin into milk from ewes without isoflavones (G3) and decreased nitrofurantoin residues into milk when isoflavones were present, either by forage (G1 and G2) or by exogenous administration (G4). The values of Cmax in milk were significantly higher in those groups without isoflavones in forage (G3, G4). Plasma levels were low and unmodified among the groups. Interindividual variation was high. All these results seem to point to a feasible control of drug secretion into milk through isoflavones in the diet when the drug is a good BCRP/ABCG2 substrate.

Key words: Isoflavones, milk secretion, BCRP/ABCG2, pharmacokinetic, sheep

INTRODUCTION

BCRP, the protein coded by ABCG2 gene, is a recently identified transporter that belongs to the ABC (ATP-binding-casette) superfamily that actively extrudes xenotoxins outside of cells (Krishnamurthy & Schuetz, 2006). BCRP can transport a wide range of substrates including chemotherapeutic agents, estrogen derivatives organic anions, etc (Mao & Unadkat, 2005). ABCG2/BCRP has been detected in alveolar epithelial cells in the mammary gland, its expression is increased during lactation in human and several animal species including experimental animals and ruminants (Jonker *et al.*, 2005, Pulido *et al.*, 2006). Its involvement in transport into the milk of toxins such as PhIP, chemotherapeutic agents such as topotecan, cimetidine, fluoroquinolones and vitamins (Jonker *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2006; van Herwaarden *et al.*, 2007) supports the relevance of studying its potential regulation through inhibitors and inductors with the aim of modulating drug excretion into milk.

Flavonoids are polyphenols together with stilbens, phenolic acids and lignanes. In vitro interaction of flavonoids, including isoflavones such as genistein and daidzein,

ARTÍCULO 3

with several ABC transporters, including BCRP/ABCG2, has been demonstrated (Morris & Zang, 2006). In vitro experiments, with mitoxantrone as BCRP substrate, reveal that most of these compounds including genistein and daidzein can interact with BCRP as substrates and inhibitors (Katayama *et al.*, 2007), and in vivo interaction has been shown (Enokizono *et al.*, 2007, Wang & Morris, 2007). In addition, additive effects of multiple flavonoids on BCRP inhibition have been obtained (Zhang *et al.*, 2004).

Isoflavones constitute a flavonoid group particularly abundant in soy (100g of soy content 100-200 mg of isoflavones). The isoflavones daidzein and genistein, and the flavones apigenin and luteolin have been identified as the main flavonoids accumulated in soy cotyledons. Soy is widely used as a protein source in animal forage (Broderick, 1995) and isoflavones are found in milk in the range of µg/ml (Antignac *et al.*, 2003). High probability of interaction of flavonoids with BCRP in the mammary gland exists. Studies by our group have shown that the flavonoids genistein and daidzein inhibit the in vitro transport of enrofloxacin in cell cultures overexpressing BCRP/ABCG2. Subsequent pharmacokinetic data have shown a significant reduction of enrofloxacin in ovine milk when the drug was coadministered with genistein (Pulido *et al.*, 2006). Given the feasibility of oral administration, we proposed to perform studies of milk secretion and plasma levels of a drug, nitrofurantoin, in Assaf sheep fed with controlled diets of isoflavones including normal diets with alfalfa hay, and diets without isoflavones. Nitrofurantoin was the drug chosen since it is actively excreted in milk by a process mediated by BCRP (Gerk *et al.*, 2001; Merino *et al.*, 2005). Nitrofurantoin is a drug belonging to the groups of nitrofurans, which have restrictions since they are considered to be mutagenic and carcinogenic agents (Anon 1991), and

for this reason, their use has been banned in veterinary therapeutics in the EU since 1995 (Council Reg. No 2377/90 Annex IV). We have nitrofurantoin as a model BCRP substrate to perform a proof-concept experiment. On account of nitrofurantoin-BCRP interaction, the transport of this drug into the milk was studied in four experimental groups with the purpose of establishing a feasible control of drug secretion into milk through isoflavones when the drug is a good BCRP/ABCG2 substrate. Our results can be used to clarify the role of isoflavones as potential regulators of the appearance of milk residues.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and Drugs

Nitrofurantoin was purchased from Sigma Chemical Co. (Steinheim, Germany); Genistein and daidzein were purchased from LC Laboratories (PKC Pharmaceuticals, Inc Woburn Ma USA). Methadioxole (Chemical Iberica, Salamanca, Spain). All other compounds used were reagent grade.

Pharmacokinetic studies

The experiments were performed on the Experimental Farm of the University of León in accordance with the guidelines of the Council Directive of the EC (86/609/EEC). Twenty lactating Assaf-breed sheep (3-4 months in lactation) aged 2-3 years and weighing 70-75 kg were used. The sheep were milked twice daily. The animals were parasite-free and drinking water was available ad libitum for all of them. The experimental design was performed with animals divided into four groups. Two groups (Groups 1 and 2) were fed with a standard diet (Table 1) and the other two groups (Groups 3 and 4) were fed for fifteen days with a prepared diet (Tabla 1) by

Nutricor SL (Spain) without isoflavones in their composition. All groups received a single oral dose of 20 mg per kilogram b.w. of nitrofurantoin administered by gavage into the stomach. In addition two groups (Groups 2 and 4) were orally administered exogenous isoflavones (genistein and daidzein 20 mg/kg, 10mg+10mg) 5 min prior to nitrofurantoin administration with the aim confirming our hypothesis that previous administration of isoflavones, would diminishing the drug excretion into milk. Nitrofurantoin was dissolved in 50% (v/v) ethanol and 50% (v/v) polyethylene glycol 400 (Merino *et al.*, 2005). Isoflavones were dissolved in methadioxole. The final volume administered was about 10 ml (nitrofurantoin) and 5 ml (isoflavones). Blood samples were collected from the jugular vein not used for drug administration, before, and 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 hours thereafter. Plasma was separated by centrifugation at 1200xg for 15 min and stored at -20 °C until analysis. Milk samples were collected after complete milking of the gland, before each treatment and at intervals of 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 hours thereafter. Samples were stored at -20 °C until analysis.

HPLC Analysis

The conditions for HPLC analysis of nitrofurantoin were modified based on a previously published method (Merino *et al.*, 2005). Samples were thawed and kept protected from light in brown Eppendorf tubes during preparation. To each 50- μ l aliquot of sample, 5 μ l of a 12.5 μ g/ml furazolidone solution was added as an internal standard in a 1.5-ml reaction tube. The mixture was vortexed vigorously, and 50 μ l of methanol at -20°C was added for protein precipitation. Extraction was carried out by vigorously shaking the reaction tube for 60 s and incubating at -30°C for 15 min. The organic and water phases were separated by centrifugation at 16,000g for 5 min at 4°C, and 50 μ l of the organic phase was injected into the HPLC system.

Table 1.

Detailed composition of forages (%). Standard diet (with isoflavones) G1 and G2. Diet without isoflavones G3 and G4. In order to ensure the absence of isoflavones (G3 and G4), ewes were fed with diet 15 days prior to experimental procedure.

Standard diet Ingredient	%	Diet without isoflavones Ingredient	%
Dehydrated alfalfa hay	52.3	Barley straw	16.89
Barley grain	15.0	Corn grain	16.89
Corn grain	15.0	DDGS Barley	16.89
Soybean meal	7.0	Barley	16.89
Beet pulp	3.5	Rape	13.51
Cotton seed	3.5	Cotton seed	10.14
Molasses	2.0	Beet pulp	6.76
Vitamin and mineral supplement	1.7	Vitamin and mineral supplement	2.02

Separation was performed at 30°C on a reversed-phase column (Nucleosil 120 C18, 10-µm particle size, 250 x 4 mm), preceded by a precolumn cartridge. The composition of the mobile phase was 25 mM potassium phosphate buffer, pH 3/acetonitrile (75:25). The flow rate of the mobile phase was set to 1.2 ml/min. UV absorbance was measured at 366 nm. Peak area ratios (nitrofurantoin/furazolidone) were used for comparison with the standard curve. Standard samples in the appropriate drug-free matrix were prepared at concentrations ranging from 0.12 µg/ml to 20 µg/ml.

Pharmacokinetic calculations and statistical analyses

The peak concentration (Cmax) and time-peak concentrations (Tmax) were read from the plotted concentration-time curve for each animal. The area under the

plasma concentration-time curves (AUC) from time zero to the moment at which the concentration (C_p) was no longer measurable was calculated using the linear trapezoidal rule. The mean residence time (MRT) was calculated by the linear trapezoidal rule without extrapolation to infinity, using the formula:

$$MRT = AUMC / AUC,$$

where AUMC is the mean area under the momentum curve.

Results are presented as the mean \pm standard error (SEM). Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), using the Dunnet test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

The milk concentration levels in sheep are shown in Fig. 1. Pharmacokinetic parameters of nitrofurantoin in plasma and milk are shown in Tables 2 and 3. Our data clearly show that nitrofurantoin is actively transported into the milk of ewes, the observed AUC Milk/ Plasma (Table 3) was much higher than the theoretical ratio according to its lipid distribution coefficient and its protein binding (Kari *et al.*, 1997; Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2000). The dose of nitrofurantoin (20 mg/kg) was used in pharmacokinetic experiments in buffalo (Mir & Uppal 1984) which reported Cmax about 2 µg/ml. Unexpected, plasma levels obtained in our experimental results were very low with high interindividual variation. The non-compartmental analyses did not show significant differences in plasma parameters (Table 2) but plasma AUC levels tended to be lower with exogenous isoflavones. When BCRP is efficiently inhibited, plasma levels are higher (Merino *et al.*, 2004; Wang y Morris 2007). The decrease in plasma AUC and Cmax suggests a systemic effect: either a decreased absorption or an enhanced elimination. BCRP transporter is highly expressed in the epithelium of small intestine, colon and canalicular membrane of hepatocytes. Merino *et al.*

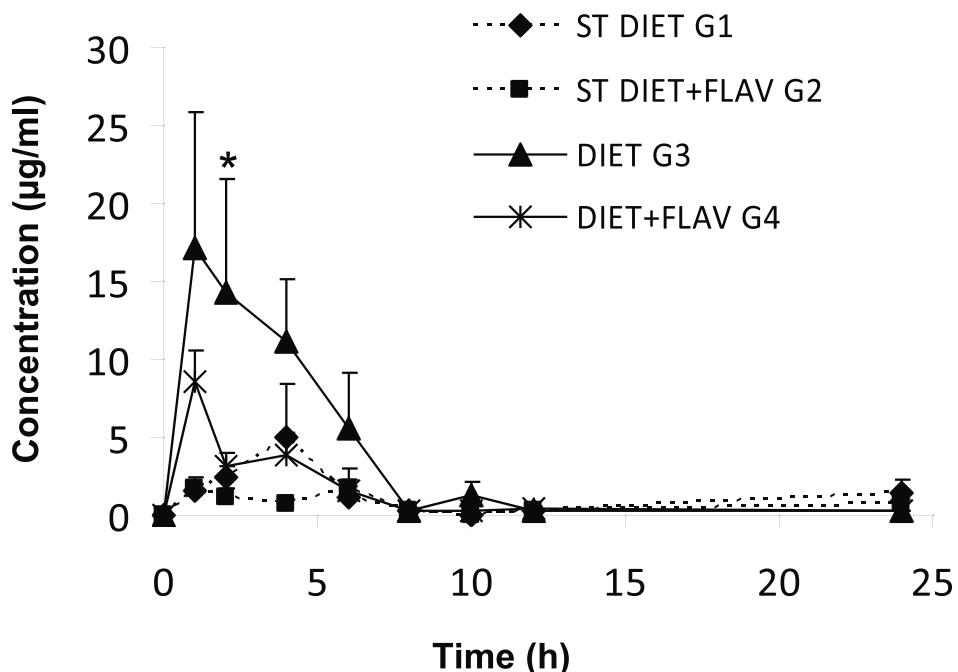


Figura 1. Mean (\pm SEM) milk concentration of nitrofurantoin after oral administration at dose rate of 20 mg/kg in sheep coadministered obtained in four experimental groups: Group 1 (Standard diet); Group 2 (Standard diet + Genistein-Daidzein, 20 mg/kg); Group 3 (Modified diet, without isoflavones); Group 4 (Modified diet + Genistein-Daidzein 20 mg/kg) ($n= 4-5$). * Significant differences , $P \leq 0.05$.

Table 2.

Mean (\pm SEM) pharmacokinetic parameters of nitrofurantoin in plasma after oral administration at dose rate of 20 mg/kg in sheep. Experimental groups: Group 1 (Standard diet); Group 2 (Standard diet + Genistein-Daidzein, 20 mg/kg); Group 3 (Modified diet, without isoflavones); Group 4 (Modified diet + Genistein-Daidzein 20 mg/kg) ($n= 4-5$)

Plasma	Nitrofurantoin (Standard Diet)	Nitrofurantoin (Standard Diet) + GEN-DAID)	Nitrofurantoin (Modified Diet)	Nitrofurantoin (Modified Diet) + GEN-DAID)
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
AUC ($\mu\text{-h}/\text{ml}$)	2.2 ± 1.8	1.8 ± 0.7	7.9 ± 6.8	2.7 ± 2.2
Cmax ($\mu\text{/ml}$)	0.35 ± 0.1	0.46 ± 0.2	2 ± 1.68	0.64 ± 0.37
MRT (h)	21.35 ± 17.6	14.22 ± 6.08	13.8 ± 7.47	9.36 ± 6.93
Tmax (h)	1	1	1	1.6 ± 1.2

ARTÍCULO 3

(2005) reported that Bcrp1 restricts nitrofurantoin oral bioavailability by reducing its intestinal absorption, but this could not be definitively demonstrated, because fecal excretion of unchanged nitrofurantoin was negligible and also not different between wild-type and Bcrp1 $^{−/−}$ mice. This emphasizes that contribution of Bcrp1 to intestinal elimination is important but it is not the only process accounting in nitrofurantoin pharmacokinetic profile. In addition, the authors pointed out the intestinal degradation and the enterohepatic circulation as important contributors to plasma levels.

The hepatic clearance of nitrofurantoin is rather low (Jonen 1980) and kidneys are the primary factor in the disposition of drug (Buzard *et al.* 1961) Nitroreduction by intestinal flora (together with nitroreduction by body tissues) has a major contribution in the elimination of the drug (Buzard *et al.*, 1961). The predominant metabolic way for nitro-reduction is the closely resemble NADPH-cytochrome c reductase activity (Boyd *et al.* 1978). It has been described the inhibition of human NADPH-cytochrome c reductase in vitro by herbal extracts (Liu *et al.*, 2006), likely this inhibition could increase nitrofurantoin plasma levels. Our modified diet (Table 1) includes corn, barley, rape, and cotton seed and the possibility of inhibition of metabolism of nitrofurantoin as a responsible on the systemic variation of drug could be not rejected in animals from these groups (G3 and G4) where the plasma AUC was increased (Table 2).

About the possible induction of BCRP by isoflavones before nitrofurantoin administration, genistein had no effect on BCRP mRNA expression (Ebert *et al.*, 2007).

CYP1A-mediated metabolism of nitrofurantoin (Jonen 1980), although does not represent a major metabolic pathway (Wang & Morris, 2007). Dietary isoflavones such as genistein and daizdein do not induce CYPs in either the transcriptional step or through post-transcriptional mRNA (Kishida *et al.*, 2004).

In addition, results from inhibition of nitrofurantoin transport by chrysin administration in rats showed that inhibition profile, for the same transporter, change in mice and rats (Wang & Morris, 2007) this inhibition profile for sheep could be different.

The secretion of nitrofurantoin into the milk was decreased following the coadministration of the isoflavones (Table 3). Following exogenous coadministration of genistein and daidzein, nitrofurantoin levels decreased from one to eight hours but due to the high variation among the animals, only Group 3 showed statistically significant differences (Fig.1). The corresponding AUC (trapezoidal rule) values in Table 3 showed a significant reduction in milk values in all experimental groups compared with the Group 3 (25.27 ± 11.4 , 13.82 ± 7.0 and 26.84 ± 10.91 versus 83.55 ± 68.42 , $P \leq 0.05$).

Table 3.

Mean (\pm SEM) pharmacokinetic parameters of nitrofurantoin in milk after oral administration at dose rate of 20 mg/kg in sheep. Experimental groups: Group 1 (Standard diet); Group 2 (Standard diet + Genistein-Daidzein, 20 mg/kg); Group 3 (Modified diet, without isoflavones); Group 4 (Modified diet + Genistein-Daidzein 20 mg/kg) (n= 4-5)

Milk	Nitrofurantoin (Standard Diet)	Nitrofurantoin (Standard Diet + GEN-DAID)	Nitrofurantoin (Modified Diet) + GEN-DAID)	Nitrofurantoin (Modified Diet)
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
AUC (μg·d/ml)	$25.27 \pm 11.4^*$	$13.82 \pm 7.0^*$	83.55 ± 68.42	$26.84 \pm 10.91^*$
Cmáx (μg/ml)	$5.17 \pm 3.92^*$	$2.62 \pm 1.55^*$	18.3 ± 14.2	9.92 ± 2.25
Tmax (h)	3.5 ± 0.86	2.2 ± 1.93	1.75 ± 1.29	$1.6 \pm 1.$
t 1/2(h)	2.8 ± 0.3	3.3 ± 1.6	6.7 ± 2.3	2.7 ± 1.1
Dose secreted in milk(24 h)*	4.3 (%)	2.4 (%)	18 (%)	8 (%)
AUC Milk/Plasma	14.2 ± 7.1	8.45 ± 4.1	11.3 ± 3.7	17.7 ± 13.2

* Difference from Group 3, $P \leq 0.05$. a (individual milk yield, approx.5 L)

ARTÍCULO 3

BCRP function in drug excretion and in drug transfer into milk has been demonstrated specifically with nitrofurantoin (Merino *et al.*, 2005). Both isoflavones, genistein and daidzein act as Bcrp inhibitors *in vitro* and *in vivo* (Katayama *et al.*, 2007, Enokizono *et al.*, 2007) but in vivo both genistein and daidzein are extensively metabolized to glucuronide and sulphate forms (Zhang *et al.*, 2007). Sheep present a considerable conjugation activity of some isoflavones in the gastrointestinal epithelium (Lundh, 1995), as a result of a very minor part reaches the blood circulation unconjugated. Some recently research focused the role of efflux transporter in disposition of natural polyphenol via coupled metabolism pathways which involved metabolic activities of conjugating enzymes and efflux transporters (Zhang *et al.*, 2007). So presumably some of the interaction with BCRP could involve conjugated forms, in fact, the important role of Bcrp1 in the extrusion of glucuronide and sulfates conjugates from enterocyte to intestinal lumen had been showed (Adachi *et al.*, 2005). Moreover, competitive inhibition of flavonoid conjugation could also occur in the presence of various flavonoids and xenobiotics in the intestine. In these conditions, significant amounts of free aglycones could circulate in blood (Manach *et al.*, 2004).

Previous results showed the influence of flavonoids and its role in milk secretion of the fluoroquinolone, enrofloxacin (Pulido *et al.*, 2006). The results from this proof-concept experiment demonstrate that when a drug is a specific BCRP substrate, milk secretion can be modulated through isoflavones in a feasible manner since drug interaction with flavonoids occurs *in vivo*. This type of interaction is complex and further research will necessary to elucidate the role of flavonoids into milk secretion since the presence of conjugates metabolites and other components present in a modified diet without isoflavones which could interfere in drug absorption and elimination.

Acknowledgements

This study was supported by the Ministry of Science and Technology (Spain) with the research project AGL2006-13186 (to AIA and MP) and Ramón y Cajal fellowship (to GM). All the experiments performed in this work comply with current EEC laws.

The authors thank Dr. A Ruiz Mantecon (Estación Agrícola Experimental, CSIC, León, Spain) for helpful discussion and contributions as this work progressed.

ANEXO II

VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE ISOFLAVONAS EN LA SANGRE DE OVEJAS ASSAF ADMINISTRADAS CON DISTINTAS DIETAS Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE NITROFURANTOÍNA EN LECHE

Valoración de los niveles de isoflavonas en la sangre de ovejas assaf administradas con distintas dietas y su relación con los niveles de nitrofurantoína en leche

1) GRUPOS EXPERIMENTALES

Los experimentos se realizaron en la granja experimental de la Facultad de Veterinaria de la ULE. Se utilizaron 20 ovejas de la raza Assaf divididas en 4 grupos experimentales (5 animales por grupo experimental):

Grupo 1 (G1): NITRO (dieta estándar con isoflavonas).

Grupo 2 (G2): NITRO+GEN DAID (dieta estándar con isoflavonas).

Grupo 3 (G3): NITRO (dieta modificada sin isoflavonas).

Grupo 4 (G4): NITRO+GEN DAID (dieta modificada sin isoflavonas).

Los Grupos 1 y 2 están alimentados con alfalfa (con isoflavonas), la diferencia entre ellos es que al Grupo 2 se le administra antes de la nitrofurantoina (20 mg/kg) una dosis adicional de isoflavonas (genisteína 10 mg/kg-daidzeína 10 mg/kg) de forma exógena.

Los Grupos 3 y 4 fueron alimentados durante 15 días con una dieta que excluía las isoflavonas, pero el Grupo 4, antes de la administración de la nitrofurantoina recibió genisteína y daidzeína de forma análoga al Grupo 2. Todas las formulaciones se administraron vía intragástrica.

ANEXO 2

Tabla 1.

Dieta estandar	%	Dieta modificada sin isoflavonas	%
Alfalfa deshidratada	52.3	Paja cebada	16.89
Cebada	15.0	Maiz grano	16.89
Harina de maiz	15.0	DDGS Cebada	16.89
Soja 44%	7.0	Cebada	16.89
Pulpa remolacha	3.5	Colza	13.51
Semilla algodón	3.5	Semilla algodón	10.14
Melaza caña	2.0	Pulpa remolacha	6.76
Suplemento Vit. y minerales	1.7	Suplemento Vit. y minerales	2.02

Composición detallada de los forrajes (%). Dieta normal (con isoflavonas) G1 y G2. Dieta sin isoflavonas G3 y G4. Los animales estuvieron alimentados con estas dietas 15 días antes del experimento.

2) TOMA DE MUESTRAS Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las muestras empleadas para la determinación de isoflavonas en plasma y leche son las mismas que las obtenidas en la farmacocinética de la nitrofurantoína en ovejas Assaf.

Con respecto a las condiciones cromatográficas, el método para la determinación de flavonoides en las muestras de plasma ha sido desarrollado a partir demétodo de Sahito *et al.*, (2004), con modificaciones. Brevemente, para la determinación de la genisteína y daidzeína totales, se toman 300 µl de muestra al que se le añade 300 µl de un buffer de acetato de sodio 0,1 M, pH 5 y 1440 Unidades Fishman de beta-glucuronidasa y 7 U de sulfatasa. La mezcla se incuba durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación se le añade 20 µl de apigenina (1 µg/ml) como estándar interno. Los flavonoides se extraen del hidrolizado mediante 2 ml de éter, posteriormente se centrifugan a 15000 rpm 10

minutos. Cada muestra de plasma es extraída dos veces y, los extractos obtenidos en cada ocasión se juntan y son evaporados a sequedad, resuspendiéndose en 100 µl de agua/metanol (1:1) antes del análisis por HPLC.

La hidrólisis rompe todos los metabolitos conjugados (con glucurónido y con sulfato) y les convierte en agliconas. Así, las isoflavonas totales (medidas como genisteína y daidzeína totales) provienen del plasma hidrolizado, mientras que las agliconas se analizan del plasma sin hidrolizar. El contenido de conjugados por tanto, es la resta de ambos valores en cada caso y se expresan como genisteína conjugada y daidzeína conjugada.

Para la determinación de los flavonoides se utiliza un cromatógrafo líquido-líquido «Waters», formado por los siguientes módulos: columna X-terra-MS C18 5µm (4,6×250mm), bomba de doble pistón con autoinyector «Waters» (modelo 2695), detector photodiode array «Waters» (modelo 2998) y sistema de captura de datos basado en el software de «Waters» Empower. Para la fase móvil se utiliza una mezcla isocrática de 60/40 de ácido fórmico 0,05% y acetonitrilo/metanol (20/80) manteniendo el flujo a 1,5ml/min. La detección se realiza a una longitud de onda de 254nm y a una temperatura de análisis de 40°C.

3) RESULTADOS

Las tablas 2-5 corresponden a los niveles de Flavonoides obtenidos en los grupos experimentales. Los resultados obtenidos muestran que los animales alimentados con dieta estándar (G1) presentan unos niveles bajos de isoflavonas (Tabla 2), estando ausentes en los animales alimentados con la dieta modificada (G3) (Tabla 4). Los grupos que fueron administrados con isoflavonas exógenas; genisteína y daidzeína (20 mg/kg; 10 mg + 10 mg) presentaron niveles significativamente mayores (G2

ANEXO 2

y G4), de las isoflavonas en plasma (Tablas 3 y 5). Tanto en las tablas como en la figura aparecen los niveles de nitrofurantoína en leche obtenidos en las distintas condiciones experimentales. La secreción de nitrofurantoína en leche disminuye con la coadministración de isoflavonas, (Figura 1) aunque debido a la alta variación interindividual, solo el grupo tres presenta diferencias estadísticamente significativas. Los valores de AUC de nitrofurantoína en leche son menores en todos los grupos comparados con el grupo 3 que no presenta isoflavonas en su plasma (25.27 ± 11.4 G1, 13.82 ± 7.0 G2 y 26.84 ± 10.91 G4 versus 83.55 ± 68.42 G3, $P \leq 0.05$). Mientras que el AUC de la genisteína total en los distintos grupos experimentales fue: 0.19 ± 0.04 G1; 2.9 ± 1.6 G2 y 5.5 ± 2.5 G4; y de la daidzeína total 0.64 ± 0.18 G1; 7.3 ± 2.9 G2 y 10.8 ± 2.3 G4. Los mayores niveles de daidzeína en el plasma indican una mayor biodisponibilidad de esta isoflavona (Piskula *et al.*, 2000).

Tabla 2.

Tiempo (h)	Nitrofurantoína	Genisteína total	Genisteína conjugada	Daidzeína total	Daidzeína conjugada
1	1.63 ± 0.74	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.02
2	2.43 ± 1.37	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.04
4	4.07 ± 5.15	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.11 ± 0.05	0.09 ± 0.03
6	1.25 ± 1.15	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.04	0.06 ± 0.02
8	0.21 ± 0.05	nd	nd	nd	nd
10	1.15 ± 1.96	nd	nd	nd	nd
12	0.22 ± 0.05	nd	nd	nd	nd
24	1.36 ± 1.85	nd	nd	nd	nd

Niveles medios (\pm DE) de Nitrofurantoina en leche ($\mu\text{g/ml}$) y genisteína y daidzeína total y conjugada ($\mu\text{g/ml}$) en plasma obtenidos a lo largo del estudio cinético en ovejas Assaf. N= 4-5 animales. **Grupo 1 (dieta estandar).**

Valoración de los niveles de isoflavonas en la sangre de ovejas assaf administradas con distintas dietas y su relación con los niveles de nitrofurantoína en leche

Tabla 3.

T (H)	Nitrofurantoína	Genisteína total	Genisteína conjugada	Daidzeína total	Daidzeína conjugada
1	1,76±1,50	0,40±0,29	0,39±0,29	0,87±0,43	0,84±0,42
2	1,08±1,30	0,27±0,36	0,21±0,26	0,60±0,60	0,52±0,50
4	0,68±0,73	0,17±0,13	0,13±0,15	0,49±0,48	0,47±0,49
6	1,21±1,94	0,17±0,13	0,13±0,15	0,47±0,29	0,44±0,29
8	0,19±0,03	0,07±0,04	0,06±0,04	0,36±0,41	0,35±0,41
10	0,17±0,00	0,05±0,01	0,04±0,01	0,32±0,36	0,32±0,36
12	0,22±0,06	0,10±0,16	0,09±0,16	0,17±0,11	0,16±0,10
24	0,75±0,67	0,14±0,10	0,05±0,05	0,29±0,19	0,18±0,14

Niveles medios (\pm DE) de Nitrofurantoina en leche($\mu\text{g/ml}$) y genisteína y daidzeína total y conjugada ($\mu\text{g/ml}$) en plasma obtenidos a lo largo del estudio cinético en ovejas Assaf. N= 4-5 animales. **Grupo 2 (dieta estandar + Genisteína-Daidzeína).**

Tabla 4.

Tiempo (h)	Nitrofurantoína	Genisteína total	Genisteína conjugada	Daidzeína total	Daidzeína conjugada
1	17,09±17,60	nd	nd	nd	nd
2	15,30±17,70	nd	nd	nd	nd
4	11,20±7,85	nd	nd	nd	nd
6	5,53±7,16	nd	nd	nd	nd
8	6,26±11,93	nd	nd	nd	nd
10	1,28±1,84	nd	nd	nd	nd
12	0,33 ± 0,14	nd	nd	nd	nd
24	0,20 ± 0,02	nd	nd	nd	nd

Niveles medios (\pm DE) de Nitrofurantoina en leche($\mu\text{g/ml}$) y genisteína y daidzeína total y conjugada ($\mu\text{g/ml}$) en plasma obtenidos a lo largo del estudio cinético en ovejas Assaf. N= 4-5 animales. **Grupo 3 (dieta modificada).**

ANEXO 2

Tabla 5.

Tiempo (h)	Nitrofurantoína	Genisteína total	Genisteína conjugada	Daidzeína total	Daidzeína conjugada
1	8,55±4,41	1,12±0,42	1,06±0,40	1,59±0,61	1,54±0,60
2	3,11±2,09	0,71±0,27	0,61±0,31	1,48±0,44	1,39±0,54
4	3,85±3,10	0,62±0,29	0,54±0,29	1,18±0,28	1,09±0,30
6	1,58±1,74	0,50±0,40	0,44±0,37	0,86±0,35	0,80±0,32
8	0,34±0,10	0,14±0,11	0,12±0,11	0,34±0,18	0,32±0,18
10	0,22±0,05	0,10±0,06	0,09±0,05	0,25±0,07	0,25±0,08
12	0,26±0,14	0,07±0,04	0,06±0,04	0,18±0,03	0,18±0,04
24	0,18±0,02	0,02±0,01	0,01±0,01	0,07±0,02	0,07±0,02

Niveles medios (\pm DE) de Nitrofurantoina en leche($\mu\text{g}/\text{ml}$) y genisteína y daidzeína total y conjugada ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en plasma obtenidos a lo largo del estudio cinético en ovejas Assaf. N= 4-5 animales. **Grupo 4 (dieta modificada + Genisteína-Daidzeína).**

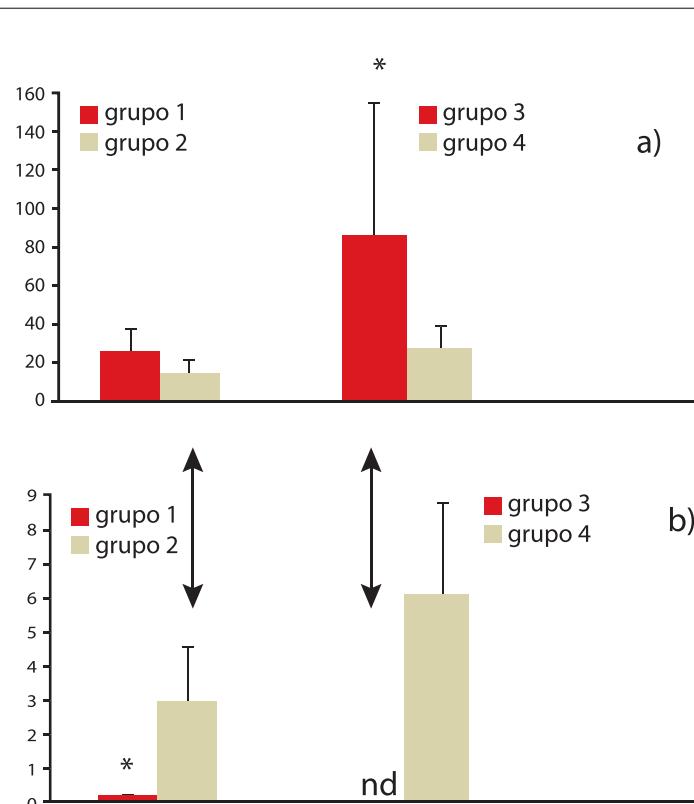


Figura 1. a) muestra los niveles de nitrofurantoína en leche (AUC $\mu\text{g} \text{ h}/\text{ml}$) b) los niveles de genisteína total en plasma (AUC $\mu\text{g} \text{ h}/\text{ml}$) en los 4 grupos experimentales: G1 Dieta estándar. G2 Dieta estándar + isoflavonas. G3 Dieta modificada G4 Dieta modificada + isoflavonas. La doble flecha señala la relación inversa entre los niveles de nitrofurantoína y los niveles de flavonoides en el plasma (Resultados análogos se han obtenido para la daidzeína (*) diferencias significativas frente al resto, $p \leq 0.05$).

ARTÍCULO 4

INHIBITION OF ABCG2/BCRP TRANSPORTER BY SOY ISOFLAVONES GENISTEIN AND DAIDZEIN: EFFECT ON PLASMA AND MILK LEVELS OF DANOFLOXACIN IN SHEEP

Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep

Veterinary Journal 196(2):203-208; 2013

Miriam Perez a,¹, Jon A. Otero a,b,1, Borja Barrera a,b, Julio G. Prieto a, c, Gracia Merino a,b , Ana I. Alvarez a,b,*

a. Departamento de Ciencias Biomédicas -Fisiología, Facultad de Veterinaria, Campus de Vegazana s/n, Universidad de León, León, España

b. Instituto de Sanidad Animal y Desarrollo Ganadero, Campus de Vegazana s/n, Universidad de León, León, España

c. Instituto Universitario de Biomedicina IBIOMED, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, Universidad de León, León, España

* Corresponding author. Tel.: (34)987291265.

E-mail address: aialvf@unileon.es (A.I.Alvarez)

(1) These authors contributed equally to the work.

Abstract

Danofloxacin is a synthetic fluoroquinolone antibacterial agent and also a substrate for ATP-binding cassette transporter G2/breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP). This protein actively extrudes drugs from cells in the intestine, liver, kidney, and other organs, such as the mammary gland. Our purpose was to determine whether genistein and daidzein, isoflavones present in soy known inhibitors of ABCG2, could diminish the danofloxacin secretion into milk. The results obtained using BCRP transduced MDCK-II cells (Mardin-Darby canine kidney) showed that both isoflavones efficiently inhibited the in vitro transport of the drug. In addition, danofloxacin transport into milk was studied in Assaf sheep. The experimental design with ewes ($n=18$) included: ewes fed with standard forage, ewes fed with soy-enriched forage for fifteen days prior to the experiment , and ewes fed with standard forage and administered exogenous genistein and daidzein. The levels of danofloxacin in the milk of ewes belonging to soy-enriched diet group were decreased. The $AUC(0-24h)$ was 9.3 ± 4.6 versus $16.58 \pm 4.44 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ in the standard forage fed or control group. The plasma levels of danofloxacin were unmodified. The $AUC(0-24h)$ milk/plasma ratio decreased by over 50% in the soy-enriched diet group with respect to the control group (4.90 ± 2.65 vs 9.58 ± 2.17). The exogenous administration of isoflavones did not modify danofloxacin secretion into milk. The relevant conclusion of this study is that milk excretion of a specific substrate of BCRP such as danofloxacin can be diminished by the presence of isoflavones in the diet.

Keywords: danofloxacin, sheep, milk, soy, ABCG2/BCRP, genistein, daidzein.

INTRODUCTION

Danofloxacin is an antibacterial fluoroquinolone effective against a broad range of pathogens responsible for infections of the respiratory tract, the intestinal tract and the mammary gland. Danofloxacin was developed for exclusive use in animals, with pharmacokinetic studies demonstrating that penetration into milk from the circulation is rapid and extensive. Danofloxacin is actively secreted into milk reaching concentrations in milk 10 times higher than in plasma. Transport proteins, such as ATP-binding-cassette (ABC) transporters, are major determinants in the modulation of the accumulation and efflux of antibacterials in virtually all cell types. The ABC transporter G2/breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP) is highly expressed in the mammary tissue (including bovine and ovine mammary gland), particularly during lactation. Recently we demonstrated the essential role of BCRP in the secretion of danofloxacin into milk, and the effect of potential drug-drug interactions in this process using the macrocyclic lactone ivermectin as a BCRP inhibitor in Assaf sheep. Drug-drug interactions leading to inhibition of efflux transporters could result in changes in drug pharmacokinetics and, in the case of BCRP,

ARTÍCULO 4

variations in drug secretion into milk. The use of forage supplemented with BCRP inhibitors has been explored by us in order to control drug milk accumulation and prevent undesirable contamination of milk. This procedure would make it possible to reduce drug withdrawal periods for dairy ewes. The maximum residue limits established for danofloxacin in milk are 30 µg/kg (EMEA/MRL/818/02-FINAL).

Interaction of isoflavones with BCRP in the mammary gland has been demonstrated. Soy is widely used as a protein source in animal forage. The isoflavones daidzein and genistein, and the flavones apigenin and luteolin have been identified as the main flavonoids accumulated in soy (100 g of soy content 100-200 mg of isoflavones).

The purpose of this work was to determine whether genistein and daidzein inhibit the BCRP-mediated milk secretion of danofloxacin both in vitro and in vivo. The main objectives were: 1) to evaluate the effects of a combination of both isoflavones on the trans-epithelial transport of danofloxacin under in vitro conditions; 2) to evaluate the influence of a soy-based diet, containing both isoflavones, on plasma and milk disposition of danofloxacin in sheep.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Drugs

Danofloxacin used in cell cultures was obtained from Fluka Chemie, and for pharmacokinetic studies danofloxacin (Advocin 2.5 %) from Pfizer was used. Ko143 has been previously described as a specific BCRP inhibitor and was obtained from Tocris. Genistein and daidzein were from LC Laboratories. All the other chemicals were analytical grade and available from commercial sources.

Cell cultures

MDCKII cells and their human BCRP- and murine Bcrp1-transduced subclones were kindly provided by Dr. A.H. Schinkel, Netherlands Cancer Institute (Amsterdam, The Netherlands). Culture conditions were as previously described. The cells were cultured in DMEM supplied with glutamax (Life Technologies, Inc.) and supplemented with penicillin (50 units/mL), streptomycin (50 µg/mL), and 10% (v/v) fetal calf serum (MP Biomedicals) at 37 °C in the presence of 5% CO₂. The cells were treated with trypsin every 3 to 4 days for subculturing.

Transport studies

Transepithelial transport assays using Transwell plates were carried out as described previously with minor modifications. Cells were seeded on microporous polycarbonate membrane filters (3.0 µm pore size, 24 mm diameter; Transwell 3414; Costar,) at a density of 1.0×10^6 cells per well. Cells were grown for 3 days, and the medium was replaced every day. Transepithelial resistance was measured in each well using a Millicell ERS ohmmeter (Millipore,); wells registering a resistance of 200 ohms or greater, after correcting for the resistance obtained in blank control wells, were used in the transport experiments. The measurement was repeated at the end of the experiment to check the tightness of the monolayer. Before the start of the experiment, medium at both sides of the monolayer was replaced with 2 mL of Optimem medium (Life Technologies, Inc.), without serum, either without or with the inhibitors (1 µM Ko143 or 100 µM + 100 µM Gen-Daid). After two hours' incubation, the experiment was started ($t = 0$) by replacing the medium in either the apical or basolateral compartment with fresh Optimem medium containing 10 µM danofloxacin, either with or without the inhibitors 1 µM Ko143 or 100 µM + 100 µM Gen-Daid and aliquots of 100 µL were taken from the opposite compartment at $t = 2$ and 4 h, and stored at -20 °C until HPLC analysis. The appearance of danofloxacin in the acceptor compartment was presented as the fraction of total danofloxacin added to the donor compartment at the beginning of the experiment.

Pharmacokinetic studies

The experiments were performed on the Experimental Farm of the University of Leon.

Experimental procedures were approved by the Research Committee of Animal

Use of the University of Leon (Spain). Animals were housed and handled according to institutional guidelines complying with European legislation (86/609/EEC). Eighteen lactating Assaf sheep (3-4 months in lactation) aged 2-3 years and weighing 70-75 kg were used. The sheep were milked twice daily. The animals were parasite-free and drinking water was available ad libitum for all of them. The experimental design was performed with animals divided into three groups of six to study whether the presence of isoflavones would diminish danofloxacin excretion into milk. All groups received a single dose of 1.25 mg/kg (IM) of danofloxacin (Advocin 2.5 %).

One group was fed with a Standard diet, the second group was fed for fifteen days with a soy-enriched diet (Nutricor SL Spain) (Table 1) and a third group fed with Standard diet was orally administered exogenous isoflavones (genistein and daidzein 20 mg/kg, 10 mg/kg + 10 mg/kg) 5 min prior to danofloxacin administration (Dano + Gen-Daid). Isoflavones were dissolved in 25% (v/v) ethanol, 25 % (v/v) polyethylene glycol 400 and 50% (v/v) physiological saline. The final volume of isoflavones administered was approximately 6 mL. Blood samples were collected from the jugular vein at intervals 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h thereafter. Plasma was separated by centrifugation at 1200xg for 15 min and stored at -20 °C until analysis. Milk samples were collected after complete milking of the gland, before each treatment and at intervals of 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h thereafter. Samples were stored at -20 °C until analysis.

HPLC Analysis

The conditions for HPLC analysis of danofloxacin were modified according to previously published methods . Briefly, to each 100 µL aliquot of sample, marbofloxacin (150 µg/mL) as internal standard and 6 mL of chlorophorm were added. Samples were

ARTÍCULO 4

Tabla 5. Composition of the diets

Standard diet Ingredient	(%)	Soy Diet Ingredient	(%)
Dehydrated alfalfa hay	52.3	Dehydrated alfalfa hay	28.99
Barley grain	15.0	Soybean meal	20.29
Corn grain	15.0	Corn meal	20.29
Soybean meal	7.0	Beet pulp	8.70
Beet pulp	3.5	Barley grain	8.70
Cotton seed	3.5	Barley straw	7.25
Molasses	2.0	Cotton seed	2.90
Vitamin and mineral suppl.	1.7	Vitamin and mineral suppl.	2.90
Analysis		Analysis	
Dry Matter (%)	88.53	Dry Matter (%)	90.62
Neutral Detergent Fiber (%)	30.71	Neutral Detergent Fiber (%)	29.87
Crude Protein (%)	17.32	Crude Protein (%)	20.47
Energy (MJ/kg)	8.41	Energy (MJ/kg)	8.15

shaken and the organic and water phases were separated by centrifugation at 5000 x g for 5 min and evaporated to dryness under a nitrogen stream. The samples were resuspended in 100 µL of methanol and injected into the HPLC system. Samples from the transport assays were not processed and 50 µL of the culture media was directly injected into the HPLC system. The system consisted of a Waters 600 pump, a Waters 717 plus autosampler and a Waters 2487 UV detector. Separation of the samples was performed on a reversed-phase column (Phenomenex Synergi 4 µm Hydro-RP 80A). The mobile phase consisted of 25 mM orthophosphoric acid (pH 3.0)/acetonitrile (75:25) and the flow rate of the mobile phase was set to 1.5 mL/min. For transport samples, UV absorbance was measured at 278 nm. For sheep samples, fluorescence

detection was performed at 338 nm (excitation) and 425 nm (emission). Integration was performed using Millennium32 software (Waters).

Standard samples in the appropriate drug-free matrix were prepared, yielding a concentration range from 0.08 µg/mL to 10 µg/mL for transport samples and from 0.01 µg/mL to 3.5 µg/mL for sheep samples. Correlation coefficients (*r*) for danofloxacin ranged between 0.990 and 0.996 for the analysed milk and plasma samples. The extraction recovery for concentrations in the range of the standard curve was between 73-76% for sheep plasma and 89-92% for sheep milk. Inter-assay precision coefficients of variation (CVs) were < 15% and relative error (accuracy) values were < 20%. LOD obtained were 4 ng/mL for sheep plasma and milk, and LOQ were 10 ng/mL for sheep plasma and 5 ng/mL for sheep milk.

Pharmacokinetic calculations and statistical analyses

The peak concentration (C_{max}) and time–peak concentrations (T_{max}) were read from the plotted concentration–time curve for each animal. The area under the plasma concentration–time curves (AUC) from time zero to time of last sampling was calculated using the trapezoidal method (AUC 0-24h). The mean residence time (MRT) was calculated by the linear trapezoidal rule without extrapolation to infinity, using the formula: MRT=AUMC/AUC; where, AUMC is the mean area under the momentum curve. These calculations were made using the PK Solutions computer program (Farrier, 1997) and determined by non-compartmental analyses.

Results are presented as the mean ± standard deviation (SD). Statistical evaluation of data was carried out by analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls test. A probability of *P* ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

In vitro transport of danofloxacin and genistein and daidzein interaction

Parental and transduced cell lines were grown to confluent polarized monolayers on porous membrane filters, and vectorial transport of danofloxacin (10 µM) across the monolayers was determined. In the MDCK-II parental cell line, apically and basolaterally directed translocations were similar (Fig. 1). In the Bcrp1-transduced MDCK-II cell lines, apically directed translocation was highly increased and basolaterally directed translocation drastically decreased. When the human BCRP-transduced cell line was used, efficiency in directional transport was lower than in the case of the murine Bcrp1-transduced cell line. The Basal-Apical/Apical-Basal ratio (Table 2) corresponding to m-Bcrp1 and to H-BCRP show highly efficient transport of danofloxacin by murine Bcrp1 and moderate transport by human BCRP. The bidirectional transport of danofloxacin was assessed in the presence of the isoflavones genistein and daidzein. Transport drastically decreased by 100 µM +100 µM genistein-daidzein in both the murine Bcrp1- and the human BCRP-transduced cell lines, resulting in a vectorial translocation pattern similar to that obtained with the

specific BCRP inhibitor Ko143 (Fig. 1, Table 2). These results reveal that isoflavones (Gen-Daid) are very good inhibitors of the Bcrp1/BCRP-mediated transport of danofloxacin.

Plasma and milk danofloxacin pharmacokinetics: interaction with genistein and daidzein

Plasma and milk concentrations of danofloxacin were measured in the three experimental groups: ewes fed with standard forage (Dano), ewes fed with forage supplemented with soy (Dano + Soy Diet), and ewes fed with standard forage and administered exogenous genistein and daidzein (Dano + Gen-Daid). The mean plasma concentrations in sheep are shown in Fig. 2. Pharmacokinetic parameters of danofloxacin in plasma and milk are shown in Table 3. No significant differences were noted in plasma concentration or plasma pharmacokinetic parameters between the animals administered with soy enriched diet or with exogenous isoflavones. The secretion of danofloxacin into milk decreased significantly after feeding ewes fifteen days with soy enriched diet (Dano+ Soy diet) (Fig. 3); the corresponding AUC(0-24h) $\mu\text{g h/mL}$ showed a significant reduction of about 44 %. In addition, the AUC(0-24h) milk/plasma ratio drastically diminished (50 %) in the soy diet group. The percentage of the dose of danofloxacin excreted in milk in this group was significantly decreased corroborating the pharmacokinetic results (Table 3). These data reliably show the potential role of soy-enriched diet in the secretion of danofloxacin into milk.

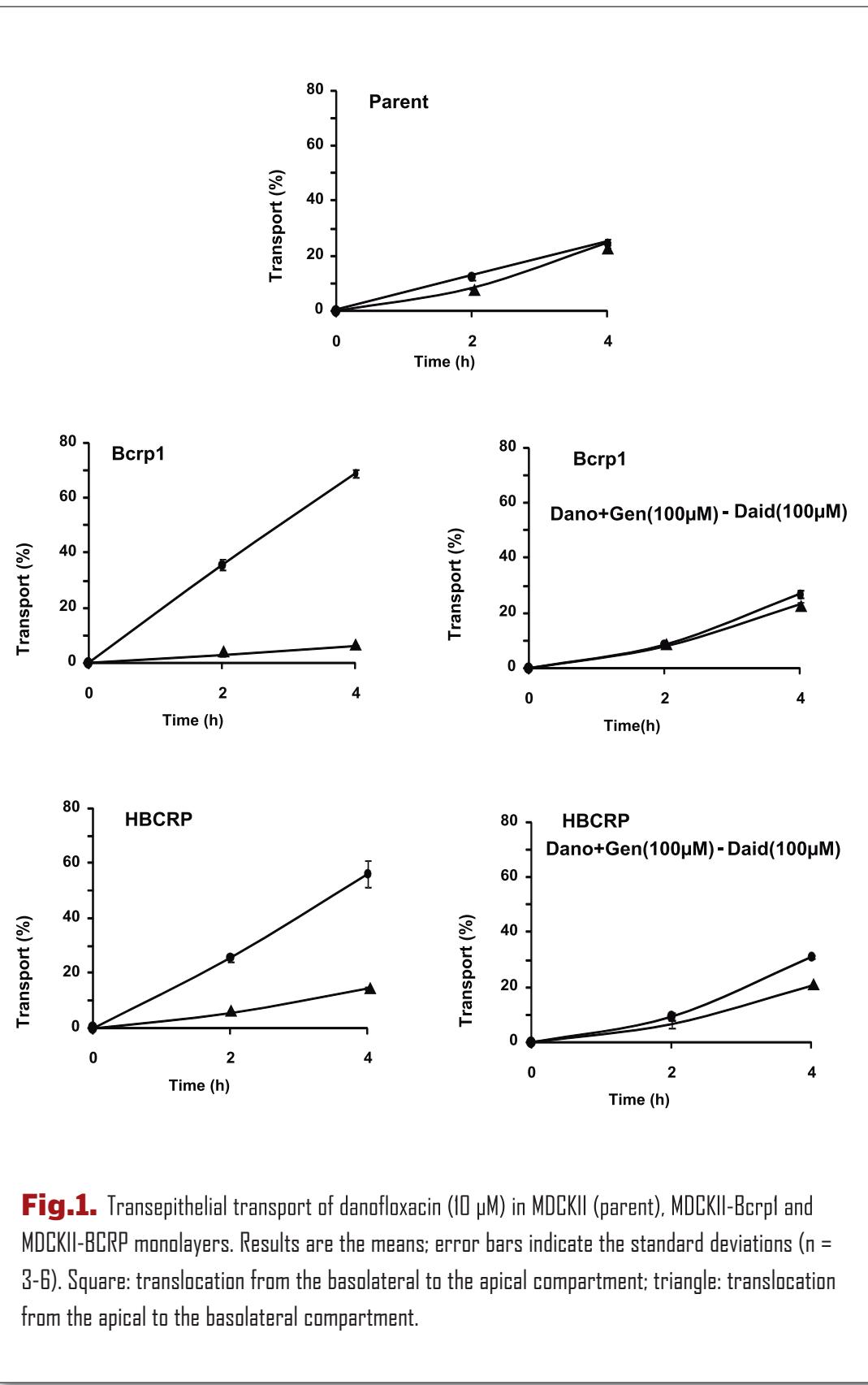


Fig.1. Transepithelial transport of danofloxacin ($10 \mu\text{M}$) in MDCKII (parent), MDCKII-Bcrp1 and MDCKII-HBCRP monolayers. Results are the means; error bars indicate the standard deviations ($n = 3-6$). Square: translocation from the basolateral to the apical compartment; triangle: translocation from the apical to the basolateral compartment.

Table 2. Concentration of Danofloxacin permeated towards Apical (BL-AP transport) or Basal (AP-BL transport) compartments in cell cultures in absence and presence of inhibitors.

		Sampling time (h)	Concentration BL-AP (µg/mL)	Concentration AP-BL (µg/mL)	Ratio BL-AP/AP-BL
Dano	MDCK-II	2 h	0.61±0.04	0.70±0.03	
		4 h	1.21±0.08	1.21±0.03	1.00±0.04
	m-Bcrp1	2 h	1.76±0.10	0.23±0.01	
		4 h	3.40±0.07	0.29±0.01	11.65±0.95
	H-BCRP	2 h	1.27±0.06	0.48±0.06	
		4 h	2.55±0.4	0.72±0.03	3.56±0.44
+					
Dano + Ko143 (1µM)	MDCK-II	2 h	0.54±0.01	0.53±0.02	
		4 h	1.04±0.03	0.98±0.10	1.07±0.12
	m-Bcrp1	2 h	0.52±0.20	0.43±0.08	
		4 h	1.16±0.4	1.17±0.11	0.94±0.13*
	H-BCRP	2 h	0.50±0.10	0.51±0.13	
		4 h	1.02±0.14	0.97±0.15	1.05±0.08*
+					
Dano + Gen-Daid (100µM+ 100µM)	MDCK-II	2 h	0.77±0.04	0.56±0.03	
		4 h	1.36±0.08	0.99±0.04	1.37±0.04
	m-Bcrp1	2 h	0.72±0.02	0.67±0.01	
		4 h	1.32±0.07	1.13±0.03	1.16±0.08*
	H-BCRP	2 h	0.76±0.13	0.55±0.11	
		4 h	1.53±0.04	0.99±0.01	1.53±0.04*

*Significantly decreased as compared to the counterparts of danofloxacin (Dano) group ($P \leq 0.05$).
Results are expressed as means ± SD ($n = 3$).

DISCUSSION

ABC transporter family is known to be responsible for transporting drugs that are commonly used in veterinary patients such as fluoroquinolone antibacterial drugs, the anticancer drug mitoxantrone, tyrosine kinase inhibitors, and some antihelminthic benzimidazoles (Mealey, 2012). Different research areas focus on BCRP in terms of pharmacological treatments, moreover BCRP can significantly affect drug disposition in the clinical setting . Indeed, bovine BCRP was involved in a polymorphism associated with higher fat and protein percentages, lower milk yield and higher *in vitro* antibiotic transport (Real *et al.*, 2011b).

Polyphenols, which are present in vegetables and other plants, interact directly with BCRP . These compounds (tannins, gossypol, fagopyrine, soy) are present in moderate amounts in forages for ruminants.

Both genistein and daidzein, the main isoflavones in soy, act as *in vitro* and *in vivo* BCRP inhibitors , although *in vivo* genistein and daidzein are extensively metabolized to glucuronide and sulfate forms which also interact with BCRP. Considerable conjugation activity of isoflavones has been shown in ewes, the mono-glucuronides

Fig.2. Plasma concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$) vs. time (h) curves for danofloxacin obtained following the IM administration (1.25 mg/kg) in ewes in the three experimental groups. Each point represents means \pm SD ($n = 6$).

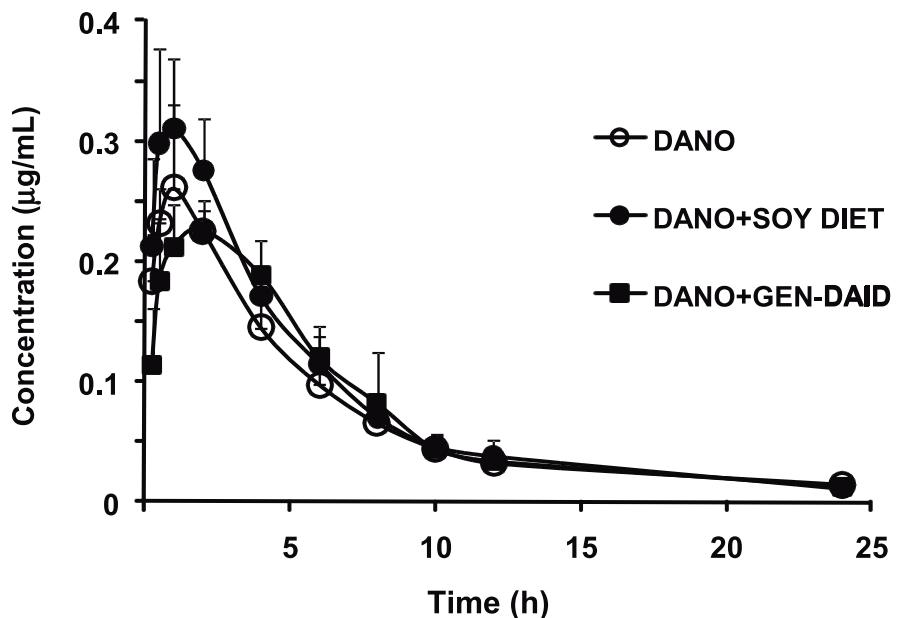
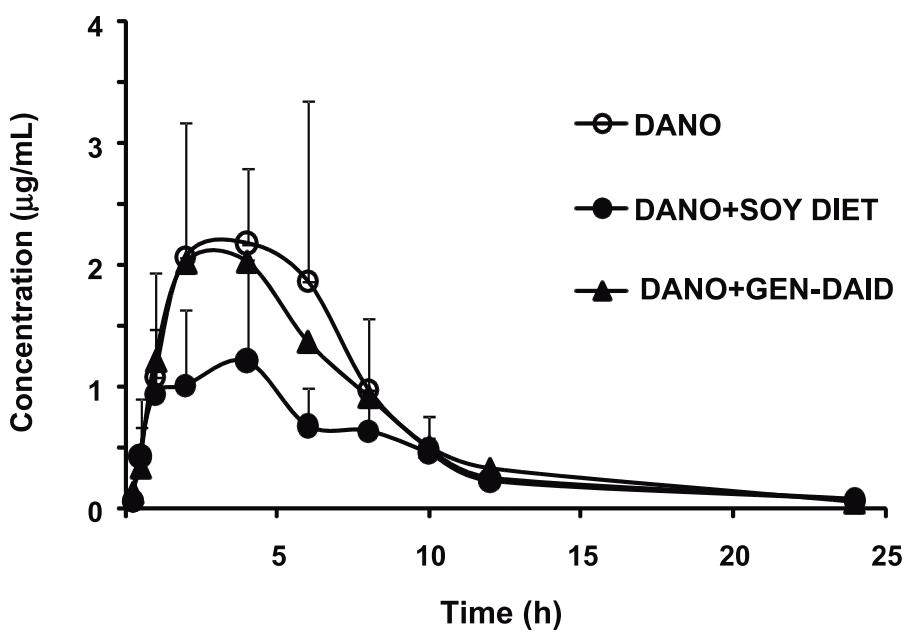


Fig.3. Milk concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$) vs. time (h) curves for danofloxacin obtained following the IM administration (1.25 mg/kg) in ewes in the three experimental groups. Each point represents means \pm SD ($n = 6$).



ARTÍCULO 4

Table 3. Pharmacokinetic parameters obtained in plasma and milk after IM administration of danofloxacin in the three experimental groups.

PLASMA

	DANO	DANO+SOY DIET	DANO+GEN-DAID
AUC(0-24h) ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	1.70 \pm 0.18	1.91 \pm 0.25	1.78 \pm 0.16
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.30 \pm 0.08	0.31 \pm 0.07	0.22 \pm 0.04
Tmax (h)	1.41 \pm 0.29	1.41 \pm 0.66	1.83 \pm 1.17
MRT (h)	9.55 \pm 2.32	7.36 \pm 0.50	9.08 \pm 2.11

MILK

AUC(0-24h) ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	16.58 \pm 4.44	9.3 \pm 4.6*	15.72 \pm 2.97
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.72 \pm 0.95	1.16 \pm 0.82*	2.18 \pm 0.49
Tmax (h)	4.5 \pm 3	2.6 \pm 1.34	3.2 \pm 1.09
MRT (h)	7.45 \pm 2.78	6.73 \pm 0.61	6.24 \pm 0.80
AUC (0-24h) (milk/plasma)	9.58 \pm 2.17	4.90 \pm 2.65*	9.20 \pm 2.06
Dose secreted (%) in milk (24 h) a	1.56 \pm 0.42	0.98 \pm 0.29†	1.23 \pm 0.18

Results are expressed as means \pm SD (n = 6).

*Difference from Dano group and Dano + GEN-DAID P \leq 0.05.

†Difference from Dano group P \leq 0.05.

a Individual milk yield, approx. 3 L.

of daidzein and equol being the major forms present in plasma as well as in tissues . BCRP inhibitors co-administered with drugs that are substrates of the transporter may alter the in vivo disposition (absorption, distribution, excretion and presence in milk) of drugs. As intensification of milk production in small ruminants has increased in recent years, the use of antimicrobial substances, such as danofloxacin, in dairy ewes has become common practice in veterinary medicine to treat mastitis and other diseases . With the dosing rates recommended (1.25 and 6 mg/kg), danofloxacin achieved

concentrations above the MICs for important pathogenic organisms in different body locations (plasma, tissue cage exudate, bronchial secretion) . With regard to mastitis, danofloxacin may be effective when taking into account a Cmax/MIC index of 8 against mastitis isolates with MIC < 0.12 µg/mL in the case of sheep . The Cmax/MIC index of 9.7 in the Dano + Soy diet group ensures the effectiveness of this procedure in mastitis treatment. The recommended dose of 6 mg/kg (reached plasma Cmax/MIC values for sheep >10 preventing the emergence of resistance, which supports the potential use of danofloxacin at this dosage in the treatment of mastitis and other infections in milk cows, although with this dose the authors recommended about 3 days of withdrawal. Our findings highlight the feasibility of diminishing levels in milk and concomitantly decreasing withdrawal time.

Our results also confirm the importance of the in vitro experiments to predict in vivo results. We obtained in previous experiments in cell cultures overexpressing BCRP with enrofloxacin P_{app} coefficients of 4.1 ± 1.1 (m-Bcrp1), 1.5 ± 0.3 (H-BCRP) and genistein and daidzein inhibiting this in vitro transport. Subsequent pharmacokinetic studies showed a significant reduction of enrofloxacin (2.5 mg/kg, i.v.) in ovine milk when the drug was coadministered with genistein (0.8 mg/kg, IM) but without a significant modification of AUC milk/plasma. These results show highly efficient transport of danofloxacin by murine Bcrp1 and moderate transport by human BCRP, and faithfully reproduce previously obtained findings (Real *et al.*, (2011a); furthermore, transport was drastically decreased by genistein-daidzein in both transduced cell lines. The in vivo results supported by the pharmacokinetic parameter AUC(0-24h) milk/plasma obtained in the presence of soy decreased significantly from 9.58 ± 2.17 to 4.90 ± 2.65 and ewes fed with soy have a significant

ARTÍCULO 4

reduction in the milk excretion of the antimicrobial. In the same way ivermectin also efficiently blocked this in vitro transport and the in vivo interaction of ivermectin with danofloxacin transport is shown by the significant reduction in the secretion of this antibiotic into milk in sheep .

The presence of isoflavones did not affect danofloxacin plasma levels in sheep (Fig. 2). The potential in vivo involvement of multiple transporters known to interact with danofloxacin could hide an effect of BCRP on danofloxacin systemic disposition. The same finding was reported after ivermectin coadministration with danofloxacin . However, Ballent *et al.* (2011) show a significantly increased systemic exposure of danofloxacin after ivermectin coadministration. Differences in the outcome of these experiments could be due to differences in dosage rate, gender or physiological status, or even the involvement of multiple transporters in this interaction, as these authors suggested.

The exogenous administration of genistein + daidzein did not modify the pattern of milk secretion of the antimicrobial and our results clearly show that prolonged intake of soy produces better results than acute isoflavone administration. In this regard show that a maintained plasmatic concentration of genistein and daidzein on 1.5 nM in mice was able to interact in vivo with Bcrp1 in brain, testis, epididymus and fetus. On the other hand, BCRP is responsible for the apical efflux of some glucuronides and sulfates, the main plasma metabolites of both isoflavones. Conjugated metabolites (glucuronides) are present in breast tissue after isoflavone supplementation for 5 days in women, reaching mammary gland epithelial cells levels of up to 20–25 pmol/g total isoflavone aglycones and 900–1150 pmol/g total isoflavone glucuronides found levels of 10 nmol/g total isoflavones in mammary glands in ewes. After a

prolonged intake of isoflavones, higher levels of these compounds can accumulate in the mammary gland, interacting with BCRP present in the apical membrane of the alveolar cells.

Conclusions

The main interest of our results lies in the information they provide on factors influencing the appearance of drug residues and the inherent mechanisms to reduce withdrawal periods. The main finding reported here demonstrates that diet enriched with soy modifies the *in vivo* milk secretion of danofloxacin, substrate for BCRP, in sheep, reducing the percentage of the antimicrobial in the milk. This is important since withdrawal periods can be shortened as a consequence of forage interference with the efflux transporters.

Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

The authors thank Dr. A.H. Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) who provided MDCK cells and their transduced cell lines, and Bcrp1 knockout mice. We are grateful to Prof. James McCue for assistance in language editing. This study was partially supported by the Ministry of Science and Technology (Spain) with the research projects AGL2006-13186 and AGL2009-11730 (to AIA and GM), predoctoral fellowship (FPU) (to BB), Junta de Castilla y León (Research group of Excellence grant GR132 to JGP) and Gobierno Vasco (predoctoral fellowship to JAO).

DISCUSIÓN GLOBAL

1) RESIDUOS DE FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS EN LECHE. INTERACCIÓN DE MOXIDECTINA CON ABCG2/BCRP

Los resultados obtenidos demuestran que la moxidectina es transportada por ABCG2/BCRP. Nuestros estudios realizados en oocitos de *Xenopus laevis* y en ratones knockout para la proteína ABCG2/BCRP han demostrado que la moxidectina, muy utilizada en rumiantes, y que aparece como residuo en leche, es sustrato de dicho transportador. Según la EMEA (MRL/906/04-final), el límite máximo de residuos en leche de la moxidectina es de 40 µg/kg. Con anterioridad, ya se había demostrado que algunos fármacos ampliamente usados en la terapia antiparasitaria son transportados por los transportadores ABC, así, ivermectina y selamectina son transportados por glicoproteína-P (Laffont *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2005) y albendazol sulfóxido y oxfendazol por ABCG2/BCRP (Muenster *et al.*, 2008; Merino *et al.*, 2005).

Los oocitos de *Xenopus laevis* sobreexpresando ABCG2/BCRP son un modelo de estudio que sirve para detectar sustratos del transportador. En nuestro estudio la mitoxantrona ha sido utilizada para comprobar la funcionalidad de la expresión y un derivado de la acridona como nuevo inhibidor de ABCG2/BCRP (Figura 2. Artículo 1). Más recientemente, Blazquez *et al.*, (2012), estudiaron el transporte de ácidos biliares conjugados y no conjugados en oocitos de *Xenopus laevis* sobreexpresando ABCG2/

DISCUSIÓN GLOBAL

BCRP, lo que apoya la vigencia de este modelo celular para estudiar los sustratos del transportador.

El sistema de la expresión de oocitos de *Xenopus laevis* previamente ha sido utilizado para investigar la especificidad de sustratos de ABCG2/BCRP humana en ausencia de proteínas heterólogas (Nakanishi *et al.*, 2003). Otros transportadores ABC como MDR1 humana, Bsep de rata y MRP4 humana, han sido expresados funcionalmente en oocitos de *Xenopus laevis*. Kim *et al.*, (2011) empleando oocitos de *Xenophus laevis* sobreexpresando distintos polimorfismos de MDR1, demostraron que la digoxina y la daunorrubicina, procedentes de extractos de plantas, interaccionaban de distinta manera con el transportador dependiendo del polimorfismo presente. Lee *et al.*, (2012) clonaron ABCG2/BCRP a partir de células A549 de adenocarcinoma pulmonar humano y lo expresaron en oocitos de *Xenopus laevis* obteniendo así un modelo para la terapia de cáncer pulmonar.

Los oocitos que sobreexpresan ABCG2/BCRP reducen la concentración de moxidectina en comparación a los oocitos wild-type, lo que pone de manifiesto que la moxidectina es sustrato de ABCG2/BCRP (Figura 2. Artículo 1).

Otro modelo celular utilizado para dilucidar el transporte de moxidectina por ABCG2/BCRP son los cultivos de MDCK-II transducidos con ABCG2/BCRP humana (H-BCRP) y ABCG2/Bcrp1 de ratón (m-Bcrp1). Los resultados de estos experimentos muestran que la moxidectina es escasamente transportada (3% de transporte) en monocapa de células MDCKII, tanto parentales como transducidas (m-Bcrp1 y H-BCRP), sin que se observaran diferencias en el transporte vectorial de la moxidectina en las células que sobre-expresan el transportador (Figura 1. Artículo 1). Los resultados de nuestros estudios coinciden con los obtenidos por Griffin *et al.*, (2005), en monocapa

de células Caco-2. Estos autores observaron que la traslocación de la moxidectina a través de estos cultivos celulares fue de aproximadamente 1%, descartándose en este caso la implicación de la glicoproteína P en el transporte de la moxidectina. Estudios de transporte realizados por Brayden *et al.*, (2008), en este mismo modelo celular expresando otros transportadores MDCKII-MDR1, MDCKII-MRP1 y MDCKII-MRP2, mostraron que la ivermectina y la selamectina eran eficientemente transportadas, pero no así la moxidectina, con resultados similares a los obtenidos por nosotros, justificando así mismo la utilidad del modelo en este caso.

Wassermann *et al.*, (2013) utilizaron clones de ABCG2/BCRP en células MDCK-II de las variantes ovina, caprina y bovina, realizando experimentos de acumulación en dichas células, con el objetivo de demostrar la inhibición de ABCG2/BCRP por la moxidectina. Los clones fueron tratados con concentraciones terapéuticas de moxidectina durante dos horas, y posteriormente se incubaron con Hoechst H33342 midiéndose la mayor o menor acumulación del sustrato en las distintas condiciones experimentales. Los resultados demuestran que sólo en la variante bovina y caprina se obtuvieron diferencias significativas en la capacidad inhibitoria de la moxidectina, no así en la variante ovina, lo que nos indica la importante variación interespecífica que existe en la interacción de fármacos mediada por ABCG2/BCRP.

Otro modelo ampliamente utilizado que nos permite estudiar la interacción de moxidectina con ABCG2/BCRP son los ratones knockout (Merino *et al.*, 2005; Van Herwaarden *et al.*, 2006). En nuestro estudio se emplearon ratones de la cepa consanguínea FVB de genotipo silvestre (wildtype) y también modificados genéticamente, concretamente ratones knockout para el transportador Bcrp1 (Bcrp1^{-/-}).

Los experimentos llevados a cabo en estos animales han revelado importantes con-

DISCUSIÓN GLOBAL

tribuciones en el estudio de transporte de fármacos en la barrera hematoencefálica, en la barrera materno-fetal así como en la glándula mamaria, demostrando el paso de fármacos a leche, ya que la expresión del transportador se induce durante la lactación (Jonker *et al.*, 2005). El modelo ha servido para demostrar múltiples e importantes funciones fisiológicas de ABCG2/BCRP, como son la secreción de porfirinas y sus conjugados de las células hematopoyéticas e hígado, así como la secreción de vitamina B12, biotina y vitamina K en la glándula mamaria (Vlaming *et al.*, 2009).

En nuestros estudios en ratones hemos utilizado la vía intravenosa de administración debido a su mayor distribución plasmática para la obtención de concentraciones detectables en leche. Así, se obtuvieron ratios leche/plasma de moxidectina dos veces mayores en ratones wild-type que en knockout a los 30 minutos ($1,03 \pm 0,3$ vs. $0,6 \pm 0,3$) y a los 60 minutos del experimento ($2 \pm 0,3$ vs. $1,3 \pm 0,5$), demostrando el paso a leche mediado por ABCG2/BCRP. Aunque en general, ABCG2/BCRP afecta a la disposición plasmática de sus sustratos (Vlaming *et al.*, 2009), algunos autores han detectado que ABCG2/BCRP puede tener un menor efecto sistémico y por lo tanto la no existencia de diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de ambas cepas de ratones (Zhang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008), al igual que en nuestro experimento, en el que no obtuvimos diferencias significativas entre ambas cepas (Figura 3. Artículo 1). Estudios de transporte de fármacos que son sustrato *in vitro* de ABCG2/BCRP realizados por nuestro grupo de investigación (Real *et al.*, 2011), en ratones knockout y en ovejas de la raza Assaf, también mostraron que las concentraciones plasmáticas no se veían afectadas por el transportador en estas especies, aunque sí había diferencias en su paso a leche.

En cuanto a la implicación de ABCG2/BCRP en el transporte de moxidectina en el resto de órganos estudiados, obtuvimos mayores cantidades de moxidectina tras su

administración subcutánea en machos de ratones wildtype con respecto a los ratones knockout, en contenido intestinal (640 ± 63 vs. 504 ± 55 ng/g), bilis (754 ± 133 vs. 518 ± 119 ng/ml) e intestino proximal, medio y distal (Figura 4. Artículo 1). Estos datos indican que la acumulación de moxidectina en los órganos estudiados depende de ABCG2/BCRP. La importancia del paso a bilis y su presencia en el contenido intestinal y en el intestino pueden indicar recirculación enterohepática (Hennessy *et al.*, 2002). Las diferencias obtenidas en los niveles tisulares en el caso de las hembras no fueron significativas, pudiendo ser debidas a la mayor expresión hepática de ABCG2/BCRP en machos, lo que condicionaría el transporte de sustratos por dicha proteína (Merino *et al.*, 2005).

2) MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE FÁRMACOS A LECHE POR ISOFLAVONAS

Como se ha descrito anteriormente, existen multitud de estudios que han demostrado *in vitro* la interacción de los flavonoides con los transportadores ABC, especialmente con la glicoproteína P y con ABCG2/BCRP (Alvarez *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2013). Las consecuencias de la interacción flavonoide-sustrato han sido descritas en modelos celulares, pero sin embargo, las interacciones farmacocinéticas de los flavonoides con sustratos de ABC *in vivo* no han sido todavía suficientemente demostradas. En estudios realizados por Zhang *et al.*, (2004), observaron la inhibición por parte de los flavonoides crisina y benzoflavona del transporte del topotecan en células MCF-7 que sobre-expresaban ABCG2/BCRP, sin embargo, esta inhibición no se producía al extrapolarla a estudios *in vivo* con ratas y ratones. Los autores señalan la necesidad de sustratos más específicos de los transportadores ABC para dilucidar esa interacción (Morris *et al.*, 2006).

DISCUSIÓN GLOBAL

En nuestros estudios para verificar el efecto inhibitorio de las isoflavonas de la soja, genisteína y daidzeína, hemos empleado como sustratos: la moxidectina debido a su prolongado tiempo de espera, la nitrofurantoína ya que es un sustrato tipo de ABCG2/BCRP, y la danofloxacina, un antibiótico fluoroquinolónico muy empleado en el tratamiento de mastitis en rumiantes.

2.1. Estudios en cultivos celulares

La elección de la nitrofurantoína como sustrato tipo se basa en los estudios de Merino *et al.*, (2005), que demostraron que este fármaco es un excelente sustrato de ABCG2 al observar en cultivos celulares de MDCK-II sobre-expresando las variantes humana (H-BCRP) y murina (m-Bcrp1), ratios de transporte BA/AB de 3,78 y 5,71 respectivamente. Esta diferencia puede deberse a que la variante de ratón comparte únicamente el 81% de la identidad de aminoácidos con la variante humana (Allen *et al.*, 1999) o a una diferente afinidad o expresión del transportador dependiendo de la especie. Diferentes autores emplean la nitrofurantoína como sustrato tipo de ABCG2/BCRP en otros tipos celulares, como en las células Caco-2 procedentes de epitelio intestinal humano (Wright *et al.*, 2011) o en las células JAr procedentes de carcinoma de placenta (Feinshtein *et al.*, 2010).

En nuestros estudios se demuestra la importante inhibición ejercida por genisteína y daidzeína en el transporte de nitrofurantoína tanto en MDCKII-HBCRP como en MDCKII-mBcrp1 (Figura 1. Artículo 2).

En el caso de la danofloxacina, ensayos de nuestro grupo de investigación con células MDCKII polarizadas han reflejado que la danofloxacina es transportada eficientemente por m-Bcrp1 y por H-BCRP (Real *et al.*, 2011), así como por los polimorfismos

de la variante bovina, S581 y Y581, presentando mayor actividad la S581 tanto *in vitro* como *in vivo* (Otero *et al.*, 2013). González-Lobato (Tesis Doctoral, 2012) ha estudiado el transporte de danofloxacina en células MDCKII transducidas con ABCG2 ovino, obteniendo mayores ratios de transporte con respecto a cualquiera de las dos variantes bovinas, poniendo de manifiesto, la importancia del transporte de fármacos mediado por ABCG2/BCRP en rumiantes. Real *et al.*, (2011), demostraron así mismo, el efecto inhibitorio casi completo por parte de la ivermectina sobre el transporte de danofloxacina mediado por ABCG2/BCRP.

En el desarrollo de nuestra tesis doctoral demostramos que el empleo de las isoflavonas genisteína y daidzeína inhibe prácticamente la totalidad del transporte de dicho fármaco en células MDCKII transducidas con m-Bcrp1 y en células MDCKII transducidas con H-BCRP (Figura 1. Artículo 4).

Estudios recientes realizados por Tan *et al.*, (2013), muestran la inhibición del transporte de metotrexato, sustrato de ABCG2/BCRP, en experimentos de acumulación en vesículas de membrana Sf9/WT y Sf9/ABCG2. Esta inhibición está mediada por los flavonoides laricitrina, pinocembrina, quercitrina y tricetina entre otros, añadiéndose nuevos flavonoides, capaces de inhibir sustratos de ABCG2/BCRP *in vitro*.

2.2. Estudios en ratones wildtype y knockout

Los estudios realizados *in vivo* con ratones wildtype y knockout, corroboraron los resultados *in vitro*, mostrando el importante papel de las isoflavonas en la excreción de fármacos sustratos de ABCG2/BCRP hacia la leche, ya que ambos compuestos, genisteína y daidzeína, inhibieron significativamente la excreción de nitrofurantoína a la leche en los ratones wildtype con respecto al grupo control ($55,3 \pm 21,1 \mu\text{g/ml}$ vs. $93,5$

DISCUSIÓN GLOBAL

$\pm 19,8\mu\text{g/ml}$). En los ratones knockout (*Bcrp1-/-*) no hay ninguna variación en la secreción debida a la presencia de isoflavonas. Ambos experimentos, en ratones wildtype y en ratones knockout, apoyan nuestros estudios preliminares *in vivo* con ovejas en lactación, en las que se obtuvieron diferencias en la secreción láctea de enrofloxacina cuando se coadministraban inhibidores de ABCG2/BCRP como ABZSO y genisteína, aunque sin diferencias en el ratio AUCleche/AUCplasma (Pulido *et al.*, 2006).

El transporte de nitrofurantoína en el hígado y en el intestino se vio modificado tras la coadministración con isoflavonas. Estas inhiben el transporte del fármaco mediado por el transportador modificando su absorción intestinal, su paso a bilis y su circulación enterohepática, y como consecuencia, se alcanzan niveles plasmáticos de nitrofurantoína más elevados (Merino *et al.*, 2005). Kawase *et al.*, (2009), demostraron que tras la administración de crisina en ratas a las que se les había administrado previamente nitrofurantoína por vía oral, se observaron mayores niveles plasmáticos de nitrofurantoína. En cambio, tras la administración intravenosa de nitrofurantoína, los niveles plasmáticos de la misma no se vieron afectados, sugiriendo que la crisina afecta a la farmacocinética de la nitrofurantoína a nivel intestinal.

La expresión de ABCG2/BCRP en hembras es mayor en la glándula mamaria en lactación (Pulido *et al.*, 2006); sin embargo, la expresión de ABCG2/BCRP en hígado, riñón e intestino no se ve modificada (Merino *et al.*, 2005). Nuestros resultados en hembras muestran una inhibición significativa del paso de nitrofurantoína a bilis en presencia de genisteína y daidzeína ($3,7 \pm 3,3 \mu\text{g/ml}$ vs. $8,8 \pm 3,4 \mu\text{g/ml}$), esto demuestra la magnitud de la inhibición y la especificidad de acción de ABCG2/BCRP, al no observarse cambios significativos en los ratones knockout.

La ausencia de variaciones en plasma, bilis y niveles en leche en los ratones knoc-

kout en presencia de estos flavonoides, apoya la participación de ABCG2/BCRP en esta interacción flavonoide-sustrato (Figuras 2 y 3. Artículo 2).

Ambas isoflavonas, genisteína y daidzeína, actúan como inhibidores de ABCG2/BCRP *in vitro* e *in vivo* (Enokizono *et al.*, 2007), con la diferencia de que *in vivo* son metabolizadas a glucurónidos y sulfatos (Zhang *et al.*, 2007). De hecho, experimentos realizados en ratas han demostrado la conjugación de la genisteína al encontrar niveles plasmáticos muy bajos de agliconas (Zhou *et al.*, 2008). Presumiblemente, parte de la interacción flavonoides-ABCG2/BCRP podría ser llevada a cabo por las formas conjugadas (Zhang *et al.*, 2007). Estudios realizados por Alvarez *et al.*, (2011), demuestran que tras la coadministración de ambas isoflavonas en ratones, el perfil plasmático de las agliconas se reduce prácticamente a la mitad, predominando en plasma la conversión a sulfato de ambos compuestos, sugiriendo que podría ser esta forma conjugada la que mayoritariamente interactúa con ABCG2/BCRP. En relación a esta teoría, Tamaki *et al.*, (2010), muestran que el efecto inhibitorio de la daidzeína decrece tras la glucuronidación del compuesto pero no se ve afectado por la sulfación.

2.3. Experimentos con ovejas Assaf

2.3.1. Niveles de moxidectina en leche. Influencia de la coadministración con isoflavonas

Se ha descrito como la moxidectina interacciona con ABCG2/BCRP en oocitos de *Xenopus laevis* y en ratones wildtype y knockout para el transportador, por lo que en el último paso planteamos la posibilidad de la modulación de su secreción a leche por las isoflavonas en ovejas de la raza Assaf.

DISCUSIÓN GLOBAL

La expresión de ABCG2/BCRP en glándula mamaria en vacas y en ovejas en lactación ha sido demostrada por inmunohistoquímica (Pulido-Duarte, 2006; Tesis Doctoral) y por estudios de western-blot (Jonker *et al.*, 2005). Recientemente otros autores han corroborado estos estudios en tejido mamario de vacas y ovejas (Lindner *et al.*, 2013), y en cultivos de células epiteliales primarias mamarias de vaca (Halwachs *et al.*, 2013). Todos los trabajos muestran una elevada expresión de ABCG2/BCRP en estos animales en lactación. Por otra parte, Urpi-Sarda *et al.*, (2008), encontraron niveles de 10 nmol/g de isoflavonas en las glándulas mamarias de ovejas a las que se les había administrado una dieta rica en isoflavonas; estos hallazgos apoyan la existencia de interacciones entre las isoflavonas y los fármacos, sustratos de ABCG2/BCRP, influyendo en su secreción láctea.

Dado que la normativa dictada por la EMEA exige la espera de un tiempo mínimo que garantice la presencia de los niveles permitidos, en el caso de la moxidectina 40 μ g/ml, este tiempo de espera se asocia con pérdidas económicas importantes para el sector ganadero, poniendo de manifiesto la importancia de acortar este tiempo de espera en el caso de la moxidectina.

La importante presencia de lactonas macrocíclicas en distintas especies de rumiantes, ha sido demostrada por Carceles *et al.*, (2001) en leche de cabras, estudiando la cinética de aparición la moxidectina y doramectina encontraron que la fracción total de la dosis de moxidectina recuperada en la leche fue 7,7 veces mayor que la de la doramectina, mostrando la importancia de la especificidad de sustrato.

La moxidectina también es excretada en leche de camellos; así existen diferencias entre los perfiles plasmáticos y de leche de la moxidectina, con valores de Cmax y de AUC tres a cuatro veces mayores en leche que en el plasma. Los ratios leche/plasma

en esta especie fueron casi cuatro veces mayores en el caso de la moxidectina que en el caso de la ivermectina (4,01 vs. 1,26) (Oukessou *et al.*, 1999). Estos mismos hallazgos se repiten en ovejas, así Imperiale *et al.*, (2004) estudiaron en ovejas que ambos fármacos se distribuyen ampliamente desde la sangre hacia la leche, en el caso de la moxidectina, con un ratio leche/plasma de 18,5; mientras que para la ivermectina el ratio fue de 2,5.

En estudios realizados por Lespine *et al.*, (2004), en corderos a los que se les coadministró quercitina con moxidectina, pudieron observar como el AUC plasmático aumentaba tras la administración del flavonoide.

La quercitina es un flavonoide muy abundante de la familia de los flavonoles, inicialmente se mostró que puede actuar como inhibidor de glicoproteína P (Limtrakul *et al.*, 2005) y como sustrato de ABCG2/BCRP (Sesink *et al.*, 2005).

Pulido *et al.*, (2006, Tesis Doctoral), realizó experimentos en ovejas de raza Merina administrando quercitina como inhibidor del transporte de moxidectina mediado por ABCG2/BCRP en glándula mamaria, observando una inhibición significativa por parte de la quercitina obteniendo un AUC leche/plasma de $13,3 \pm 3,44$ menor significativamente con respecto al grupo control ($18,9 \pm 2,7$).

En nuestros experimentos realizados en ovejas de raza Assaf (Anexo I) los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas para el AUC entre los distintos grupos experimentales ni en plasma, ni en leche.

A pesar de no existir diferencias significativas en el valor de AUC total (desde 0 a 72 horas) en los distintos tratamientos, los flavonoides genisteína y daidzeína sí que modifican los niveles de moxidectina en leche de las Assaf en el intervalo de 24 a 72 h. Así al estudiar la fase final de la disposición la moxidectina en leche se obtuvieron

DISCUSIÓN GLOBAL

los valores de AUC en el intervalo de 24 a 72 horas significativamente menores en el caso de co-administración con genisteína y daidzeína (Figura 1. Anexo I).

Por último, destacar que los niveles de residuos de moxidectina disminuyeron desde 1490 µg a 1269 y a 812 µg en la coadministración del fármaco con daidzeína y genisteína respectivamente en el caso de las ovejas Assaf (Tabla 2. Anexo I).

2.3.2. Niveles de nitrofurantoína en leche. Influencia de las dietas sin isoflavonas

Respecto al estudio de la influencia de las isoflavonas en la secreción láctea de nitrofurantoína en ovejas productoras de leche (Tabla 2-Artículo 3), se presentan los parámetros farmacocinéticos del fármaco, obtenidos en las muestras de sangre y leche recogidas durante 72 h en los diferentes grupos experimentales de ovejas Assaf. Los grupos 1 y 2 están alimentados con una dieta con presencia de soja (7%) (Tabla 1. Artículo 3), y al grupo 2 se le administra una dosis adicional de isoflavonas de forma exógena, los grupos 3 y 4 fueron alimentados durante 15 días con una dieta que excluía las isoflavonas, y el grupo 4 previo a la administración de la nitrofurantoína recibió genisteína y daidzeína. Los resultados mostraron una disminución significativa del valor de AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{d}/\text{ml}$) en la leche de todos los grupos respecto al grupo 3 ($25,27 \pm 11,4$ -grupo 1, $13,82 \pm 7,0$ -grupo 2 y $26,84 \pm 10,91$ -grupo 4 vs. $83,55 \pm 68,42$ -grupo 3, $P \leq 0,05$). Los valores de Cmax también fueron significativamente menores en los grupos alimentados con dieta con contenidos en soja (1 y 2).

Cuando se midieron los niveles plasmáticos de genisteína y daidzeína tanto en su forma aglicona como en su forma conjugada (Tabla 2 y 5. Anexo II) se observó con la presencia de las isoflavonas en los grupos experimentales unos valores de AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{d}/\text{ml}$) de genisteína y de daidzeína total de $0,19 \pm 0,04$ y $0,64 \pm 0,18$ grupo 1; $2,9 \pm 1,6$ y $7,3 \pm 2,9$

grupo 2 y $5,5 \pm 2,5$ y $10,8 \pm 2,3$ grupo 4, existiendo una relación inversa entre los niveles de nitrofurantoína en leche y los niveles de isoflavonas en el plasma (Figura 1. Anexo II).

En los grupos a los que se les administraron isoflavonas exógenas, el AUC de daidzeína total comparado con el AUC de genisteína total es casi el doble tanto en ovejas que recibieron dieta estándar ($7,30 \pm 2,93$ $\mu\text{h/ml}$ vs. $2,44 \pm 1,16$ $\mu\text{h/ml}$) como en ovejas que recibieron la dieta modificada ($10,82 \pm 2,36$ $\mu\text{h/ml}$ vs. $5,53 \pm 2,50$ $\mu\text{h/ml}$). Los resultados (Tablas 2-5. Anexo II) muestran mayores niveles de daidzeína en el plasma en los distintos grupos experimentales indicando una mayor biodisponibilidad de esta isoflavona como ha sido descrito por Piskula (2000). En estudios realizados por Urpi-Sarda *et al.*, (2008), en los que habían administrado a un grupo de ovejas una dieta rica en flavonoides que contenía biochanina A, cuyo metabolito es la genisteína, y daidzeína, solo se pudieron identificar niveles de daidzeína en plasma, la mayor parte de ella conjugada. Maubach *et al.*, (2004), también mostraron que tras la ingestión de suplementos de la soja en humano conteniendo un 66% de genisteína y un 24% de daidzeína, la daidzeína predominó en la glándula mamaria y en el plasma como ocurre en nuestros resultados. Por otra parte, Bowey *et al.*, (2003) vieron que la degradación por los microorganismos del rumen de la genisteína era mayor que la de la daidzeína, comprobando también la baja disponibilidad sistémica de la genisteína.

La función de ABCG2/BCRP de eliminación de fármacos y en su excreción en la leche ha sido demostrada específicamente para la nitrofurantoína (Merino *et al.*, 2005). Genisteína y daidzeína actúan en experimentos *in vitro* e *in vivo* como inhibidores de ABCG2/BCRP (Katayama *et al.*, 2007, Enokizono *et al.*, 2007) aunque ambos compuestos son metabolizados a sus formas conjugadas (glucurónico y sulfato) (Zhang *et al.*, 2007).

DISCUSIÓN GLOBAL

El epitelio gastrointestinal de la oveja es muy activo en procesos de conjugación de isoflavonas, (Lundh, 1995), por lo que es previsible que parte de la interacción de las isoflavonas con ABCG2/BCRP ocurra a través de las formas conjugadas.

Nuestra dieta modificada empleada en ovejas Assaf incluye maíz, cebada, colza y algodón, componentes que posiblemente inhibían el metabolismo de la nitrofurantoína y como consecuencia observamos altos niveles plasmáticos en los grupos 3 y 4 (Tabla 2. Artículo 3). Por otra parte, la reducción de la nitrofurantoína por la flora intestinal contribuye a la eliminación del fármaco (Buzard *et al.*, 1961). El principal metabolito formado en la nitrorreducción se forma gracias a la acción de NADPH-citocromo reductasa (Boyd *et al.*, 1978). Esta enzima es inhibida en humanos por la ingestión de extractos de plantas (Liu *et al.*, 2006), lo que justifica la existencia de niveles plasmáticos mayores de nitrofurantoína.

2.3.3. Niveles de danofloxacina en leche. Dietas enriquecidas con soja.

Diversos estudios describen un rápido y extenso paso de las fluoroquinolonas desde la sangre a la leche (Chung *et al.*, 2002, Escudero *et al.* 2012). Con esta premisa y una vez demostrada la inhibición por parte de genisteína y daidzeína, del transporte de danofloxacina en cultivos celulares que sobreexpresaban ABCG2/BCRP, nos planteamos estudios sobre el efecto de una dieta continuada rica en isoflavonas en ovejas Assaf. Para ello, establecimos 3 grupos experimentales: en el grupo 1 incluimos ovejas alimentadas con un forraje estándar, en el grupo 2 ovejas alimentadas con un forraje enriquecido con isoflavonas 15 días previos al experimento, y en el grupo 3 ovejas alimentadas con un forraje estándar más una coadministración intragástrica de genisteína y daidzeína.

Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas en los niveles plasmáticos de danofloxacina entre los grupos experimentales (Tabla 3. Artículo 4). Real *et al.*, (2011), han obtenido resultados similares tras coadministrar ivermectina, atribuyéndose este efecto a la posible interacción de múltiples transportadores con el fármaco que enmascaran el efecto sistémico de ABCG2/BCRP (Schrickx *et al.*, 2007). Sin embargo, Ballent *et al.*, (2011), observaron un incremento de los niveles plasmáticos de danofloxacina tras la coadministración con ivermectina. Estas diferencias pueden ser debidas a la dosis, la vía de administración, el género o incluso el estado fisiológico de los animales, siendo necesarios más estudios para dilucidar la compleja interacción entre el transportador ABCG2/BCRP y sus sustratos *in vivo*.

En cuanto a la secreción de danofloxacina en leche se vio inhibida en un 44% en el grupo que había recibido una dieta rica en isoflavonas, siendo su AUC $9,3 \pm 4,6 \mu\cdot h/ml$ vs. $16,58 \pm 4,44 \mu\cdot h/ml$. Así mismo el AUC leche/plasma también se vió disminuído en un 50% en el grupo que había recibido la dieta rica en flavonoides ($4,90 \pm 2,65$ vs. $9,58 \pm 2,17$). La Cmáx de danofloxacina en leche fue únicamente de $1,16 \pm 0,82 \mu g/ml$, menor significativamente que la Cmáx del grupo control ($2,72 \pm 0,95 \mu g/ml$), demostrando la inhibición del transporte de danofloxacina mediada por ABCG2/BCRP tras la administración mantenida de isoflavonas en el organismo de los rumiantes.

En cambio, la administración intragástrica de genisteína y daidzeína no modificó el paso de danofloxacina a leche (Tabla 3. Artículo 4), mostrando claramente que la ingesta prolongada de isoflavonas tiene un mayor efecto inhibitorio que la administración aguda de genisteína y daidzeína. Enokizono *et al.*, (2007), mostraron que una concentración plasmática mantenida de genisteína y daidzeína a (1,5 nM) en ratones fue capaz de interactuar *in vivo* con m-Bcrp1 en el cerebro, testículos, epidídimo y en

DISCUSIÓN GLOBAL

el feto. Con relación a la administración exógena de flavonoides, estudios realizados por Pulido *et al.*, (2006), en los que utilizó la genisteína como inhibidor del transporte de enrofloxacina en ovejas Merinas, se observó que el AUC en leche en el grupo al que se le había administrado el flavonoide era significativamente menor que el AUC del grupo control ($6,40 \pm 2,15 \mu\cdot h/ml$ vs. $10,20 \pm 2,41 \mu\cdot h/ml$), lo que nos lleva a pensar que la inhibición ejercida por las isoflavonas en la excreción de fármacos mediada por ABCG2/BCRP podría ser sustrato dependiente (Tamaki *et al.*, 2010).

Real *et al.*, (2011), también estudiaron la interacción de la ivermectina, inhibidor de ABCG2/BCRP en ovejas tras la coadministración de danofloxacina. La ivermectina no produjo cambios en la concentración de danofloxacina en plasma, pero si una disminución del 40% en leche, mostrando que además de los flavonoides existen más compuestos que pueden inhibir el paso a leche de la danofloxacina mediado por ABCG2/BCRP.

Por otra parte, la intensificación de la producción de leche de los pequeños rumiantes ha aumentado en los últimos años y de forma concomitante el uso de sustancias antimicrobianas. La administración de danofloxacina en ovejas lecheras se ha convertido en una práctica común en la medicina veterinaria para el tratamiento de la mastitis y otras enfermedades. Con dosis recomendadas de 1,25-6 mg/kg, en nuestros experimentos empleamos una dosis de 1,25 mg/kg, la danofloxacina logra concentraciones superiores a las MIC (concentración mínima inhibitoria) de importantes organismos patógenos en diferente exudados del organismo (plasma, secreción bronquial...). Con respecto a la mastitis, la danofloxacina puede ser eficaz si se tiene en cuenta un índice de Cmax/MIC de 8, teniendo en cuenta el valor de $MIC < 0,12 \mu g/ml$ en ovejas (Escudero *et al.*, 2007). La Cmax/MIC de 9,7 en el grupo de la dieta enriquecida con

flavonoides garantiza la eficacia de este procedimiento en el tratamiento de la mastitis. Los valores plasmáticos de $C_{max}/MIC > 10$ en ovejas previenen la aparición de resistencias. Nuestros resultados ponen de relieve la posibilidad de disminuir los niveles de fármaco en la leche y como consecuencia disminuir el tiempo de espera de la leche en el ganado ovino.

CONCLUSIONES

Primera: La moxidectina es eficientemente transportada en los oocitos de *Xenopus laevis* que sobreexpresan ABCG2/BCRP; sin embargo, esta lactona macrocíclica tiene una baja permeabilidad en las células MDCKII que sobreexpresan ABCG2/BCRP, no obteniéndose resultados significativos en este modelo celular.

Segunda: Los estudios farmacocinéticos realizados comparando las concentraciones en plasma y en leche entre ratones wildtype y knockout para el transportador Bcrp1 mostraron que el transportador participa en la secreción hacia la leche de moxidectina, confirmando la interacción *in vitro*. Así mismo, la acumulación de moxidectina en contenido intestinal, bilis e intestino fue mayor en los ratones wildtype, aunque no se observó ningún efecto sobre los niveles plasmáticos del fármaco, ni en hembras lactantes, ni en machos, a las dosis y tiempos estudiados.

Tercera: El transporte de nitrofurantoína, sustrato tipo de la proteína, en células MDCKII que sobreexpresan ABCG2/BCRP se ve inhibido por las isoflavonas genisteína y daidzeína, tanto en la variante humana como en la variante de ratón.

CONCLUSIONES

Cuarta: Los estudios realizados *in vivo* en ratones wildtype a los que se les administraron genisteína y daidzeína muestran que hay una inhibición significativa en el transporte de nitrofurantoína mediado por ABCG2/BCRP en glándula mamaria e hígado, órganos diana del transportador. Los mismos ensayos llevados a cabo en ratones knockout confirman de forma específica la interacción mediada por ABCG2/BCRP.

Quinta: Los estudios farmacocinéticos de nitrofurantoína llevados cabo en ovejas Assaf con dietas variables de flavonoides, una de ellas en las que se excluían las isoflavonas, muestran que en este grupo, los niveles de nitrofurantoina excretados en leche fueron significativamente mayores. La presencia de las isoflavonas genisteína y daidzeína, tanto en la dieta estandar como administradas de forma puntual, inhibe la excreción a leche de nitrofurantoína mediada por ABCG2/BCRP *in vivo*.

Sexta: Los niveles plasmáticos de las isoflavonas medidos en los distintos grupos experimentales de ovejas Assaf, apoyan el papel inhibitorio de estas isoflavonas de la soja en el paso a leche de fármacos sustratos de ABCG2/BCRP, una mayor biodisponibilidad para la daidzeína y la presencia mayoritaria de las formas conjugadas de ambos compuestos en el plasma.

Séptima: El transporte de la fluoroquinolona danofloxacina en células MDCKII que sobreexpresan ABCG2/BCRP se ve inhibido significativamente por las isoflavonas genisteína y daidzeína, tanto en la variante humana como en la variante de ratón.

Octava: Los estudios farmacocinéticos de danofloxacina llevados cabo en ovejas Assaf con dietas variables de flavonoides, muestran que en el grupo al que se le administró la dieta rica en isoflavonas, la excreción a leche de danofloxacina, sustrato de ABCG2/BCRP, se ve inhibida en comparación al grupo que recibió una administración oral aguda de isoflavonas y que se alimentó con una dieta estándar, demostrando que la administración continuada de isoflavonas inhibe el paso de sustratos de ABCG2/BCRP a leche.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Adachi Y., Suzuki H., Schinkel A.H. & Sugiyama Y. (2005) Role of breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) in the extrusion of glucuronide and sulfate conjugates from enterocytes to intestinal lumen. *Mol Pharmacol.* **67**, 923-928.
- Agatonovic-Kustrin S., Tucker G., Zecevic M., Zivanovic L.J. (2000) Prediction of drug transfer into human milk based on molecular structure descriptors. *Anal Chim Acta.* **418**, 181-195.
- Aliabadi F.S., Landoni M.F., Lees P. (2003) Pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and PK-PD integration of danofloxacin in sheep biological fluids. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**, 626-635.
- Álvarez Al., Vallejo F., Barrera B., Merino G., Prieto JG., Tomás-Barberán F., Espín JC. (2011) Bioavailability of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in breastcancer resistance protein 1 knockout mice. *Drug Metab Dispos.* **39**, 2008-2012.
- Álvarez A.I., Real R., Perez M., Mendoza G., Prieto J.G., Merino G. (2010) Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharm Sci.* **99**, 598-617.
- Allen J.D., Brinkhuis R.F., Wijnholds J., Schinkel A.H. (1999) The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene:amplification and overexpression in cell lines selected for resistance totopotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* **59**, 4237-4241.
- Allen J.D., van Loevezijn A., Lakhai J.M., van der Valk M., van Tellingen O., Reid G., Schellens J.H., Koomen G.J., Schinkel A.H. (2002) Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther.* **1**, 417-425.
- Anderson RS., Carlos GM., Robinson IP., Booles D., Burger IH., Whyte AL. (1991) Zinc, copper, iron and calcium concentrations in bitch milk. *J Nutr.* **121**, S81-82.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade J.E., Twaddle N.C., Helferich W.G., Doerge D.R. (2010) Absolute bioavailability of isoflavones from soy protein isolate-containing food in female BALB/c mice. *J Agric Food Chem.* **58**, 4529-4536.
- Anon (1991) *Nitrofurans; Withdrawal of Approval of New Animal Drug Applications*. USDHHS, FDA, Rockville, MD, pp. 1-52.
- Antignac JP, Cariou R., Le Bizec B., Cravedi J.P. & Andre F. (2003) Identification of phytoestrogens in bovine milk using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **17**, 1256-1264.
- Appelbaum PC., Hunter PA. (2000) The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* **16**, 5-15.

B

- Ballent M., Lifschitz A., Virkel G., Sallovitz J., Mate L., Lanusse, C. (2012) In vivo and ex vivo assessment of the interaction between ivermectin and danofloxacin in sheep. *Vet J.* **192**, 422-427.
- Banerjee S., Chatterjee M., Chand K. (2005) Extramammary Paget's disease. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* **71**, 417-420.
- Banerjee S., Kaseb AO., Wang Z., Kong D., Mohammad M., Padhye S., Sarkar FH., Mohammad RM. (2009) Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Res.* **69**, 5575-5583.
- Barrera B., Otero JA., Egido E., Prieto JG., Seelig A., Álvarez Al., Merino G. (2012) The antihelmintic triclabendazole and its metabolites inhibit the membrane transporter ABCG2/BCRP. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**, 3535-3543.
- Bates SE., Medina-Pérez WY., Kohlhagen G., Antony S., Nadjem T., Robey RW., Pommier Y. (2004) ABCG2 mediates differential resistance to SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) and homocamptothecins. *J Pharmacol Exp Ther.* **2**, 836-842.
- Ben Aziz R., Soreq H. (1990) Improving poor in vitro transcription from G,C-rich genes. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3418.

BIBLIOGRAFÍA

- Blackhall WJ., Liu HY., Xu M., Prichard RK., Beech RN. (1998) Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol.* **95**, 193-201.
- Blazquez AG., Briz O., Romero MR., Rosales R., Monte MJ., Vaquero J., Macias RI., Cassio D., Marin JJ. (2012) Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol.* **81**, 273-283.
- Boelaert JR., Yaro S., Augustijns P., Meda N., Schneider YJ., Schols D., Mols R., De Laere EA., Van de Perre P. (2001) Chloroquine accumulates in breast-milk cells: potential impact in the prophylaxis of postnatal mother-to-child transmission of HIV-1. *AIDS.* **15**, 2205-2207.
- Bolca S., Urpi-Sarda M., Blondeel P., Roche N., Vanhaecke L., Possemiers S., Al-Maharik N., Botting N., De Keukeleire D., Bracke M., Heyerick A., Manach C., Depypere H. (2010) Disposition of soy isoflavones in normal human breast tissue. *Am J Clin Nutr.* **91**, 976-984.
- Boumendjel A., Macalou S., Ahmed-Belkacem A., Blanc M., Di Pietro A. (2007) Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Bioorg Med Chem.* **15**, 2892-2897.
- Boyd PA., Wittliff JL. (1978) Mechanism of Fusarium mycotoxin action in mammary gland. *J Toxicol Environ Health.* **4**, 1-8.
- Bowey E., Adlercreutz H., Rowland I. (2003) Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem Toxicol.* **41**, 631-636.
- Brayden D.J., Griffin J. (2008) Avermectin transepithelial transport in MDR1- and MRP-transfected canine kidney monolayers. *Vet Res Commun.* **32**, 93-106.
- Breedveld P., Zelcer N., Pluim D., Sönmezer O., Tibben MM., Beijnen JH., Schinkel AH., van Tellingen O., Borst P., Schellens JH. (2004) Mechanism of the pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions. *Cancer Res.* **64**, 5804-5811.
- Briz O., Serrano M.A., Rebollo N., Hagenbuch B., Meier P.J., Koepsell H., Marin J.J.G. (2002) Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholyglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol Pharmacol.* **61**, 853-860.

BIBLIOGRAFÍA

- Broderick GA. (1995) Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. *J Anim Sci.* **73**, 2760-2773.
- Buzard J.A., Conklin J.D., O'Keefe E. & Paul M.F. (1961) Studies on the absorption, distribution and elimination of nitrofurantoin in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* **131**, 38-43.

C

- Carceles CM., Diaz MS., Vicente MS., Sutra JF., Alvinerie M., Escudero E. (2001) Milk kinetics of moxidectin and doramectin in goats. *Res Vet Sci.* **70**, 227-231.
- Chearwae W., Shukla S., Limtrakul P., Ambudkar SV. (2006) Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Mol Cancer Ther.* **5**, 1995-2006.
- Cheng IC., Shang HF., Lin TF., Wang TH., Lin HS., Lin SH. (2005) Effect of fermented soy milk on the intestinal bacterial ecosystem. *World J Gastroenterol.* **11**, 1225-1227.
- Chung H.J., Kang H.E., Bae E.J., Lee I., Kim S.G., Lee M.G. (2008) Effects of E. Coli lipopolysaccharide on the pharmacokinetics of ipriflavone and its metabolites, M1 and M5, after intravenous and oral administration of ipriflavone to rats: decreased metabolism of ipriflavone due to decreased expression of hepatic CYP1A2 and 2C11. *J Pharm Sci.* **97**, 5024-5036.
- Cimafranca M.A., Davila J., Ekman G.C., Andrews R.N., Neese S.L., Peretz J., Woodling K.A., Helferich W.G., Sarkar J., Flaws J.A., Schantz S.L., Doerge D.R., Cooke P.S. (2010) Acute and chronic effects of oral genistein administration in neonatal mice. *Biol Reprod.* **83**, 114-121.
- 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., Ron M. (2005) Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res.* **15**, 936-944.
- Cooray HC., Janvilisri T., van Veen H.W., Hladky S.B., Barrand M.A. (2004) Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* **17**, 269-275.
- Cotreau M.M., Warren S., Ryan J.L., Fleckenstein L., Vanapalli S.R., Brown K.R., Rock D., Chen C-Y., Schwertschlag U.S. (2003) The antiparasitic moxidectin: safety, tolerability, and pharmacokinetics in humans. *J Clin Pharmacol.* **43**, 1108-1115.

D

- Day AJ., DuPont MS., Ridley S., Rhodes M., Rhodes MJ., Morgan MR., Williamson G. (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* **436**, 71-75.
- Dhillon KS., Singh J. (2009) Managing chronically mastitic cows. *Vet Rec* **165**, 183-184.
- Didier A., Loor F. (1996) The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs.* **7**, 745-751.
- Ding XW., Wu JH., Jiang CP. (2010) ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci.* **86**, 17-18.
- Doyle L., Ross DD. (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene.* **22**, 7340-7358.
- Duncan EJ., Dodds KG., Henry HM., Thompson MP., Phua SH. (2007) Cloning, mapping and association studies of the ovine ABCG2 gene with facial eczema disease in sheep. *Anim Genet.* **38**, 126-131.
- Dupuy J., Larrieu G., Sutra J.F., Eeckhoutte C., Alvinerie M. (2001) Influence of verapamil on the efflux and metabolism of ¹⁴C moxidectin in cultured rat hepatocytes. *J Vet Pharmacol. Ther.* **24**, 171-177.
- Dupuy J., Larrieu G., Sutra J.F., Lespine A., Alvinerie M. (2003) Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Vet Parasitol.* **112**, 337-347.
- Dupuy J., Lespine A., Sutra J.F., Alvinerie M. (2006) Fumagillin, a new P-glycoprotein-interfering agent able to modulate moxidectin efflux in rat hepatocytes. *J Vet Pharmacol Ther.* **29**, 489-94.
- Dupuy J., Lespine A., Sutra J.F., Alvinerie M. (2006) The interaction between moxidectin and MDR transporters in primary cultures of rats hepatocytes. *J Vet Pharmacol Ther.* **29**, 107-111.

E

- Ebert B., Seidel A. & Lampen A. (2007) Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate. *J Toxicol Sci.* **96**, 227-236.
- Enokizono J., Kusuhara & H., Sugiyama Y. (2007) Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol Pharmacol.* **72**, 967-975.

BIBLIOGRAFÍA

- Escudero E., Carceles C.M., Fernández-Varón E., Marín P., Benchaoui H., 2007. Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats. *J Vet Pharmacol Ther.* **30**, 572-577.

F

- Feinshtein V., Holcberg G., Amash A., Erez N., Rubin M., Sheiner E., Polachek H., Ben-Zvi Z. (2010) Nitrofurantoin transport by placental choriocarcinoma JAr cells: involvement of BCRP, OATP2B1 and other MDR transporters. *Arch Gynecol Obstet.* **281**, 1037-1044.
- Fukuda Y., Schuetz JD. (2012) ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochem Pharmacol.* **83**, 1073-1083.

G

- Garcia M.A., Solans C., Aramayona J.J., Rueda S., Bregante M.A. (2000) Development of a method for the determination of danofloxacin in plasma by HPLC with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr.* **14**, 89-92.
- García-Fernández M., Gutiérrez-Gil B., Sánchez JP., Morán JA., García-Gámez E., Alvarez L., Arranz JJ. (2011) The role of bovine causal genes underlying dairy traits in Spanish Churra sheep. *Anim Genet.* **42**, 415-420.
- Gerk P.M., Oo C.Y., Paxton E.W., Moscow J.A. & McNamara P.J. (2001) Interactions between cimetidine, nitrofurantoin, and probenecid active transport into rat milk. *J Pharmacol Exp Ther.* **296**, 175-180.
- Giles RV., Spiller DG., Grzybowski J., Clark RE., Nicklin P., Tidd DM. (1998) Selecting optimal oligonucleotide composition for maximal antisense effect following streptolysin O-mediated delivery into human leukaemia cells. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1567-1575.
- Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J., Sarkadi B. (2004) The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv.* **1**, 27-42.
- González-Lobato. Tesis Doctoral (2012). Diferencias interespecíficas y polimórficas en la actividad y modulación a través de inhibidores del transportador ABCG2/BCRP.

BIBLIOGRAFÍA

- Griffin J., Fletcher N., Clemence R., Blanchflower S., Brayden D.J. (2005) Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *J Vet Pharmacol Ther.* **28**, 257-265.
- Grover PL., Martin FL. (2002) The initiation of breast and prostate cancer. *Carcinogenesis.* **23**, 1095-1102.
- Gu L., House S.E., Prior R.L., Fang N., Ronis M.J., Clarkson T.B., Wilson M.E., Badger T.M. (2006) Metabolic phenotype of isoflavones differ among female rats, pigs, monkeys, and women. *J Nutr.* **136**, 1215-1221.
- Gutmann H., Hruz P., Zimmermann C., Beglinger C., Drewe J. (2005) Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem Pharmacol.* **70**, 695-699.

H

- Halwachs S., Wassermann L., Lindner S., Zizzadore C., Honscha W. (2013) Fungicide prochloraz and environmental pollutant dioxin induce the ABCG2 transporter in bovine mammary epithelial cells by the arylhydrocarbon receptor signaling pathway. *Toxicol Sci.* **131**, 491-501.
- Hannan PC., O'Hanlon PJ., Rogers NH. (1989) In vitro evaluation of various quinolone anti-bacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res Vet Sci.* **46**, 202-211.
- Hardwick L.J.A., Velamakanni S., Van Veen (2007) The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2). *Brit J Pharmacol.* **151**, 163-174.
- Haritova AM., Schrickx J., Lashev LD., Fink-Gremmels J. (2008) Expression of MDR1, MRP2 and BCRP mRNA in tissues of turkeys. *J Vet Pharmacol Ther.* **31**, 378-385.
- Hennessy D., Page S., Gottschall D. (2000) The behaviour of doramectin in the gastrointestinal tract, its secretion in bile and pharmacokinetic disposition in the peripheral circulation after oral and intravenous administration to sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* **23**, 203-213.
- Henrich CJ., Robey RW., Bokesch HR., Bates SE., Shukla S., Ambudkar SV., Dean M., McMahon JB. (2007) New inhibitors of ABCG2 identified by high-throughput screening. *Mol Cancer Ther.* **6**, 3271-3278.

BIBLIOGRAFÍA

- Herrera-Herrera AV., Hernández-Borges J., Rodríguez-Delgado MA. (2009) Fluoroquinolone antibiotic determination in bovine, ovine and caprine milk using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection with ionic liquids as mobile phase additives. *J Chromatogr A.* **23**, 1216-1243.
- Hu M. (2007) Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms. *Mol Pharm.* **4**, 803-806.
- Huang L., Be X., Tchaparian EH., Colletti AE., Roberts J., Langley M., Ling Y., Wong BK., Jin L. (2012) Deletion of Abcg2 has differential effects on excretion and pharmacokinetics of probe substrates in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **343**, 316-324.

I

- Imai Y., Tsukahara S., Asada S., Sugimoto Y. (2004) Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* **64**, 4346-4352.
- Imperiale F., Busetti M.R., Suarez V.H., Lanusse C. (2004) Milk excretion of ivermectin and moxidectin in dairy sheep: assessment of drug residues during cheese elaboration and ripening period. *J Agric Food Chem.* **52**, 6205-6211.
- Ishikawa T., Nakagawa H. (2009) Human ABC transporter ABCG2 in cancer chemotherapy and pharmacogenomics. *J Exp Ther Oncol.* **8**, 5-24.
- Ito K., Kajikawa S., Aisuke N., Hanada T., Doi K. (2003) Antioxidants suppress nitrofurazone-induced proliferation of hepatocytes. *Exp Toxicol Pathol.* **55**, 247-250.

J

- Jacobs A., Wegewitz U., Sommerfeld C., Grossklaus R., Lampen A. (2009) Efficacy of isoflavones in relieving vasomotor menopausal symptoms - A systematic review. *Mol Nutr Food Res.* **53**, 1084-1097.

BIBLIOGRAFÍA

- Janke D., Mehralivand S., Strand D., Gödtel-Armbrust U., Habermeier A., Gradhand U., Fischer C., Toliat M.R., Fritz P., Zanger U.M., Schwab M., Fromm M.F., Nürnberg P., Wojnowski L., Closs E.I., Lang T. (2008) 6-mercaptopurine and 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl) adenine (PMEA) transport altered by two missense mutations in the drug transporter gene ABCC4. *Hum Mutat.* **29**, 659-669.
- Jeong YM., Choi YG., Kim DS., Park SH., Yoon JA., Kwon SB., Park ES., Park KC. (2005) Cytoprotective effect of green tea extract and quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Arch Pharm Res.* **28**, 1251-1256.
- Jonen H.G., Oesch F., & Platt K.L. (1980) 4-Hydroxylation of nitrofurantoin in the rat. A 3-methylcholanthrene-inducible pathway of a relatively nontoxic compound. *Drug Metab Dispos.* **8**, 446-451
- Jonker J.W., Buitelaar M., Wagenaar E., van der Valk M. A., Scheffer G. L., Schepers R. J., Plösch T., Kuipers F., Elferink R. P., Rosing H., Beijnen J. H., Schinkel A.H. (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyrin. *Proc Natl Acad Sci.* **99**, 15649-15654.
- Jonker J.W., Merino G., Musters S., van Herwaarden A.E., Bolscher E., Wagenaar E., Mesman E., Dale T.C., Schinkel A.H. (2005) The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med.* **11**, 127-129.
- Jonker J.W., Smit J.W., Brinkhuis R.F., Maliepaard M., Beijnen J.H., Schellens J. H. M., Schinkel A.H. (2000) Role of breast cancer resistance protein in the J.H.M bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst.* **92**, 1651-1656.
- Juan ME., Maijó M., Planas JM. (2010) Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* **51**, 391-398.

K

- Kaartinen L., Salonen M., Alli L., Pyörälä S. (1995) Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *J Vet Pharmacol Ther.* **18**, 357-362.

BIBLIOGRAFÍA

- Kari F.W., Weaver R., & Neville M.C. (1997) Active transport of nitrofurantoin across the mammary epithelium in vivo. *J Pharmacol Exper Ther.* **280**, 664-668
- Katayama K., Masuyama K., Yoshioka S., Hasegawa H., Mitsuhashi J. & Sugimoto Y. (2007) Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure-activity relationship. *Cancer Chemother Pharmacol.* **60**, 789-797.
- Kawase A., Matsumoto Y., Hadano M., Ishii Y., Iwaki M. (2009) Differential effects of chrysins on nitrofurantoin pharmacokinetics mediated by intestinal breast cancer resistance protein in rats and mice. *J Pharm Pharm Sci.* **12**, 150-163.
- Kim JH., Kim SR., Song IS., Shin HJ., Kim HS., Lee JH., Ko SG., Shin YC. (2011) Different transport activity of human triallelic MDR1 893Ala/Ser/Thr variant and its association with herb extracts. *Phytother Res.* **25**, 1141-1147.
- Kishida T., Nagamoto M., Ohtsu Y., Watakabe M., Ohshima D., Nashiki K., Mizushige T., Izumi T., Obata A., Ebihara K. (2004) Lack of an inducible effect of dietary soy isoflavones on the mRNA abundance of hepatic cytochrome P-450 isozymes in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**, 508-515.
- Krishnamurthy P. & Schuetz J.D. (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **46**, 381-410.
- Kunnumakkara AB., Guha S., Krishnan S., Diagaradjane P., Gelovani J., Aggarwal BB. (2007) Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Res.* **67**, 3853-3861.
- Kuppens IE., Witteveen EO., Jewell RC., Radema SA., Paul EM., Mangum SG., Beijnen JH., Voest EE., Schellens JH. (2007) A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin Cancer Res.* **13**, 3276-3285.

L

- Laffont C.M., Toutain P.L., Alvinerie M., Bousquet-Mélou A. (2002) Intestinal secretion is the major route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug Metab Dispos.* **30**, 626-630.

BIBLIOGRAFÍA

- Lee DG., Cho HJ., Yi H., Cho SM., Jo K., Park JA., Lee BH., Hwang SH., Jeong SM., Nah SY., Shin HC. (2012) Functional expression and characterization in *Xenopus laevis* oocytes of the ABCG2 transporter derived from A549 human lung adenocarcinoma cells. *Oncol Rep.* **27**, 499-503.
- Leslie EM., Deeley RG., Cole SP. (2001) Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology*. **167**, 3-23.
- Lespine A., Solenne M., Dupuy J., Roulet A., Pineau T., Orlowski S., Alvinerie M. (2007) Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure-affinity relationship. *Eur J Pharm Sci.* **30**, 84-94.
- Li H., Jin HE., Kim W., Han YH., Kim DD., Chung SJ., Shim CK. (2008) Involvement of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in Caco-2 and MDCKII cells. *Pharm Res.* **25**, 2601-2612.
- Li Y. and Paxton J.W. (2013) The effects of flavonoids on the ABC transporters: consequences for the pharmacokinetics of substrate drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **9**, 267-285.
- Lifschitz A., Virkel G., Imperiale F., Sutra J.F., Galtier P., Lanusse C., Alvinerie M. (1999). Moxidectin in cattle: correlation between plasma and target tissues disposition. *J Vet Pharmacol Ther.* **22**, 266-273.
- Limtrakul P., Khantamat O., Pintha K. (2005) Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin. *J Chemother.* **17**, 86-95.
- Lindecrona RH., Friis C., Aarestrup FM. (2000) The pharmacodynamic effect of amoxicillin and danofloxacin against *Salmonella typhimurium* in an in-vitro pharmacodynamic model. *Res Vet Sci.* **68**, 261-264.
- Lindner S., Halwachs S., Wassermann L., Honscha W. (2013) Expression and subcellular localization of efflux transporter ABCG2/BCRP in important tissue barriers of lactating dairy cows, sheep and goats. *J Vet Pharmacol Ther.* **36**, 562-570.
- Liu K.H., Kim M.J., Jeon B.H., Shon J.H., Cha I.J., Cho K.H., Lee S.S. & Shin J.G. (2006) Inhibition of human cytochrome P450 isoforms and NADPH-CYP reductase in vitro by 15 herbal medicines, including *Epimedii herba*. *J Clin Pharm Ther.* **31**, 83-91.
- Lundh T. (1995) Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *Proc Soc Exp Biol Med.* **208**, 33-39.

BIBLIOGRAFÍA

M

- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., & Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **79**, 727-747.
- Mao Q. & Unadkat J.D. (2005) Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport . *The AAPS Journal.* **7**, 118-133.
- Marazuela M.D., Moreno-Bondi M.C. (2004) Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A.* **1034**, 25-32.
- Martin JH., Begum S., Alalami O., Harrison A., Scott KW. (2000) Endothelial nitric oxide synthase: correlation with histologic grade, lymph node status and estrogen receptor expression in human breast cancer. *Tumour Biol.* **21**, 90-97.
- Maubach J., Depypere HT., Goeman J., Van der Eycken J., Heyerick A., Bracke ME., Blondeel P., De Keukeleire D. (2004) Distribution of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids. *Obstet Gynecol.* **103**, 892-898.
- McNamara PJ., Burgio D., Yoo SD. (1992) Pharmacokinetics of cimetidine during lactation: species differences in cimetidine transport into rat and rabbit milk. *J Pharmacol Exp Ther.* **261**, 918-923.
- McNamara PJ., Meece JA., Paxton E. (1996) Active transport of cimetidine and ranitidine into the milk of Sprague Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther.* **277**, 1615-1621.
- McKellar Q., Gibson I., Monteiro A., Bregante M. (1999) Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**, 1988-1992.
- McKellar QA., Gokbulut C. (2012) Pharmacokinetic features of the antiparasitic macrocyclic lactones. *Curr Pharm Biotechnol.* **13**, 888-911.
- McManaman JL., Neville MC. (2003) Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev.* **55**, 629-641.
- Mealey K.L. (2008) Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: heartworm prevention and pharmacogenetics. *Vet Parasitol.* **158**, 215-222.
- Mealey K.L. (2012) ABCG2 transporter: therapeutic and physiologic implications in veterinary species. *J Vet Pharmacol Ther.* **35**, 105-112.

BIBLIOGRAFÍA

- Merino G., Alvarez A.I., Pulido M.M., Molina A.J., Schinkel A.H., Prieto J.G. (2006) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab Dispos.* **34**, 690-695.
- Merino G., Jonker J.W., Wagenaar E., Pulido M.M., Molina A.J., Alvarez A.I., Schinkel A.H. (2005) Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metab Dispos.* **33**, 614-618.
- Merino G., van Herwaarden AE., Wagenaar E., Jonker J.W., Schinkel A.H. (2005) Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. *Mol Pharmacol.* **67**, 1765-1771.
- Merino G., Jonker J.W., Wagenaar E., Van Herwaarden A.E., Schinkel, A.H. (2005) The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics,hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol.* **67**, 1758-1764
- Merino G., Perez M., Real R., Egido E., Prieto J.G., Alvarez A.I. (2010) In vivo inhibition of BCRP/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: a comparative study in Bcrp1 (-/-) mice. *Pharm Res.* **27**, 2098-2105.
- Mestorino N., Marchetti M.L., Turic E., Pesoa J., Errecalde J. (2009) Concentrations of danofloxacin 18% solution in plasma, milk and tissues after subcutaneous injection in dairy cows. *Anal Chim Acta.* **637**, 33-39.
- Middleton MR., Lorigan P., Owen J., Ashcroft L., Lee SM., Harper P., Thatcher N. (2000) A randomized phase III study comparing dacarbazine, BCNU, cisplatin and tamoxifen with dacarbazine and interferon in advanced melanoma. *Br J Cancer.* **82**, 1158-62.
- Mindermann T., de Rougemont O. (2004) The significance of tumor location for Gamma Knife treatment of meningiomas. *Stereotact Funct Neurosurg.* **82**, 194-195.
- Mir G., & Uppal R.P. (1984) Some pharmacokinetic studies of nitrofurantoin and furazolidone in buffalo. *J Anim Sci.* **54**, 888-889.
- Molento M.B., Lifschitz A., Sallovitz J., Lanusse C., Prichard R. (2004) Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitol Res.* **92**, 121-127.
- Moon Y.J., Sagawa K., Frederick K., Zhang S., Morris M.E. (2006) Pharmacokinetics and bioavailability of the isoflavone biochanin A in rats. *AAPS J.* **8**, E433-442.

BIBLIOGRAFÍA

- Morin X.K., Bond T.D., Loo T.W., Clarke D.M., Bear C.E. (1995) Failure of P-glycoprotein (MDR1) expressed in Xenopus oocytes to produce swelling-activated chloride channel activity. *J Physiol.* **486**, 707-714.
- Morris M.E & Zhang, S. (2006) Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci.* **78**, 2116-2130.
- Mortensen A., Kulling SE., Schwartz H., Rowland I., Ruefer CE., Rimbach G., Cassidy A., Magee P., Millar J., Hall WL., Kramer Birkved F., Sorensen IK., Sontag G. (2009) Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Mol Nutr Food Res.* **2**, S266-309.
- Muenster U., Grieshop B., Ickenroth K., Gnoth M.J. (2008) Characterization of substrates and inhibitors for the in vitro assessment of BCRP mediated drug-drug interactions. *Pharm Res.* **25**, 2320-2326.
- Mukherjee A., Amato P., Allred DC., Fernandez-Valdivia R., Nguyen J., O'Malley BW., DeMayo F.J., Lydon JP. (2006) Steroid receptor coactivator 2 is essential for progesterone-dependent uterine function and mammary morphogenesis: insights from the mouse--implications for the human. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **102**, 22-31.

N

- Nabekura T., Kamiyama S., Kitagawa S. (2005) Effects of dietary chemopreventive phytochemicals on P-glycoprotein function. *Biochem Biophys Res Commun.* **327**, 866-870.
- Nakanishi T., Doyle L.A., Hassel B., Wei Y., Wu K.S., Bauer S., Pumplin D.W., Fang H.B., Ross D.D. (2003) Functional characterization of human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) expressed in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Mol Pharmacol.* **64**, 1452-1462 .
- Nakanishi T., Ross DD. (2012) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer.* **31**, 73-99.
- Nakayama A., Matsuo H., Takada T., Ichida K., Nakamura T., Ikebuchi Y., Ito K., Hosoya T., Kanai Y., Suzuki H., Shinomiya N. (2011) ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **30**, 1091-1097.
- Neu HC. (1991) Microbiologic aspects of fluoroquinolones. *Am J Ophthalmol.* **112**, 15S-24S.

O

- Oldham EA., Li C., Ke S., Wallace S., Huang P. (2000) Comparison of action of paclitaxel and poly (L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate in human breast cancer cells. *Int J Oncol.* **16**, 125-132.
- Olsen HG., Nilsen H., Hayes B., Berg PR., Svendsen M., Lien S., Meuwissen T. (2007) Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the ABCG2 gene affecting milk composition of dairy cattle. *BMC Genet.* **21**, 8-32.
- Oo TY. (1995) Chemotherapy of colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* **3**, 284.
- Oostendorp RL., Buckle T., Beijnen, JH., Van Tellingen O., Schellens JH. (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. *Invest New Drugs.* **27**, 31-40.
- Otero JA., Real R., De la Fuente Á., Prieto JG., Marqués M., Álvarez AI., Merino G. The bovine ATP-binding cassette transporter ABCG2 Tyr581Ser single-nucleotide polymorphism increases milk secretion of the fluoroquinolone danofloxacin. *Drug Metab Dispos.* **41**, 546-549.
- Oukessou M., Berrag B., Alvinerie M. (1999) A comparative kinetic study of ivermectin and moxidectin in lactating camels (*Camelus dromedarius*). *Vet Parasitol.* **83**, 151-159.

P

- Pavek P., Merino G., Wagenaar E., Bolscher E., Novotna M., Jonker JW., Schinkel AH. (2005) Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *J Pharmacol Exp Ther.* **312**, 144-152.
- Paul A.J., Hutchens D.E., Firkins L.D., Borgstrom M. (2004) Dermal safety study with imidacloprid/moxidectin topical solution in the ivermectin-sensitive collie. *Vet Parasitol.* **121**, 285-291.
- Pérez M., Blazquez A.G., Real R., Mendoza G., Prieto J.G., Merino G., Alvarez A.I. (2009) In vitro and in vivo interaction of moxidectin with BCRP/ABCG2. *Chem Biol Interact.* **180**, 106-112.

BIBLIOGRAFÍA

- Pérez M., Real R., Mendoza G., Merino G., Prieto J.G., Alvarez A.I. (2009) Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: modulation by isoflavones. *J Vet Pharmacol Ther.* **32**, 498-502.
- Pérez M., Otero JA., Barrera B., Prieto JG., Merino G., Álvarez AI. (2012) Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep. *Vet J.* **196**, 203-208.
- Pick A., Müller H., Wiese M. (2010) Novel lead for potent inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorg Med Chem Lett.* **20**, 180-183.
- Piskula MK. (2000) Soy isoflavone conjugation differs in fed and food-deprived rats. *J Nutr.* **130**, 1766-71.
- Polgar O., Robey RW., Bates SE. (2008) ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **4**, 1-15.
- Poutrel B., Stegemann M.R., Roy O., Pothier F., Tilt N., Payne-Johnson M. (2008) Evaluation of the efficacy of systemic danofloxacin in the treatment of induced acute Escherichia coli bovine mastitis. *J Dairy Res.* **75**, 310-318.
- Prieto JG., Merino G., Pulido MM., Estevez E., Molina AJ., Vila L., Alvarez AI. (2003) Improved LC method to determine ivermectin in plasma. *J Pharm Biomed Anal.* **31**, 639-645.
- Pulido M.M., Molina A. J., Merino G., Prieto J. G., Alvarez A. I. (2006) Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* **29**, 279-287.
- Pulido-Duarte. Tesis Doctoral (2006). Implicación de la proteína BCRP/MXR/ABCG2 en el transporte y aparición de fármacos en leche. Expresión y modulación funcional en rumiantes.

R

- Rabindran S.K., Ross D.D., Doyle L.A., Yang W., Greenberger L.M. (2000) Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **60**, 47-50.
- Ramirez CJ., Minch JD., Gay JM., Lahmers SM., Guerra DJ., Haldorson GJ., Schneider T., Mealey KL. (2011) Molecular genetic basis for fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats. *Pharmacogenet Genomics.* **21**, 66-75.

BIBLIOGRAFÍA

- Rantala M., Kaartinen L., Välimäki E., Stryman M., Hiekkaranta M., Niemi A., Saari L., Pyörälä S. (2002) Efficacy and pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J Vet Pharmacol Ther.* **25**, 251-258.
- Reagan-Shaw S., Nihal N., Ahmad M. (2007) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **22**, 659-661.
- Real R., Egido E., Perez M., González-Lobato L., Barrera B., Prieto, J.G., Álvarez A.I., Merino G. (2011) Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: interaction with ivermectin. *J Vet Pharmacol Ther.* **34**, 313-321.
- Real R., González-Lobato L., Baro M.F., Valbuena S., De la Fuente A., Prieto J.G., Álvarez A.I., Marqués M.M., Merino G. (2011) Analysis of the effect of the bovine ABCG2 SNP Y581S on transcellular transport of veterinary drugs using new cell culture models. *J Anim Sci.* **89**, 4325-4338.
- Robey R.W., Polgar O., Deeken J., To K.K.W., Bates S.E. (2007) ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 39-57.
- Robey R.W., To K.K., Polgar O., Dohse M., Fetsch P., Dean M., Bates S.E. (2009) ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* **61**, 3-13.
- Ron M., Cohen-Zinder M., Peter C., Weller JI., Erhardt G. (2006) Short communication: a polymorphism in ABCG2 in Bos indicus and Bos taurus cattle breeds. *J Dairy Sci.* **89**, 4921-4923.

S

- Schinkel A.H., Jonker J.W. (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* **55**, 3-29.
- Schinkel A.H., Smit JJ., van Tellingen O., Beijnen J.H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C.A, van der Valk M. A., Robanus-Maandag E.C., te Riele H. P. J., Berns A. J. M., Borst P. (1994) Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell.* **77**, 491-502.

BIBLIOGRAFÍA

- Schnepf R. and Zolk O. (2013) Effect of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 on pharmacokinetics: experimental findings and clinical implications. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **9**, 287-306.
- Schrickx J.A., Fink-Gremmels J. (2008) Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products. *Eur J Pharmacol.* **585**, 510-519.
- Schrickx, J.A., Fink-Gremmels, J. (2007) Danofloxacin-mesylate is a substrate for ATP-dependent efflux transporters. *Br J Pharmacol.* **150**, 463-469.
- Sesink AL., Arts IC., De Boer VC., Breedveld P., Schellens JH., Hollman PC., Russel FG. (2005) Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol Pharmacol.* **67**, 1999-2006.
- Setchell KD., Brown N.M., Desai P., Zimmer-Nechemias L., Wolfe B.E., Brashear W.T., Kirschner A.S., Cassidy A., Heubi J.E. (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr.* **131**, 1362S-1375S.
- Shem-Tov M., Ziv G., Glickman A., Saran A. (1997) Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of ewes. *Vet Res.* **28**, 571-579.
- Shoop W., Soll M. (2002) Chemistry, pharmacology and safety of the macrocyclic lactones, in J.Vercruyse, R.S. Rew, (Eds.), *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. CAB International. pp. 1-30.
- Shukla S., Zaher H., Hartz A., Bauer B., Ware JA., Ambudkar SV. (2009) Curcumin inhibits the activity of ABCG2/BCRP1, a multidrug resistance-linked ABC drug transporter in mice. *Pharm Res.* **26**, 480-487.
- Szakács G., Váradi A., Ozvegy-Laczka C., Sarkadi B. (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today.* **13**, 379-393.

T

- Tamaki H., Satoh H., Hori S., Ohtani H., Sawada Y. (2010) Inhibitory effects of herbal extracts on breast cancer resistance protein (BCRP) and structure-inhibitory potency relationship of isoflavonoids. *Drug Metab Pharmacokinet.* **25**, 170-179.

BIBLIOGRAFÍA

- Tan KW., Li Y., Paxton JW., Birch NP., Scheepens A. (2013) Identification of novel dietary phytochemicals inhibiting the efflux transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Food Chem.* **138**, 2267-2274.
- Tanaka Y., Slitt A.L., Leazer T.M., Maher J.M., Klaassen C.D. (2004) Tissues distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in rats and mice. *Biochem Biophys Res Commun.* **326**, 181-187.
- Telang U., Ji Y., Morris M.E. (2009) ABC transporters and isothiocyanates: potential for pharmacokinetic diet-drug interactions. *Biopharm Drug Dispos.* **30**, 335-344.

U

- Urpi-Sarda M., Morand C., Besson C., Kraft G., Viala D., Scalbert A., Besle J.M., Manach C. (2008) Tissue distribution of isoflavones in ewes after consumption of red clover silage. *Arch Biochem Biophys.* **476**, 205-210.

V

- Vallejo M., Briz O., Serrano M.A., Monte M.J., Marin J.J. (2006) Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol.* **44**, 1150-1157.
- Van de Wetering K., Sapthu S. (2012) ABCG2 functions as a general phytoestrogen sulfate transporter in vivo. *FASEB J.* **26**, 4014-4024.
- Van Herwaarden A.E., Jonker J.W., Wagenaar E., Brinkhuis R.F., Schellens J.H.M., Beijnen J.H., Schinkel A.H. (2003) The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res.* **63**, 6447-6452.
- Van Herwaarden A.E., Wagenaar E., Karnekamp B., Merino G., Jonker J.W., and Schinkel A.H. (2006) Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduce systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis.* **27**, 123-130.
- Van Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J.W., Rosing, H., Beijnen, J.H. & Schinkel A.H. (2007) Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol.* **27**, 1247-1253.

BIBLIOGRAFÍA

- Vlaming ML., Van Esch A., Pala Z., Wagenaar E., Van de Wetering K., Van Tellingen O., Schinkel AH. (2009) Abcc2 (Mrp2), Abcc3 (Mrp3), and Abcg2 (Bcrp1) are the main determinants for rapid elimination of methotrexate and its toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo. *Mol Cancer Ther.* **8**, 3350-3359.

W

- Wang L., Leggas M., Goswami M., Empey P.E., McNamara P.J. (2008) N-(4-[2-(1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-isoquinolinyl)ethyl]-phenyl)-9,10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-4-acridine carboxamide (GF120918) as a chemical ATP-binding cassette transporter family G member 2 (Abcg2) knockout model to study nitrofurantoin transfer into milk. *Drug Metab Dispos.* **36**, 2591-2596.
- Wang S.W., Chen J., Jia X., Tam V.H., Hu M. (2006) Disposition of flavonoids via enteric recycling: structural effects and lack of correlations between in vitro and in situ metabolic properties. *Drug Metab Dispos.* **34**, 1837-1848.
- Wang X., Morris M.E. Effects of the flavonoid chrysin on nitrofurantoin pharmacokinetics in rats: potential involvement of ABCG2 (2007) *Drug Metab Dispos.* **35**, 268-274.
- Wang S.W., Chen Y., Joseph T., Hu M. (2008) Variable isoflavone content of red clover products affects intestinal disposition of biochanin A, formononetin, genistein, and daidzein. *J Altern Complement Med.* **14**, 287-297.
- Wassermann L., Halwachs S., Baumann D., Schaefer I., Seibel P., Honscha W. (2013) Assessment of ABCG2-mediated transport of xenobiotics across the blood-milk barrier of dairy animals using a new MDCKII in vitro model. *Arch Toxicol.* **87**, 1671-1682.
- Williams JA., Phillips DH. (2000) Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Res.* **60**, 4667-4677.
- Williamson G., Manach C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr.* **81**, 243S-255S.
- Wolfson JS., Hooper DC., Shih DJ., McHugh GL., Swartz MN. (1989) Isolation and characterization of an *Escherichia coli* strain exhibiting partial tolerance to quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* **33**, 705-709.

- Wright JA., Haslam IS., Coleman T., Simmons NL. (2011) Breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)-mediated transepithelial nitrofurantoin secretion and its regulation in human intestinal epithelial (Caco-2) layers. *Eur J Pharmacol.* **672**, 70-76.

X

- Xu H., Kulkarni K.H., Singh R., Yang Z., Wang S.W., Tam V.H., Hu M. (2009) Disposition of Naringenin via Glucuronidation Pathway Is Affected by Compensating Efflux Transporters of Hydrophilic Glucuronides. *Mol Pharm.* **6**, 1703-1715.

Y

- Yoshikawa M., Ikegami Y., Sano K., Yoshida H., Mitomo H., Sawada S., Ishikawa T. (2004) Transport of SN-38 by the wild type of human ABC transporter ABCG2 and its inhibition by quercetin, a natural flavonoid. *J Exp Ther Oncol.* **4**, 25-35.
- Youdim KA., Shukitt-Hale B., Joseph JA. (2004) Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic Biol Med.* **37**, 1683-1693.

Z

- Zhang L., Zuo Z., Lin G. (2007) Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Mol Pharm.* **4(6)**, 833-845.
- Zhang S., Sagawa K., Arnold R.D., Tseng E., Wang X., Morris M.E. (2010) Interactions between the flavonoid biochanin A and P-glycoprotein substrates in rats: In vitro and in vivo. *J Pharm Sci.* **99**, 430-441.
- Zhang S., Wang X., Sagawa K., Morris. (2005) Flavonoids chrysins and benzoflavone, potent breast cancer resistance protein inhibitors, have no significant effect on topotecan pharmacokinetics in rats or mdr1a/1b (-/-) mice. *Drug Metab Dispos.* **33**, 341-348.
- Zhang Y., Wang H., Unadkat J.D., Mao Q. (2007) Breast cancer resistance protein 1 limits fetal distribution of nitrofurantoin in the pregnant mouse. *Drug Metab Dispos.* **35**, 2154-2158.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang Y., Zhou L., Unadkat J.D., Mao Q. (2009) Effect of pregnancy on nitrofurantoin disposition in mice. *J Pharm Sci.* **98**, 4306-4315.
- Zhang L., Zuo Z., Lin, G. (2007) Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Mol Pharmacol.* **4**, 833-845.
- Zhang S., Yang X., Morris M.E. (2004) Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Pharm Res.* **21**, 1263-1273.
- Zhou L., Naraharisetti S. B., Wang H., Unadkat J. D., Hebert M. F., Mao Q. (2008) The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits fetal distribution of glyburide in the pregnant mouse: an Obstetric-Fetal Pharmacology Research Unit Network and University of Washington Specialized Center of Research Study. *Mol Pharmacol.* **73**, 949-959.
- Zhou S., Hu Y., Zhang B., Teng Z., Gan H., Yang Z., Wang Q., Huan M., Mei Q. (2008) Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats. *J Agric Food Chem.* **56**, 8354-8359.
- Zulalian J., Stout S.J., da Cunha A.R., Garces T., Miller P. (1994) Absorption, tissue distribution, metabolism and excretion of moxidectin in cattle. *J Agric Food Chem.* **42**, 381-387.

