

MI PROYECTO DE TESIS

Papel de la proteína ABCG2 en la secreción de fármacos y compuestos naturales a leche

Jon Andoni Otero Calzada

Instituto de Sanidad Animal y Desarrollo Ganadero. Departamento de Ciencias Biomédicas. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.

jotec@unileon.es

Dentro del ámbito que abarca el Sector Ganadero y más concretamente la industria alimentaria derivada del mismo, nos encontramos como componente importante dentro de la economía nacional a la industria láctea. Uno de los problemas que tiene esta industria es la presencia potencial de residuos farmacológicos y de contaminantes medioambientales en la leche procedente de rumiantes. Esto supone un problema alimentario y sanitario con importantes riesgos para la Salud Pública como entre otros, el desarrollo de alergias, efectos tóxicos, aparición de cepas resistentes a antibióticos y alteraciones de la flora intestinal (McManaman and Neville, 2003). A esto hay que añadir el coste económico que le supone al ganadero la retirada de la leche procedente de animales tratados.

Recientemente se ha demostrado que uno de los principales determinantes de la secreción activa de fármacos a la leche es la proteína Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2), un miembro de la familia de los transportadores dependientes de ATP. Los transportadores ABC se expresan en diferentes barreras (tales como intestino, hígado y riñón) y limitan el paso de compuestos tóxicos a determinados órganos. De la misma manera, también se ha demostrado la presencia de ABCG2 en la glándula mamaria (Jonker et al., 2005) así como su papel esencial en la secreción activa a leche de los sustratos de dicho transportador englobando entre otros antibióticos, agentes carcinógenos, toxinas, vitaminas y antiparasitarios.

Una de las cuestiones que permanece sin explorar en animales de abasto es conocer si la existencia de variaciones genéticas o polimorfismos puede afectar a la actividad del transportador y así estar asociadas con la susceptibilidad a xenobióticos o con la diferente excreción de fármacos en leche entre individuos.

En humanos, se han descrito ampliamente diversos polimorfismos del

transportador ABCG2 que dan lugar a diferente funcionalidad en la proteína y que son causantes directos de determinados trastornos como la gota (Woodward et al., 2009). En cuanto a los animales domésticos, se ha identificado una mutación en el gen de ABCG2 con un efecto en la composición y cantidad de la leche de vacas Holstein y roja noruega (Cohen-Zinder et al., 2005). Este SNP (A→C) codifica la sustitución de una tirosina por una serina (Y581S). Así, se ha sugerido que este polimorfismo del transportador ABCG2 puede tener un papel importante, conjuntamente con su implicación en el transporte de fármacos y compuestos endógenos.

Para llevar a cabo un *screening* inicial eficiente y fiable de los compuestos que son capaces de interactuar con el transportador bovino y ovino y por lo tanto que pueden ser potencialmente secretados a leche, generamos un modelo *in vitro* que permitiese evaluar la interacción entre el transportador y un determinado compuesto ya sea como sustrato (el compuesto es exportado fuera de la célula a través del transportador) o como inhibidor (el compuesto bloquea el funcionamiento del transportador impidiendo la exportación de sustratos). Para ello se transdujeron células de insecto Sf-9 con el gen ovino y bovino de ABCG2 tanto con la variante salvaje como con la portadora del polimorfismo Y581S (**Fig. 1**). A partir de estas células se obtuvieron vesículas de membrana que permiten llevar a cabo ensayos de transporte. Gracias al sistema de transporte vesicular en células de insecto Sf-9, junto con el sistema en células MDCK-II puesto a punto previamente por nuestro grupo, se determinó la capacidad de dicha proteína para interactuar con diferentes fármacos y compuestos con relevancia en la medicina veterinaria. Asimismo, se demostró la capacidad diferencial de ambas variantes para transportar sustratos, mostrando la variante Y581S una mayor capacidad de transporte (Real et al., 2011).

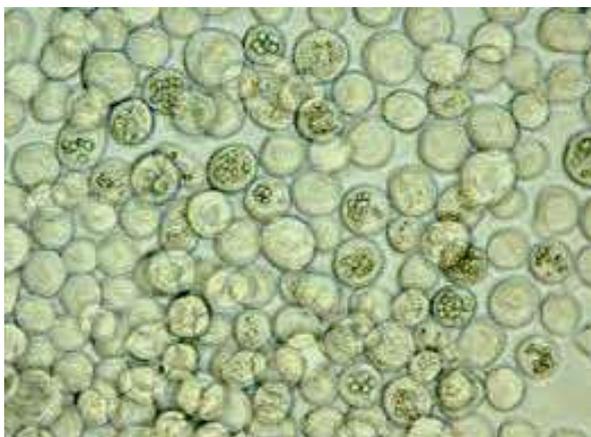


Figura 1. Células de insecto Sf-9 transducidas con el gen del transportador ABCG2.

Una vez establecida una interacción *in vitro* gracias a los modelos puestos a punto en el laboratorio, es necesario confirmar en un modelo *in vivo* la relevancia de la interacción compuesto-transportador descrita a nivel celular como paso previo al estudio en rumiantes.

Para evaluar el efecto *in vivo* del transportador sobre un determinado compuesto utilizamos ratones *wild type* y ratones *knockout* para el transportador ABCG2 (**Fig. 2**). De todos los compuestos analizados *in vivo* e *in vitro*, sólo los más prometedores pasan a la fase de estudio en rumiantes; fármacos tales como los antibióticos danofloxacina y enrofloxacina, o compuestos provenientes de la dieta como ciertos flavonoides y lignanos.



Figura 2. Ratón *knockout* para el gen del transportador ABCG2.

Para analizar el efecto del polimorfismo bovino en animales de granja fue necesario localizar un número suficientemente elevado de vacas portadoras del polimorfismo Y581S. Para ello, se genotiparon pajuelas de sementales a través de los cuales se localizaron multitud de vacas lecheras de raza Holstein también portadoras de dicho polimorfismo. Tras el genotipado se encontró que una granja privada localizada en la provincia de León era la más adecuada para realizar los ensayos debido a la proximidad y al número de individuos portadores del polimorfismo. Tras la administración de la dosis terapéutica del antibiótico danofloxacina a vacas portadoras y no portadoras del polimorfismo se demostró que, tal y como se había demostrado *in vitro* e *in vivo*, las vacas portadoras del polimorfismo Y581S (que *in vitro* se había caracterizado como variante más activa) secretaban a la leche el doble de fármaco que aquellas vacas que carecían del polimorfismo (Otero et al., 2013) (**Fig. 3**).



Figura 3. Recogida de muestra de sangre de una vaca portadora del polimorfismo Y581S del transportador ABCG2.

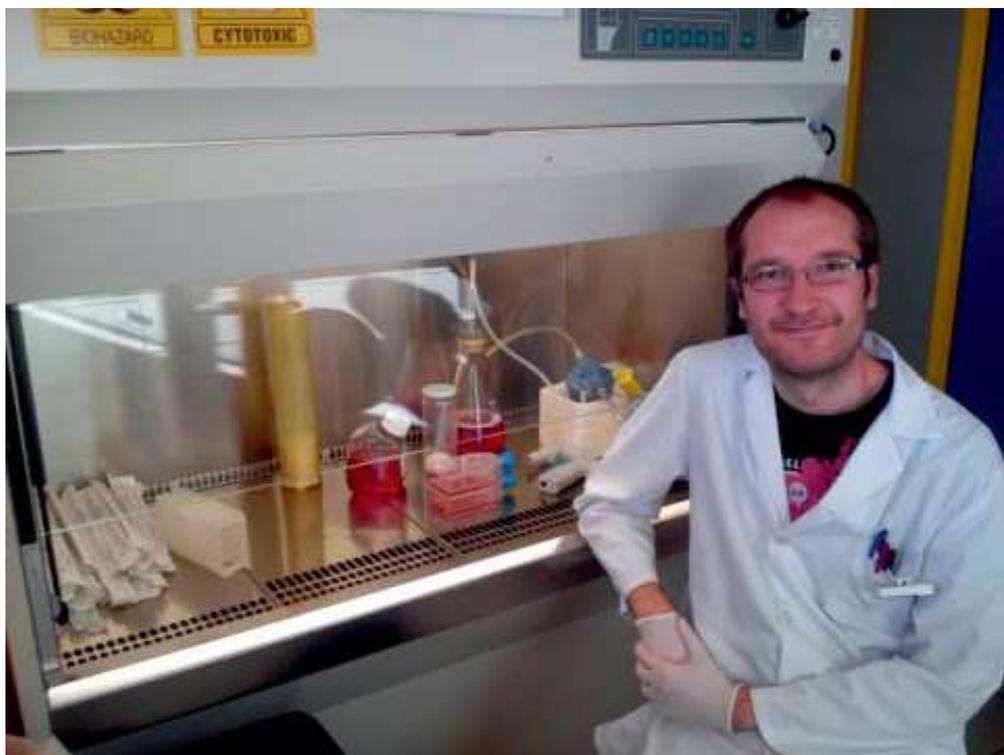
El transportador ABCG2 también tiene la capacidad de transportar metabolitos endógenos y compuestos naturales procedentes de la dieta. Por ello y como consecuencia de los excelentes resultados obtenidos en los experimentos de excreción de fármacos a leche, actualmente se está llevando a cabo junto con el Netherlands Cancer Institute (NKI/AvL) un estudio metabólico comparativo entre la leche obtenida a partir de vacas portadoras y no portadoras del polimorfismo.

Por otra parte, también hemos determinado la capacidad de determinados flavonoides presentes en la dieta de inhibir el transportador tanto *in vitro* como *in vivo* con ratones. Así, estudios de inhibición en ovejas administrando el sustrato enrofloxacin junto con flavonoides demostraron que tanto la administración exógena de dichos flavonoides como la administración de dietas enriquecidas en dichos compuestos, producía una reducción de los niveles del antibiótico enrofloxacin en leche (Perez et al., 2013).

La relevancia de esta línea de investigación radica en la capacidad de modular o predecir los niveles de compuestos nocivos secretados a leche caracterizando los factores que influyen en la secreción activa de compuestos a través del transportador ABCG2. Para ello nos podemos valer de factores genéticos asociados al transportador (polimorfismos) o de la implementación de dietas ricas en determinados nutrientes (inhibidores) que permiten reducir la cantidad de compuestos exógenos (sustratos) secretados a la leche y que generan millones de euros de pérdidas cada año.

Directoras de tesis

Dra. Ana Isabel Álvarez de Felipe y Dra. Gracia Merino Peláez.



El autor de la tesis doctoral.

Bibliografía

- Cohen-Zinder, M., Seroussi, E., Larkin, D.M., Loor, J.J., Everts-van der Wind, A., Lee, J.H., Drackley, J.K., Band, M.R., Hernandez, A.G., Shani, M., Lewin, H.A., Weller, J.I. y Ron, M. 2005. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Research* 15:936-944
- Jonker, J.W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A.E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T.C. y Schinkel, A.H. 2005. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nature Medicine* 11:127-129.
- McManaman, J.L. y Neville, M.C. 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:629-641.
- Otero, J.A., Real, R., de la Fuente, A., Prieto, J.G., Marques, M., Alvarez, A.I. y Merino, G. 2013. The bovine ATP-binding cassette transporter ABCG2 Tyr581Ser single-nucleotide polymorphism increases milk secretion of the fluoroquinolone danofloxacin. *Drug Metabolism and Disposition*

41:546-549.

- Perez, M., Otero, J.A., Barrera, B., Prieto, J.G., Merino, G. y Alvarez, A.I. 2013. Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep. *The Veterinary Journal* 196:203-208.
- Real, R., Gonzalez-Lobato, L., Baro, M.F., Valbuena, S., de la Fuente, A., Prieto, J.G., Alvarez, A.I., Marques, M.M. y Merino, G. 2011. Analysis of the effect of the bovine adenosine triphosphate-binding cassette transporter G2 single nucleotide polymorphism Y581S on transcellular transport of veterinary drugs using new cell culture models. *Journal of Animal Science* 89:4325-4338.
- Woodward, O.M., Kottgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W.B. y Kottgen, M. 2009. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:10338-10342.