



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**Evaluación de la expresión de la P-glicoproteína posterior a glucocorticoterapia en
linfosarcoma canino espontáneo**

T E S I S QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

AGUSTÍN ACOSTA VARGAS

TUTOR PRINCIPAL

LUIS NÚÑEZ OCHOA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

ARMANDO PÉREZ TORRES

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

SILVIA RIVAS VERA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

MÉXICO, DF, Agosto 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Para mis padres y hermanos, quienes de algún modo contribuyeron para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a quien agradezco por mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca la cual permitió la realización de esta investigación.

Al Dr. Luis Núñez Ochoa por su apoyo, asesoría, supervisión y replanteamientos del proyecto con lo que se logró enriquecer y dar la correcta dirección a esta investigación.

Al Dr. Armando Pérez Torres por sus valiosas observaciones y contribuciones que permitieron mejorar esta tesis.

Al QC, MC Carlos Landa Solís del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) por su permanente colaboración en el asesoramiento a lo largo del proyecto.

Al Laboratorio Experto® por otorgarme el financiamiento para el desarrollo de esta investigación, así como por permitirme el uso de sus instalaciones para realizar parte de la metodología experimental.

A LA MC. Erika Rosales Cruz del Laboratorio de Investigación en Hematopatología del Departamento de Morfología (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - IPN), por su asesoramiento y opiniones.

Y finalmente a todos los MVZ de las clínicas y hospitales veterinarios de la ciudad de México, así como a los propietarios de los perros, con los cuales se integraron mis grupos de investigación, sin cuya colaboración no habría podido realizarse dicho estudio.

RESUMEN

El linfosarcoma canino es una de las neoplasias con mayor incidencia en los perros, actualmente, la quimioterapia es la opción que brinda mejor respuesta y calidad de vida al paciente. La respuesta a la quimioterapia depende, en gran medida, de que no se genere una resistencia a los protocolos de tratamiento. Se han reportado respuestas desfavorables a la quimioterapia en perros que recibieron alguna terapia con esteroides previamente. Se piensa que el mecanismo es debido a la sobreexpresión de la glucoproteína-P de membrana (Gp-P), que funciona como una bomba de expulsión, favoreciendo el flujo de fármacos al exterior de la célula. El propósito de este estudio fue determinar si la administración de glucocorticoides incrementa la expresión de la Gp-P, para comprobar si los glucocorticoides se comportan como un inductor para dicha proteína, siendo un factor pronóstico de respuesta, al implementar una futura quimioterapia. Se conformaron 2 grupos, el primero, integrado por perros con inflamación crónica (n=5) y el segundo por perros con linfosarcoma (n=5), a cada animal se le administró glucocorticosteroides y se le realizó la evaluación de la expresión de la Gp-P en tres tiempos de la investigación, previo a la terapia, al término de la misma, y 5 días después. Se realizó la inmunofenotipificación de los linfocitos que expresaron la Gp-P en linfocitos T y B. En el análisis de la información no se observó una correlación entre la administración de esteroides y la sobreexpresión de la Gp-P en el grupo con inflamación. En el grupo con linfosarcoma, la diferencia promedio de linfocitos B que expresaron la Gp-P antes de la glucocorticoterapia (1,649) y al quinto día del el tratamiento (2,968) mostró un incremento estadísticamente significativo ($p=0.033$). Los linfocitos B que expresaron la Gp-P en la medición previa a la terapia (1,649) y 5 días posteriores al tratamiento (3,152) presentaron un incremento significativo ($p=0.046$). Con esto se demostró que existe una sobreexpresión de Gp-P tras la administración de glucocorticoides en los pacientes con linfosarcoma y que puede ser parte de la presentación de resistencia a diversos fármacos.

Palabras clave: Glucoproteína-P (Gp-P), resistencia a múltiples fármacos (MDR), inductor, esteroides, linfosarcoma.

SUMMARY

The canine lymphosarcoma is one of the neoplasms with the highest incidence in dogs; the chemotherapy is considered the treatment option to give the patient a best response and quality of life. The chemotherapy response depends largely to resistance that treatment protocols are generated. Have been unfavorable response to chemotherapy in dogs receiving steroid therapy previously. This mechanism may be due to overexpression of P-glycoprotein membrane (P-gp), which functions as a flow pump; promoting drug efflux out of the cell, causing a resistance to these drugs. The goal of this study was to determine whether the administration of glucocorticoids increases the expression of P-gp in order to check that glucocorticoids act as an inducer for this protein, being a prognostic factor response, for implementing a future chemotherapy. 2 groups were formed, first one consisting of dogs with chronic inflammation (n=5) and the second with lymphosarcoma (n=5), each animal received glucocorticoids and underwent evaluation of the expression of P-gp in three stages research, prior to therapy, at the end thereof, and 5 days after. Immunophenotyping of lymphocytes expressing P-gp in T and B lymphocytes was performed. In the data analysis a correlation between steroids and overexpression of P-gp in the group with inflammation is not observed. In the group with lymphosarcoma, the average difference B cells expressed P-gp before glucocorticoterapy (1,649) and the fifth day of treatment (2,968) showed a statistically significant increase ($p=0.033$), just as in B lymphocytes measurement prior to therapy (1,649) and 5 days after treatment (3,152) had a significant increase ($p=0.046$). This overexpression of P-gp it was shown after administration of glucocorticoids in patients with lymphosarcoma. This may be part of resistance to several drugs.

Keywords: P-Glucoprotein (P-gp), multidrug resistance (MDR), substrate, inducer, steroids, lymphosarcoma.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Linfosarcoma canino	1
Signos clínicos.....	1
Diagnóstico.....	4
Tratamiento.....	5
ANTECEDENTES	6
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVO	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos.....	10
HIPÓTESIS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
Diseño experimental.....	12
Procedimiento.....	12
Preparación de la muestra.....	14
Descripción de la muestra (animales).....	15
Criterios de inclusión.....	15
Criterios de exclusión.....	15
Estandarización del equipo (Citómetro de flujo).....	16
Elección de anticuerpos.....	16
Análisis de resultados.....	17
RESULTADOS	19
Discusión.....	30
Conclusiones.....	32
Abreviaturas y siglas.....	33
Referencias.....	34
Anexos.....	43

Lista de cuadros

Cuadro 1	Sustratos inhibidores e inductores de la Gp-P en humanos.	8
Cuadro 2	Configuración Laser del citómetro FACSCalibur y los detectores (filtros) para cada tipo de fluorescencia. FITC.-Isotiocianato de Fluoresceína, PE.-Ficoeritrina, APC.-Aloficocianina.	18
Cuadro 3	Anticuerpos y fluorocromos seleccionados para la determinación de la Gp-P, linfocitos T y B. (1°) Anticuerpo primario, (2°) Anticuerpo secundario, (c) Anticuerpo conjugado. FITC.-Isotiocianato de Fluoresceína, PE.- Ficoeritrina, APC.- Aloficocianina.	18
Cuadro 4	Alteraciones en el hemograma, bioquímica sanguínea y urianálisis del grupo con inflamación.	21
Cuadro 5	Linfocitos (+) a Gp-P en el grupo I (perros clínicamente sanos) sin corticoterapia.	23
Cuadro 6	Linfocitos (+) a Gp-P en el grupo II (perros con inflamación) antes, al término y 5 días posteriores a la corticoterapia.	23
Cuadro 7	Linfocitos (+) a Gp-P en el grupo III (perros con linfosarcoma) antes, al término y 5 días posteriores a la corticoterapia.	24

Lista de figuras

Figura 1	Inmunofenotipo de los perros con linfosarcoma.	20
Figura 2	Comparación del promedio de la Gp-P en el grupo con inflamación crónica vs linfosarcoma, a través de las distintas mediciones (antes, durante y posterior a la corticoterapia).	27
Figura 3	Comparación del promedio de Gp-P antes de la corticoterapia (Ac), al término de la corticoterapia (Cc) y 5 días después (Pc); en los linfocitos de los perros con inflamación.	28
Figura 4	Comparación del promedio de Gp-P antes de la corticoterapia (Ac), al término de la corticoterapia (Cc) y 5 días después (Pc); en los linfocitos de los perros con linfosarcoma.	29

Anexos

Figura 1	Porcentaje de homología entre el gen MDR-1 canino VS gen MDR-1 humano (91%).	43
-----------------	--	-----------

INTRODUCCIÓN

Linfosarcoma canino

El linfoma canino (LS) es una de las neoplasias de mayor incidencia en el perro (Rutley et al., 2007). La causa exacta se desconoce, pero se han sugerido teorías que abarcan desde predisposición genética; infecciones, en algunos casos asociada a retrovirus (Thilakaratne et al., 2010, Siedlecki et al., 2006, Suter 2005), factores carcinogénicos medioambientales y exposición a campos magnéticos de baja frecuencia producidos por aparatos electrónicos (Dhaliwal et al. 2003).

El padecimiento consiste en la presencia de linfocitos neoplásicos malignos ubicados predominantemente en el interior de linfonodos o en órganos linfocíticos como el bazo o aquellos con tejido linfocítico como el hígado. La edad de presentación puede ocurrir de los 2 a los 12 años, aunque en la mayoría de casos se presenta entre 5 y 8 años de edad, las razas más afectadas en México en orden decreciente son el Rottweiler, Cocker Spaniel, Pastor Alemán, Poodle, Schnauzer Gigante, Cobrador Dorado y Doberman, otras razas de alto riesgo son el Terrier Escocés, Basset Hound, Airedale, Chow Chow, San Bernardo, Bulldog Inglés y Beagle (Núñez et al, 2005). Es una de las neoplasias que mejor responde a la quimioterapia con los protocolos CHOP o COP (Thilakaratne et al., 2010, Álvarez 2009).

Signos clínicos

Las manifestaciones clínicas dependen de los órganos con tejido linfocítico afectados y de las dimensiones que vayan tomando. La clasificación según la presentación

anatómica en el perro puede ser multicéntrica o generalizada (80% en perros), alimentaria, mediastínica o tímica y extranodal. No importando donde se origine puede propagarse por todos los tejidos linfocíticos (Rutley et al., 2007, Thilakaratne et al., 2010).

En la presentación multicéntrica pueden encontrarse signos inespecíficos como son fiebre moderada a elevada, anorexia, deshidratación, pérdida de peso, letargia y depresión. Se presenta con linfadenomegalia generalizada (2 a 15 veces su tamaño normal), si esta linfadenomegalia obstruye vasos linfáticos puede ocasionar edema en extremidades y rostro, así como disnea.

En la presentación alimentaria, los signos clínicos están relacionados al tracto gastrointestinal como el vómito, diarrea, pérdida de peso, deshidratación, depresión, constipación y peritonitis en algunos casos (Rutley et al., 2007).

En la presentación mediastínica, los signos clínicos se relacionan más con el aparato respiratorio, como la disnea, intolerancia al ejercicio y tos. En esta presentación es donde se encuentra la mayoría de casos de hipercalcemia; que resulta con poliuria, polidipsia, anorexia, depresión, vómito, diarrea, deshidratación y arritmias cardíacas (McCaw et al., 2007).

En la presentación extranodal, al igual que en las anteriores se presentan signos inespecíficos como anorexia, pérdida de peso, letargia, poliuria, polidipsia u otros particulares dependiendo del órgano que esté afectando. En el perro se presenta principalmente en la piel y globos oculares. Si la piel se ve involucrada se denomina linfosarcoma cutáneo o micosis fungoide, es una enfermedad poco común (3-8%) y

se caracteriza por la infiltración neoplásica linfocítica de la epidermis y de estructuras anexas pudiendo manifestar lesiones como nódulos, pústulas, úlceras, prurito, despigmentación, dermatitis exfoliativa etc., y estas lesiones pueden estar localizadas en un sólo punto o generalizadas, frecuentemente se acompañan de infecciones bacterianas secundarias. En los ojos, los signos son uveítis, hemorragia de retina, infiltrado de conjuntiva, hipema, queratitis intersticial, hipopión, glaucoma, inflamación del nervio óptico y masas oculares (Rutley et al., 2007, Thilakaratne et al., 2010, McCaw et al., 2007).

El linfosarcoma esplénico o de células del manto es una neoplasia de linfocitos B, su presentación suele ser indolente mayormente, y no se produce metástasis tan comúnmente como en otros tipos de linfosarcoma. Es una neoplasia poco común (2-3%) y se caracteriza por un patrón folicular y/o difuso presentándose como una masa esplénica multifocal o extensiva.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las etapas clínicas de linfosarcoma canino en:

- I. Con participación limitada a un solo linfonodo o tejido linfocítico en un solo órgano.
- II. Con la participación de varios linfonodos en una región.
- III. Compromiso generalizado de los linfonodos.
- IV. Con compromiso generalizado de los linfonodos + compromiso del hígado y/o bazo.

- V. Con compromiso generalizado de los linfonodos + manifestaciones en la sangre y la implicación de la médula ósea y/o de otros sistemas u órganos.

Diagnóstico

Después de la anamnesis y el examen físico, los procedimientos de rutina que deben realizarse son de laboratorio y de gabinete para el diagnóstico y también para determinar la condición general del paciente, verificar si cursa con alguna otra patología ajena al linfoma, para establecer el estadio y el pronóstico del animal según la severidad y/o extensión que ha alcanzado el proceso neoplásico. Las evaluaciones de laboratorio incluyen la citología, para el diagnóstico de linfoma en conjunto con inmunofenotipificación, hemograma, bioquímica sanguínea y urianálisis. Las alteraciones de laboratorio más frecuentes son la anemia, leucocitosis o leucopenia, neutrofilia, linfocitosis o linfopenia, linfocitos neoplásicos malignos en el hemograma, hipercalcemia, incremento de ALT, FA, hiperazotemia, hiperproteinemia e hiperglobulinemia en bioquímica y cistitis en el urianálisis (Rutley et al., 2007, Thilakaratne et al., 2010).

Las pruebas de gabinete incluyen la radiografía, el ultrasonido, la resonancia magnética, la tomografía computarizada o la tomografía por emisión de positrones (PET). La biopsia contribuye al diagnóstico mediante la inmunotipificación y el tipo de presentación histopatológica, proporcionándonos más información para el pronóstico del paciente.

Tratamiento

Actualmente, la quimioterapia es la mejor opción (con o sin la extirpación quirúrgica) para mejorar la esperanza de vida. Los protocolos quimioterapéuticos no curan al paciente de este padecimiento, pero le puede brindar mayor tiempo de sobrevivencia con buena calidad de vida. (Rutley et al., 2007, Thilakaratne et al., 2010, Shankel et al., 2005, Martineau 2002). En algunos casos se recomienda la escisión quirúrgica, aquellos en donde se encuentra bien localizado como en la presentación esplénica y no se ha diseminado a otros sitios del organismo, la probabilidad de reincidencia es un factor importante a considerar.

ANTECEDENTES

La resistencia a múltiples fármacos (MDR) de las células cancerosas es un tipo de resistencia de las neoplasias. El mecanismo se caracteriza por una sobreexpresión de la glucoproteína de membrana Gp170 (Gp-P) que es una bomba de expulsión (Crouthamel et al., 2010, Ishikawa et al., 2004, Shirasaka et al., 2006, Lemaire et al., 2007, Thomas et al., 2004) que permite la salida activa de la célula de cierto tipo de fármacos, como los agentes citotóxicos que incluye a los alcaloides de la vinca (Vincristina y Vinblastina), las antraciclinas (Doxorubicina) y los taxanos. La sobreexpresión de Gp-P en la célula promueve la resistencia a estos fármacos (Modlich et al., 2005, Scheffer et al., 2000, Bachmeier et al., 2006).

Se trata de una resistencia cruzada de importantes consecuencias en la clínica. Por ejemplo, la utilización de Doxorubicina con su resistencia resultante por MDR, convierte al LS en resistente a la Vincristina (y al protocolo COP entre otros). La evidencia de MDR se realiza por determinación del número de células Gp170 positivas mediante PCR, inmunocitoquímica o inmunohistoquímica. En un estudio de 58 perros con LS se demostró que la sobreexpresión de la Gp170 antes de aplicar la quimioterapia es inversamente proporcional a la tasa de remisión y a la duración de la supervivencia (Papakonstantinou et al., 2013). Del mismo modo, en el momento de la recaída, la expresión de la Gp170 es un factor predictivo de la segunda remisión y del tiempo de supervivencia inducido (Ruiz 2002, Huang et al., 2006, Eng et al, 2010, Korzekwa et al., 2012, Tsakalozou et al., 2013).

Cabe mencionar que la Gp-P se encuentra de manera habitual en células epiteliales de la mucosa intestinal, en la membrana canalicular de los hepatocitos en hígado, en los túbulos proximales del riñón, así como en la barrera hematoencefálica y en la placenta (Crouthamel et al., 2010, Ishikawa et al., 2004). Se sugiere que esta glucoproteína interviene como una barrera protectora contra agentes citotóxicos reduciendo su acumulación intracelular (Ruiz 2002, Sánchez 2006).

En la práctica, un valor elevado de la Gp170 expresa una baja probabilidad de remisión clínica completa y de supervivencia larga (Ferreira et al., 2005, Sugimoto et al., 2011, Mealey et al., 2006, Kuteykin et al., 2010).

Se han realizado estudios del gen MDR1 responsable de la expresión de la Gp-P en humanos donde se mencionan algunos sustratos, inhibidores e inductores de la Gp-P (Cuadro 1).

Estudios realizados en cultivos *in vitro* de células cerebrales de ratas, demostraron el aumento en la expresión de la Gp-P tras administrar dexametasona, el mecanismo sugerido indica que el esteroide modula transcripcionalmente la expresión del gen MDR-1 responsable de la expresión de la Gp-P y de otras proteínas implicadas en el metabolismo de fármacos como la BRCP y el MRP-2 (Narang et al, 2008).

Cuadro 1. Sustratos, inhibidores e inductores de la Gp-P en humanos.			
Fármacos	Sustratos	Inhibidores	Inductores
Oncológicos	Actinomicina-D, daunorubicina, mitomicina-C, mitoxantrona ² , vinblastina ^{2,4} , vincristina ^{1,2} , doxorubicina, etopósido ⁴ , everolimus, imatinib, lapatinib, paclitaxel ¹ , metotrexato ³		
Antihipertensivos	Diltiazem ^{2,4} , losartan ⁵ , talinolol, aliskiren ^{1,7} , ambrisentan ¹ , carvedilol ⁵ , verapamilo ⁴	Nicardipina ^{2,5,6} , captopril ¹ , carvedilol ^{1,4} , diltiazem ^{1,5} , doxazosin ^{5,10} , felodipino, reserpina ¹	Prazosin ⁵
Anti-arrítmicos	Digoxina ^{1,2} , quinidina, verapamilo, quinidina ⁴	Amiodarona ^{2,5} , quinidina, verapamilo ^{1,2} , dronedarona, ranolazina ¹	
Antivirales	Amprenavir, indinavir, nelfinavir, ² , boceprevir, dasabuvir, fosamprenavir ⁷ , indinavir, ritonavir ¹	Indinavir, nelfinavir ^{1,2} , boceprevir, cobicistat ⁷ , lopinavir, ritonavir, saquinavir ¹ , simeprevir, telaprevir ⁷	Amprenavir, indinavir, nelfinavir ^{2,4} , fosamprenavir ⁷ , ritonavir ^{1,2,4} , saquinavir ⁴ , tipranavir ¹
Antibióticos	Eritromicina, levofloxacina, rifampina, tetraciclina ^{2,4}	Claritromicina ^{2,3} , eritromicina ^{1,2} , azitromicina ¹	Rifampina ^{1,2}
Antimicóticos	Itraconazol ^{2,4}	Itraconazol, ketoconazol ^{1,2}	Clotrimazol ⁴
Inmunosupresores	Ciclosporina ^{2,3} , tacrolimus, metotrexato ²	Ciclosporina, tacrolimus ^{1,2}	
Antidepresivos	Amitriptilina ²	Fuoxentina ²	
Neurolépticos	Fenobarbital, Carbamazepina ⁵	Clorpromazina, fenotiazina ²	Carbamazepina ¹ , fenobarbital ⁵ , fenotiazinas ⁴ , fenitoina ¹
Opioides	Morfina ⁴	Metadona ^{2,4} , meperidina, pentazocina ⁴	Morfina ⁴
Glucocorticoides	Aldosterona, cortisol ² , dexametasona ^{2,4} , metilprednisolona ²	Progesterona ^{2,4}	Dexametasona ^{2,4}
Antiácidos	Ranitidina, cimetidina ^{2,4}		
Otros	Colchicina ^{1,2,7} , loperamida, domperidona, ondasetron, apixaban ⁷ , atorvastatina ⁵ , bromocriptina ^{5,11} , dabigatran ¹ , dapagliflozin ⁷ , domperidona ⁴ , Empagliflozin, edoxaban ⁷ , estradiol ⁴ , ezetimibe ⁸ , fexofenadina ¹ , fluvastatina ⁵ , indacaterol ⁷ , Ivermectina ⁴ , loperamida ³	Dipiridamol, spirinolactona, atorvastatina ⁴ , conivaptan ¹ , fluvastatina ⁵ , linagliptina ⁷ , lovastatina ⁵ , quercitina ¹ , simvastatina ⁵ , suvorexant ⁷ , tamoxifeno ⁴ , ticagrelor, vorapaxar ⁷	Ácido retinóico ⁴ , espirolactona ⁹ , hierba de San Juan ¹

1. FDA, 2. Annese et al, 2006, 3. Marchetti et al, 2007, 4. Kim 2002, 5. Zhou et al, 2007, 6. Katoh et al, 2000, 7. MEDSAFE, 8. Oswald et al, 2006, 9. Ghanem et al, 2006, 10. Takara et al, 2009, 11. Wang et al, 2006.

JUSTIFICACIÓN

El número creciente de casos de linfosarcoma canino y la resistencia a la quimioterapia en varios de ellos, limita el tiempo de remisión y la esperanza de vida. La resistencia a fármacos por la estimulación en la expresión de la Gp-P como puede ser el caso de los glucocorticoides demanda una mayor investigación para mejorar las estrategias terapéuticas con la finalidad de obtener mayor tiempo de supervivencia con una buena calidad de vida.

OBJETIVO

Objetivo general

Evaluar la expresión de la Glucoproteína-P posterior a glucocorticoterapia en linfoma canino espontáneo.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la expresión de la glucoproteína-P en linfocitos totales, y de éstos, los que corresponden al inmunofenotipo T o B en perros sanos.
- 2) Comparar la expresión de la glucoproteína-P en linfocitos totales, y de éstos, los que corresponden al inmunofenotipo T o B en perros con inflamación crónica antes y después de glucocorticoterapia.
- 3) Comparar la expresión de la glucoproteína-P en linfocitos totales, y de éstos, los que corresponden al inmunofenotipo T o B en perros con linfoma antes y después de glucocorticoterapia.

HIPÓTESIS

La expresión de la Glucoproteína-P aumenta posterior a la glucocorticoterapia en perros con linfoma canino espontáneo.

Diseño experimental

Previo al diseño experimental se determinó la expresión de la Gp-P en perros clínicamente sanos (n=5) con la finalidad de corroborar que esta proteína se expresa de manera normal en linfocitos de pacientes sanos.

Procedimiento

Se seleccionaron 15 perros en 3 grupos:

- Grupo I. Perros clínicamente sanos (n=5).
- Grupo II (testigo). Perros con proceso inflamatorio (n=5).
- Grupo III. Perros con linfosarcoma (n=5).

Los perros de los tres grupos fueron seleccionados de clínicas y hospitales de la ciudad de México.

A los perros del grupo I se les tomó una muestra por punción con aguja fina (22 Ga) de linfonodos cervical superficial y/o poplíteo, para la determinación de la expresión de la glucoproteína-P por citometría de flujo.

A los perros del grupo II se les realizó el muestreo del linfonodo cervical superficial o poplíteo, con una aguja hipodérmica (22 Ga) en 3 momentos:

- 1) La primera muestra, antes de la corticoterapia. Para conocer la expresión de la Gp-P basal en una situación de inflamación.
- 2) La segunda muestra, al 5° día de corticoterapia. Con la finalidad de verificar si la corticoterapia causa un incremento de expresión de la Gp-P con respecto a la basal.
- 3) La tercera muestra, 5 días después de terminada la terapia. Con la finalidad de evaluar la persistencia del efecto de los glucocorticoides con respecto a la expresión de la Gp-P.

La dexametasona fue empleada a dosis de 0.25 mg/ kg /5 días.

A los animales del grupo III con linfadenomegalia se les realizó la punción con aguja fina, se prepararon frotis secados al aire y teñidos con Jorvet Dip Quick Stain™ para el diagnóstico citológico de LS. Al igual que al grupo II de inflamación, a cada animal con diagnóstico de LS se le muestreó en 3 ocasiones:

- 1) La primera muestra, antes de la corticoterapia. Para conocer la expresión de Gp-P basal en casos de linfosarcoma espontáneo.
- 2) La segunda muestra, al 5° día con corticoterapia. Con la finalidad de verificar si la corticoterapia causa un incremento de expresión de la Gp-P en las células neoplásicas con respecto a la basal.
- 3) La tercera muestra, 5 días después de terminada la terapia. Con la finalidad de evaluar la persistencia del efecto de los glucocorticoides con respecto a la expresión de Gp-P en los linfocitos.

Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de la Gp-P en los linfocitos totales, y se diferenciaron en inmunofenotipo T o B en los 3 grupos de estudio.

Preparación de la muestras

A cada muestra obtenida por aspiración con aguja fina de linfonodo se le dispuso en suspensión con solución buffer fosfato PBS (1 mL). Se conservó 0.5 mL de cada suspensión celular sin marcar con anticuerpos para posteriormente utilizarles como referencia de su auto fluorescencia en la lectura por citometría. Al resto de la muestra (0.5 mL) se le agregó 2 μ L del anticuerpo conjugado CD3/PE (ficoeritrina) más 2 μ L del anticuerpo primario Gp-P y se le incubó por 30 minutos a 4°C. Después se agregó 2 μ L del anticuerpo secundario para Gp-P marcado con FITC (isotiocinato de fluoresceína) y se incubó por 30 minutos a 4°C.

Posteriormente, la muestra se centrifugó a 1,350 x g durante 5 minutos, paso seguido se decantó el exceso del líquido y se disolvió el botón celular agitando suavemente el tubo. Una vez disuelto el botón se le agregó 2 μ L del anticuerpo primario CD21 y se incubó por 30 minutos a 4°C. Después se le adicionó 2 μ L del anticuerpo secundario para CD21 marcado con APC (aloficocianina) y se incubó durante 30 minutos a 4°C.

Por último, se centrifugó a 1,350 x g durante 5 minutos, después se decantó el exceso, se disolvió el botón celular agitando suavemente el tubo y se le agregó 900 μ L de agua bidestilada y 100 μ L de solución de lisis para preservar mejor la muestra hasta su momento de lectura en el citómetro de flujo.

Descripción de la muestra (animales)

Muestra biológica - Linfocitos obtenidos de linfonodos cervical superficial y/o poplíteo.

Edad - La edad de los animales fue de 2 a 12 años.

Género - Se aceptaron tanto hembras como machos, esterilizados.

Criterios de inclusión

- Grupo. I.- Examen clínico completo, hemograma, perfil bioquímico y urianálisis sin evidencia de alteraciones clínicas ni en los análisis.
- Grupo. II.- Diagnóstico al examen clínico completo, hemograma, perfil bioquímico y urianálisis de un proceso inflamatorio.
- Grupo. III.- Diagnóstico citológico de linfosarcoma y evaluación del hemograma, perfil bioquímico y urianálisis como complementarios.

Criterios de exclusión

- Datos incompletos.
- Incumplimiento de la terapia.
- Muerte prematura.
- Retiro del animal antes del término de la fase experimental.
- Si además de la dosis de dexametasona estipulada en el proyecto, se le administró algún fármaco inductor de los enlistados en el cuadro 1.

- Se excluyeron perros de razas puras Collie, Pastor Australiano, Pastor de Shetland, Pastor Inglés, Pastor Alemán, Border Collie y Whippet de pelo largo, por ser deficientes en la Gp-P: (Karriker et al., 2007, Binns et al., 2007, Edwards et al., 2003, Mizukami et al., 2012, Geyer et al., 2012, Mizukami et al., 2013, Kitamura et al., 2008).

Estandarización del equipo

Citómetro de flujo modelo FACSCalibur BD (Biosciences®, San José California USA). (BDFACSCalibur 2007)

Presión de fluido envolvente

4.5 PSI, con una frecuencia de la muestra de aproximadamente 6 m/segundo, y una velocidad de la muestra de 2,000 células por segundo (BDFACSCalibur 2007).

Fuente de luz y filtros ópticos

El instrumento no ha sido alterado y mantiene 2 láseres con la configuración de fábrica (Cuadro 2). (BDFACSCalibur 2007)

Elección de Anticuerpos

Se utilizó un marcador de superficie para el gen MDR-1 humano, el cual se verificó su porcentaje de homología con el gen específico del perro (Anexo 1), coincidiendo con el gen humano en un 91%. El empleo de marcadores de superficie donde los anticuerpos, actúan mediante reacción cruzada con los de otras especies, con frecuencia se ha utilizado en otros estudios. También se utilizaron los marcadores

CD3 para linfocitos T y CD21 para linfocitos B, específicos para la especie canina (Cuadro 3), (Kuteykin et al., 2010, NLM-PubMed-2014, Papakonstantinou et al., 2013, Li et al., 2013, Piedras et al., 2006).

Las muestras se almacenaron en refrigeración (4°C). Los reactivos fotosensibles se protegieron de la luz directa en el momento de almacenarse y durante su manejo. Como control negativo se utilizaron células sin teñir.

Análisis estadístico de resultados

Se realizó el análisis estadístico del número de linfocitos que expresaron la Gp-P de los perros pertenecientes al grupo II con inflamación crónica; antes, al término de la glucocorticoterapia y una semana después y de los perros del grupo III con linfosarcoma canino, antes, al término de la glucocorticoterapia y 5 días después. La lectura por citometría de flujo de cada muestra, incluyó un número mayor a 5,000 eventos por evaluación.

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante la prueba paramétrica “*t* de Student” para muestras relacionadas; previamente se corroboró que los datos presentaren un comportamiento normalizado. Para todas las pruebas se empleó el programa estadístico SPSS-20 y el programa estadístico SAS-V8. Se consideró una $p < 0.05$ como diferencia significativa.

Cuadro 2. Configuración Laser del citómetro FACSCalibur y los detectores (filtros) para cada tipo de fluorescencia.							
Laser	Detector	Fluorocromo	PMT	Filtro-SP	Filtro-BP	Filtro-LP	Voltaje
	FL-1	FITC			530/30 nm		
Azul 488 nm	FL-1				530/30 nm		15 mW
(Argón)	FL-2	PE			585/42 nm		
	FL-3					670 nm	
	FL-3					670 nm	
Rojo 635 nm	FL-4	APC			661/16 nm		10 mW
(Diodo rojo)							
FITC.- Isotiocianato de Fluoresceína, PE.- Ficoeritrina, APC.- Aloficocianina.							

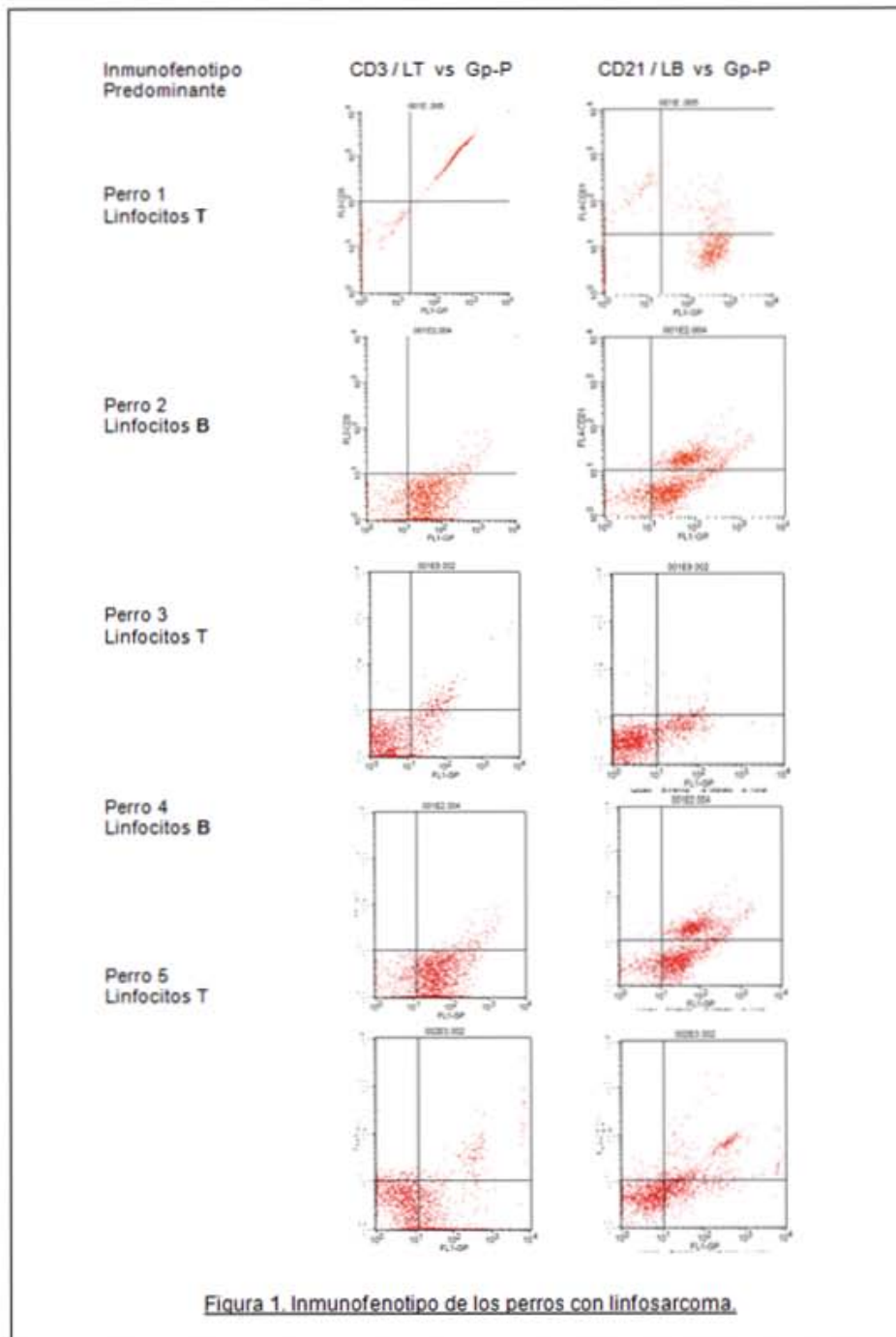
Cuadro 3. Anticuerpos y fluorocromos seleccionados para la determinación de la Gp-P, linfocitos T y B.					
Analito	Anticuerpo	Fluorocromo	Fabricante	No. Catálogo	Isotipo
Gp-P	Anti P-glycoproteín (1°)		Abcam	ab10333	IgG2a
	IgG2a (2°)	FITC	Abcam	ab79092	IgG1
CD3 (L-T)	Anti CD3 (c)	PE	Abcam	ab22268	IgG2a
CD21 (L-B)	Anti CD21 (1°)		Abcam	ab1090	IgG1
	IgG1 (2°)	APC	Abcam	ab130786	IgG
(1°) Anticuerpo primario, (2°) Anticuerpo secundario, (c) Anticuerpo conjugado. FITC.- Isotiocianato de Fluoresceína, PE.- Ficoeritrina, APC.- Aloficocianina.					

Resultados

Se evaluaron 7 perros clínicamente sanos, de los cuales se seleccionaron 5 para conformar al grupo control; así mismo se evaluaron 18 perros con la finalidad de determinar si tenían o no inflamación; de éstos se seleccionaron 5 con diagnóstico de dermatitis idiopática (2), fractura de tibia por traumatismo (1), enfermedad intestinal crónica (1) y osteoartritis (1).

De los 21 perros con linfadenomegalia, únicamente 10 tuvieron linfosarcoma, se seleccionaron a 5 para el grupo con LS (Figura 1).

Los resultados del hemograma realizado en la población experimental se muestran en el cuadro 4. Además se complementó esta información con los datos del perfil bioquímico y urianálisis, para corroborar su estado de salud; determinar si estaban sanos (grupo control) o bien para confirmar la presencia de inflamación y otras alteraciones concomitantes al diagnóstico de inflamación y linfosarcoma.



Cuadro 4. Alteraciones en el hemograma en los diferentes grupos.								
Grupo	Ht	Plaq.	Leuco.	Neut.	Linfo.	Mono.	Eosin.	Basó.
Unidad	L/L	X10 ⁹ /L	X10 ⁹ /L	X10 ⁹ /L	X10 ⁹ /L	X10 ⁹ /L	X10 ⁹ /L	X10 ⁹ /L
Valor de referencia	0.37-0.55	200-600	6.0-17.0	3.0-11.5	1.0-4.8	0.1-1.4	0.1-0.9	0-500/ μ l
SANOS								
1	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR
2	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR
3	IR	IR	IR	12.0	IR	IR	IR	IR
4	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR
5	IR	IR	IR	IR	IR	IR	1.2	IR
INFLAMACIÓN								
Dermatitis atópica	IR	IR	IR	13.7	5.0	IR	IR	IR
Dermatitis atópica	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR
Fractura de tibia	IR	IR	IR	15.2	6.0	4.2	IR	IR
Enteritis crónica	IR	IR	IR	13.6	IR	IR	IR	IR
Osteoartritis	IR	IR	IR	12.0	IR	3.0	IR	IR
LINFOSARCOMA								
1 (T)	0.29	IR	27.0	16.0	IR	IR	IR	IR
2 (B)	0.32	IR	IR	2.9	9.1	IR	IR	IR
3 (T)	0.27	IR	IR	IR	5.5	IR	1.4	IR
4 (B)	0.24	120	24.1	12.6	IR	IR	IR	IR
5 (T)	0.26	101	22.0	14.3	5.0	IR	IR	518
SA: sin alteraciones. Plaq.: Plaquetas, Leuco.: leucocitos, Neut.: neutrófilos, Linfo.: linfocitos, Mono.: monocitos, Eosin.: eosinófilos, Baso.: basófilos. IR: En intervalo de referencia.								

Expresión de la Gp-P en perros clínicamente sanos (Grupo I)

Se determinó la expresión de la Gp-P en 5 perros del grupo I, donde se obtuvo la expresión de Gp-P en el 11.8% de los linfocitos totales del perro 1, el 89% de la expresión fue de linfocitos B y 11% en los T. En el perro 2 la expresión de Gp-P fue 41.3% de linfocitos totales, de los cuales un 80% corresponden a linfocitos B y un 20% a linfocitos T. La expresión de Gp-P en los linfocitos totales en el perro 3 fue de 31.1%, con un 92% de linfocitos B y un 8% de linfocitos T. En el perro 4 la expresión de Gp-P en los linfocitos totales fue de 78.3% con 52% de linfocitos B y 48% de linfocitos T. Y en el perro 5 la expresión de Gp-P en linfocitos totales fue de 96.6% con 75% de linfocitos B y 25% de linfocitos T. (Cuadro 5)

Expresión de la Gp-P en los grupos experimentales

Los resultados obtenidos al evaluar la expresión de Gp-P en linfocitos totales; y la proporción de estos que corresponden a linfocitos T y B en las tres etapas de investigación (antes de la terapia, al 5° día de corticoterapia, y 5 días después de terminar el tratamiento) para el grupo II - con inflamación crónica, se muestran en el cuadro 6. Del mismo modo, los resultados obtenidos para el grupo III con linfosarcoma se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 5. Linfocitos (+) a Gp-P en perros clínicamente sanos sin corticoterapia. N=6500 eventos totales							
	Perro I	Perro II	Perro III	Perro IV	Perro V	\bar{X}	D.S.
Linfocitos totales Gp-P+	767	2684	2021	5089	6279	3368	2263
Linfocitos T (n / %)	84 / 11	537 / 20	162 / 8	2443 / 48	1570 / 25	959 / 28	1019
Linfocitos B (n / %)	683 / 89	2147 / 80	1859 / 92	2646 / 52	4709 / 75	2409 / 72	1474

Gp-P. Glucoproteína-P, \bar{X} . Promedio, D.S. Desviación estándar.

Cuadro 6. Linfocitos (+) a Gp-P en el grupo II (perros con inflamación) antes, al término y 5 días posteriores a la corticoterapia. N=6500 eventos totales							
Inflamación	Perro I	Perro II	Perro III	Perro IV	Perro V	\bar{X}	D.S.
Antes/ corticoterapia (linfocitos totales Gp-P+)	4745	1131	1540	5752	779	2789	2289
Linfocitos T (n / %)	2467 / 52	452 / 40	1078 / 70	2588 / 45	296 / 38	1376 / 49	1092
Linfocitos B (n / %)	2278 / 48	679 / 60	462 / 30	3164 / 55	483 / 62	1413 / 51	1237
5 días/ corticoterapia (linfocitos totales Gp-P+)	4609	1736	2587	2894	572	2480	1492
Linfocitos T (n / %)	4148 / 90	660 / 38	1086 / 42	1129 / 39	280 / 49	1461 / 59	1542
Linfocitos B (n / %)	461 / 10	1076 / 62	1501 / 58	1765 / 61	292 / 51	1019 / 41	639
5 días/ post corticoterapia (linfocitos totales Gp-P+)	3471	1573	3263	333	872	1902	1409
Linfocitos T (n / %)	2950 / 85	1101 / 70	2121 / 65	97 / 29	680 / 78	1390 / 73	1143
Linfocitos B (n / %)	521 / 15	472 / 30	1142 / 35	236 / 71	192 / 22	513 / 27	380
DIFERENCIA ENTRE:	AC VS 5 d/CC	AC VS 5 d/PC	5 d/CC VS 5/PC	Interpretación			
Linfocitos totales	0.336	0.255	0.189	Sin diferencia significativa			
Linfocitos T	0.437	0.492	0.440	Sin diferencia significativa			
Linfocitos B	0.252	0.116	0.072	Sin diferencia significativa			

Gp-P. Glucoproteína-P, \bar{X} . Promedio, D.S. Desviación estándar, d. días, AC. Antes de la corticoterapia, CC. Con corticoterapia, PC. Post corticoterapia.

Cuadro 7. Linfocitos (+) a Gp-P en el grupo III (perros con linfosarcoma) antes, al término y 5 días posteriores a la corticoterapia. N=6500 eventos totales							
Linfosarcoma	Perro I	Perro II	Perro III	Perro IV	Perro V	\bar{X}	D.S.
Antes/ corticoterapia (linfocitos totales Gp-P+)	4732	5701	4365	4840	1543	4236	1583
Linfocitos T (n / %)	3880 / 82	1824 / 32	4365 / 100	2081 / 43	787 / 51	2587 / 61	1493
Linfocitos B (n / %)	852 / 18	3877 / 68	0	2759 / 57	756 / 49	1649 / 39	1608
5 días/ corticoterapia (linfocitos totales Gp-P+)	5915	6377	3133	4701	3657	4757	1398
Linfocitos T (n / %)	2425 / 41	956 / 15	940 / 30	1880 / 40	2743 / 75	1789 / 38	827
Linfocitos B (n / %)	3490 / 59	5421 / 85	2193 / 70	2821 / 60	914 / 25	2968 / 62	1668
5 días/ post corticoterapia (linfocitos totales Gp-P+)	6201	5662	4368	3145	1809	4237	1802
Linfocitos T (n / %)	1860 / 30	566 / 10	1791 / 41	629 / 20	579 / 32	1085 / 26	677
Linfocitos B (n / %)	4341 / 70	5096 / 90	2577 / 59	2516 / 80	1230 / 68	3152 / 74	1551
DIFERENCIA ENTRE:							
	AC VS 5 d/CC	Ac VS 5 d/PC	5 d/CC VS 5/PC	Interpretación			
Linfocitos totales	0.21	0.50	0.21	Sin diferencia significativa			
Linfocitos T	0.463	0.010 *	0.169	* Diferencia significativa por disminución.			
Linfocitos B	0.033 **	0.046 **	0.228	** Diferencia significativa por incremento			
Gp-P. Glucoproteína-P, \bar{X} . Promedio, D.S. Desviación estándar, d. días, AC. Antes de la corticoterapia, CC. Con corticoterapia, PC. Post corticoterapia.							

El promedio en la expresión de la Gp-P en cada uno de los 3 grupos (clínicamente sanos, con inflamación crónica y con linfosarcoma) durante las diferentes etapas del proyecto se muestran en la figura 2. En el grupo con inflamación, se realizó una subdivisión de los linfocitos totales; en las poblaciones de linfocitos T y B (Figura 3), no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de Gp-P antes, durante y posterior a la glucocorticoterapia.

Para el grupo con linfosarcoma, los linfocitos totales que expresaron la Gp-P se subdividieron en las poblaciones de linfocitos T y B (Figura 4), al comparar los promedios antes, durante y posterior a la glucocorticoterapia se obtuvieron los siguientes resultados:

- La diferencia del promedio de linfocitos T positivos a Gp-P antes de la glucocorticoterapia y 5 días posteriores al término la terapia (LT/AC vs LT/PC) fue de $p=0.010$; lo que representa una diferencia estadísticamente significativa entre el valor basal (AC) y el valor final (PC) el cual fue en decremento para la población de linfocitos T.
- En el caso de los linfocitos B positivos a Gp-P, en la comparación realizada entre el promedio antes de la glucocorticoterapia y al finalizar el 5° día de la terapia (LB/AC vs LB/CC) la diferencia fue de $p=0.033$; concluyendo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el valor basal de Gp-P y al término del tratamiento, comprobando que tras la administración del esteroide se incrementó el valor de la proteína.

- Al comparar el promedio de linfocitos B positivos a Gp-P antes de la glucocorticoterapia con el de 5 días posteriores al término de la terapia (LB/AC vs LB/PC) la diferencia obtenida fue de $p=0.046$; significando que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el valor basal de Gp-P y el valor de la misma 5 días posteriores de terminada la terapia. Del mismo modo que en la comparación (LB/AC vs LB/CC) se demuestra que el tratamiento con esteroide eleva el valor de la Gp-P aún tras suspenderse su administración por una semana.

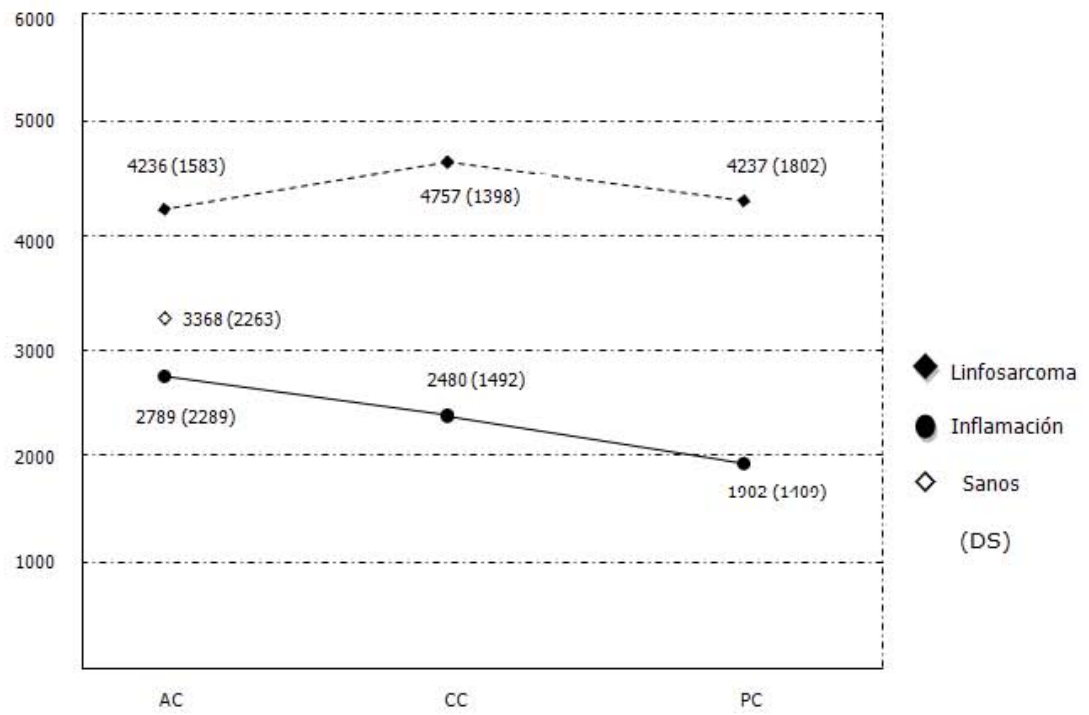


Figura 2. Comparación del promedio de Gp-P antes de la corticoterapia (AC), al término de la corticoterapia (CC) y 5 días después (PC); en los 3 grupos de investigación.

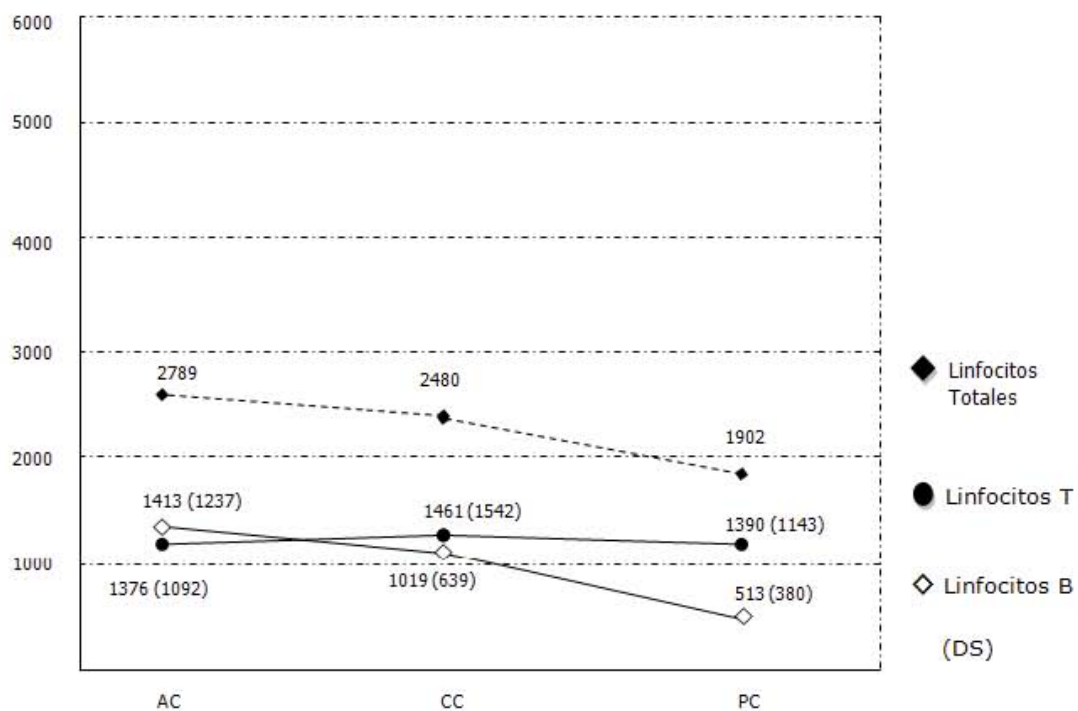


Figura 3. Comparación del promedio de Gp-P antes de la corticoterapia (AC), al término de la corticoterapia (CC) y 5 días después (PC); en los linfocitos de los perros con inflamación.

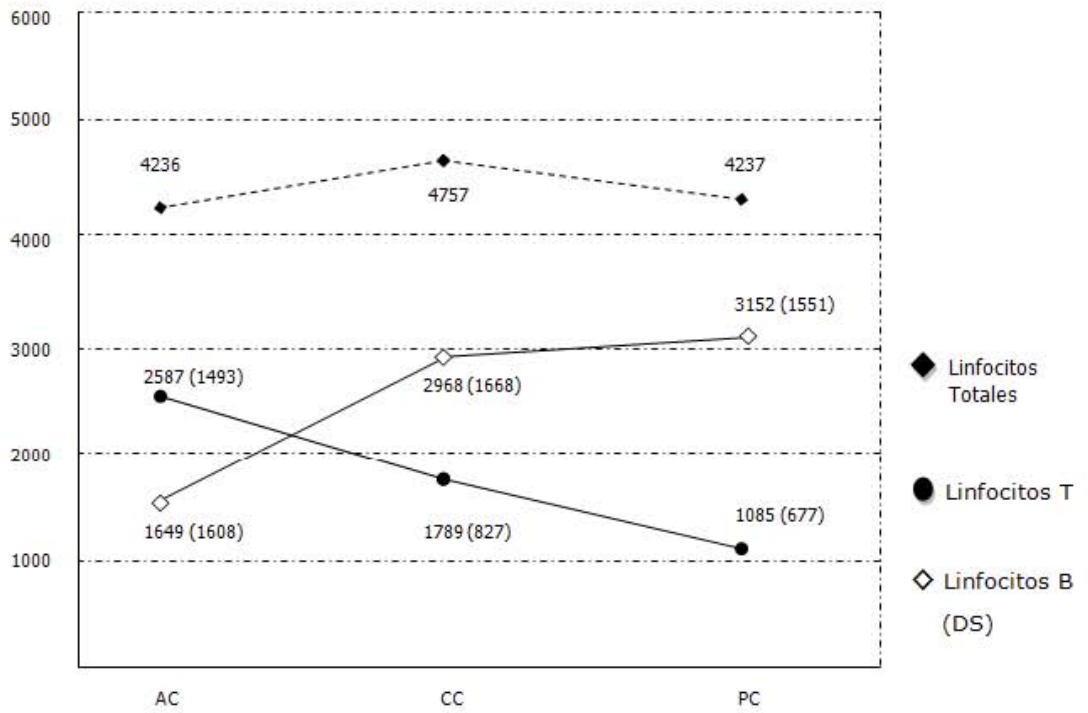


Figura 4. Comparación del promedio de Gp-P antes de la corticoterapia (AC), al término de la corticoterapia (CC) y 5 días después (PC); en los linfocitos de los perros con linfosarcoma.

Discusión

El grupo control mostró la expresión de la glucoproteína-P en linfocitos de perros sanos, que coincide con lo reportado en hepatocitos, células epiteliales renales, enterocitos, células pancreáticas, células de la corteza adrenal, células de la barrera hematoencefálica y células de tejido linfocítico. (Crouthamel et al, 2010) (Leonessa et al, 2003).

La sobreexpresión de la Gp-P después de administrar terapia con esteroides se ha reportado en estudios de cáncer de mama en humanos (Leonessa et al, 2003, Choi 2005) donde se mencionan como ejemplos de inductores para esta proteína a la aldosterona, corticosterona, cortisol y dexametasona. En estudios de cardiología clínica en humanos (Rodríguez I, et al, 1999, Wessler D, et al, 2013) se mencionan a los esteroides aldosterona y dexametasona como inductores para la Gp-P. En estudios realizados en ratas (Yumoto R, et al, 2001) se midió la Gp-P con un pretratamiento de dexametasona, y se observó que el esteroide modificaba la expresión de la proteína en cuestión. En estudios de resistencia a la quimioterapia en humanos (Lehne 2000) donde se citan al cortisol y a la aldosterona como inductores de la Gp-P; en estudios sobre desarrollo de fármacos (Fortuna A, et al, 2011), realizan pruebas *in vivo* e *in vitro* y reportan como inductores de la Gp-P a la dexametasona y metilprednisolona. Esto representa una nueva línea de investigación en el caso del linfoma canino, pues los glucocorticoides están incluidos en varios protocolos oncológicos y no se sabe si este elemento repercute al final con una pronta resistencia

a la quimioterapia. Se requieren estudios sobre el impacto en la evolución de linfosarcoma en las diferentes presentaciones morfológicas e inmunofenotípicas.

En el grupo 3 la expresión de la Gp-P posterior a la glucocorticoterapia fue superior en los linfocitos B en comparación con los T; similar a lo que sucede con los linfocitos B en la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), donde se sugiere que la Gp-P tiene un efecto protector sobre los linfocitos de B-CLL confiriéndoles una resistencia a la apoptosis (Jamroziak et al, 2004). O como ocurre con la CD200 que es una glucoproteína de membrana al igual que la Gp-P, la cual suprime la respuesta inmune antineoplásica en un modelo animal de B-CLL, y se ha estudiado su expresión en trastornos linfoproliferativos de células B como la B-CLL, linfosarcoma linfocítico de células pequeñas, la leucemia de células pilosas y en células inmunorreactivas para esta proteína en el linfoma tipo Hodgkin, esta glucoproteína también se expresa en un subconjunto de células T (Dorfman et al, 2010).

Los linfocitos T neoplásicos aparentemente no incrementan su producción de la Gp-P después de la corticoterapia, es posible que su disminución numérica causada por el fármaco tenga un efecto negativo al tener un efecto linfofagocítico y de disminución de la blastogénesis de los linfocitos T (Rev Cub Farm 2011).

La dificultad para la recolección de muestras se debió a que en el caso de los perros con linfosarcoma, no todos los propietarios accedieron al tratamiento con glucocorticoides, y algunos optaron por retirar al paciente del proyecto o bien por la eutanasia. De los perros con inflamación se retiraron aquellos que no respetaron los protocolos de tratamiento o no regresaron al muestreo posterior para ser evaluados.

Conclusiones

El tratamiento con dexametasona en los perros con linfosarcoma produce un aumento en la expresión de la Gp-P. En animales con inflamación crónica no parece producir inducción de la Gp-P en linfocitos B ni T normales. Esto permite pensar que la expresión de la Gp-P se regula cuando menos en parte, por la administración de dexametasona en perros con linfosarcoma.

El incremento de la expresión de la Gp-P en los casos de linfosarcoma fue mayor en la población de linfocitos B. Resta definir si en caso de linfosarcoma con predominio T, los linfocitos B son normales o también son neoplásicos, eso explicaría el incremento de la expresión de la Gp-P en prácticamente todos los casos de linfosarcoma en esta estirpe celular.

La administración de esteroides antes de la quimioterapia en pacientes con linfosarcoma, puede ser un factor en el desarrollo de resistencia a fármacos y afectar la respuesta a los protocolos quimioterapéuticos.

Se requiere profundizar este estudio en animales con linfosarcoma de linfocitos T y también en los diferentes protocolos en donde se emplean sustratos de la Gp-P.

Abreviaturas y siglas

ALT – Alanina aminotransferasa.

APC – Aloficocianina.

B-CLL – Leucemia linfocítica crónica de células B.

FA – Fosfatasa alcalina.

FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting.

FITC – Isotiocianato de fluoresceína.

FSC – Forward scatter.

Gp-P – Glucoproteína-P

GP-170 – Glucoproteína-P (170 kDa).

LS – Linfosarcoma canino.

MDR – Resistencia a múltiples fármacos.

OMS – Organización Mundial de la Salud.

PAF – Punción con aguja fina.

PE – Ficoeritrina.

PET – Tomografía por emisión de positrones.

SSC – Side scatter.

Referencias

ÁLVAREZ BFJ. ABURTO FE. ARISTI UG. CHÁVEZ GG. Histological and immunophenotypic study of canine lymphoma in the center of Mexico. *Veterinaria México* 2009; 40:142-143.

ANNESE V. VALVANO MR. PALMIERI O. LATIANO A. et al, Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2006 June 21; 12(23): 3637.

BACHMEIER CJ. TRICKLER WJ. MILLER DW. Comparison Of Drug Efflux Transport Kinetics In Various Blood-Brain Barrier Models. *Drug Metabolism And Disposition* 6, 2006;34:998-999.

BECTON DICKINSON. FACSCalibur Instructions For Use, For In Vitro Diagnostic Use. bdbiosciences.com, Part No. 643271 Rev. A, 2007:14,18-20.

BINNS M. Screening genetic en perros. *Veterinary Focus* 2, 2007;17:19,21-22.

CHOI CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International* 2005:1,3.

CROUTHAMEL MH. WU D. YANG Z. RODNEY JY. A Novel MDR1 GT1292-3TG (Cys431Leu) Genetic Variation and Its Effect on P-glycoprotein Biologic Functions. *The AAPS Journal* 4, 2010;12:548-549.

DHALIWAL RS. KITCHEL BE. MESSIC JB. Canine Lymphosarcoma: Clinical features. *Vet Learn* 2003; 25:572-574.

DORFMAN MD. SHAHSAFAEI A. CD200 (OX-2 Membrane Glycoprotein) Expression in B Cell-Derived Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2010;134:726,730,732.

EDWARDS G. Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity?. *Filaria Journal* 2, 2003;3-4.

ENG KT. BERDIS AJ. A Novel Non-Natural Nucleoside that Influences P-glycoprotein Activity and Mediates Drug Resistance. *NHI Biochemistry* 8, 2010;49:1641-1642.

FERREIRA MJU. GYEMANT N. MADUREIRA AM. Molnar J. Inhibition of P-glycoprotein Transport Activity in a Resistant Mouse Lymphoma Cell Line by Diterpenic Lactones. *Anticancer Research* 2005;25:3259,3261.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. U.S. Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm080499.htm>

FORTUNA A. ALVES G. FALCAO A. In vitro and In vivo Relevance of the P-glycoprotein Probe Substrates in Drug Discovery and Development: Focus on Rhodamine 123, Digoxin and Talinolol. *Bioequivalence & Bioavailability* 2011:1-2.

GEYER J. JANKO C. Treatment of MDR1 Mutant Dogs with Macrocylic Lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2012;13:970-971.

GHANEM CI. GOMEZ PC. ARANA MC. PERASSOLO M. et al, Induction of rat intestinal P-glycoprotein by spironolactone and its effect on absorption of orally administered digoxin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318(3):1146-52.

HUANG Y. OKOCHI H. MAY BCH. et al. Quinacrine Is Mainly Metabolized To Mono-Desethyl Quinacrine By CYP3A4/5 And Its Brain Accumulation Is Limited By P-Glycoprotein. *Drug Metabolism And Disposition* 7, 2006;34:1136-1137.

ISHIKAWA T. ONISHI Y. HIRANO H. OSUMI K. et al. Pharmacogenomics of Drug Transporters: A New Approach to Functional Analysis of the Genetic Polymorphisms of ABCB1 (P-Glycoprotein/MDR1). *Biol. Pharm. Bull.* 7, 2004;27:941.

JAMROZIAK K. SMOLEWSKI P. CEBULA B. SZMIGIELSKA-KAPLON A. et al, Relation of P-glycoprotein expression with spontaneous in vitro apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 2004;51(3):181-182.

KARRIKER M. Predisposición genética a reacciones adversas medicamentosas en perros. *Veterinary Focus* 2, 2007;17:14,16.

KATOH M. NAKAJIMA M. YAMAZAKI H. YOKOI T. Inhibitory potencies of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists to P-glycoprotein-mediated transport: comparison with the effects on CYP3A4. *Pharm Res.* 2000;17(10):1189-97.

KIM RB. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug metabolism reviews* 2002;34:47–54. [PMID:11996011].

KITAMURA. et al. Modest Effect of Impaired P-glycoprotein on the Plasma Concentrations of Fexofenadine, Quinidine, and Loperamide following Oral Administration in Collies. *Drug Metabolism And Disposition* 5, 2008;36:807-808.

KORZEKWA KR. NAGAR S. TUCKER J. et al. Models to Predict Unbound Intracellular Drug Concentrations in the Presence of Transporters. *Drug Metabolism And Disposition* 5, 2012;40:865-866.

KUTEYKIN TK. TORTÓS CL. AMBROZIAK C. LÖSCHER W. Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. *British Journal of Pharmacology* 2010;160:1453-1454.

LEHNE G. P-glycoprotein as a Drug Target in the Treatment of Multidrug Resistant Cancer. *Current Drug Targets* 1, 2000:87-88.

LEMAIRE S. BAMBEKE FV. MINGEOT MP. et al. Modulation of the Cellular Accumulation and Intracellular Activity of Daptomycin towards Phagocytized *Staphylococcus aureus* by the P-Glycoprotein (MDR1) Efflux Transporter in Human THP-1 Macrophages and Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 8, 2007:51;2748.

LEONESSA F. CLARKE R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2003; 10:45-46.

LI J. WANG Y. HIDALGO IJ. Kinetic Analysis of Human and Canine P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport in MDR1–MDCK Cell Model: Approaches to Reduce False-

Negative Substrate Classification. Journal Of Pharmaceutical Sciences 9, 2013;102:3437,3442.

MARCHETTI S et al. Concise review: clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDRI, P-glycoprotein). Oncologist. 2007;12(8):927–41. [PMID: 17766652].

MARTINEAU M. Multicentric canine lymphoma in a 12-year-old keeshond: chemotherapy options. Can Vet J 2002;43:709-710.

MCCAW DL. CHAN AS. STEGNER AL. MOONEY B. et al. Proteomics of Canine Lymphoma Identifies Potential Cancer - Specific Protein Markers 2007;2496,2499.

MEALEY LK. Farmacogenética. Vet. Clin. Small Anim. 5, 2006;36:961-962.

MIZUKAMI K. CHANG SC. YABUKI A. KAWAMICHI T. et al. Rapid genotyping assays for the 4–base pair deletion of canine *MDR1/ABCB1* gene and low frequency of the mutant allele in Border Collie dogs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 1, 2012;24:127-128.

MIZUKAMI K. YABUKI A. CHANG SK. et al. High Frequency of a Single Nucleotide Substitution (c.-6-180T>G) of the Canine *MDR1/ABCB1* Gene Associated with Phenobarbital-Resistant Idiopathic Epilepsy in Border Collie Dogs. Hindawi Publishing Corporation, Disease Markers, 6, 2013;35:669-670.

MODLICH U. KUSTIKOVA OS. SCHMIDT M. et al. Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (*MDR1*) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. Blood 11, 2005;105:4235.

NARANG VS. FRAGA C. WATERS CM. Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2008,295;2:440-450.

New Zealand Medicines And Medical Devices Safety Authority (MEDSAFE). A business unit of the ministry of health. Disponible en: <http://www.medsafe.govt.nz/searchResults.asp?q=P-GLLYCOPROTEIN>.

NÚÑEZ OL. Linfosarcoma en perros. En: MUCHA CJ, SORRIBAS CE. PELLEGRINO FC. EDITORES. Consulta rápida en la clínica diaria. Argentina: Editorial Intermédica. 2005: 649-652.

OSWALD S. HAENISCH S. FRICKE C. SUDHOP T. et al. Intestinal expression of P-glycoprotein (ABCB1), multidrug resistance associated protein 2 (ABCC2), and uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 predicts the disposition and modulates the effects of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79(3):206-17.

PAPAKONSTANTINOUS S. BERZINA I. LAWLOR A. O'NEILL EJ. O'BRIEN PJ. Rapid, effective and user-friendly immunophenotyping of canine lymphoma using a personal flow cytometer. *Irish Veterinary Journal* 6, 2013;66:3-4.

PIEDRAS J. Citometría de flujo en el diagnóstico y clasificación de padecimientos hematológicos: leucemias agudas, síndromes linfoproliferativos crónicos y glicoproteínas plaquetarias. *Revista de Hematología* 2, 2006;7:54.

PubMed US National Library of Medicine - National Institutes of Health.
<http://www.PubMed.gov>, consultado el 02 Febrero 2014.

REVISTA CUBANA DE FARMACIA. 2011,45;2:313-317.

RODRIGUES I. ABERNETHY RD. WOOSLEY LR. P-Glycoprotein in Clinical Cardiology.
American Heart Association 1999:472-473.

RUIZ GMJ. SOUVIRON RA. MARTÍNEZ MA. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. Anales de Medicina Interna 9, 2002:19;477,479-480,482.

RUTLEY M. MAC DONALD V. Managing the canine lymphosarcoma patient in general practice. CVJ 2007;48:977-978.

SÁNCHEZ SP. BENÍTEZ BL. Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. Cancerología 1, 2006:189,192-193.

SCHEFFER GL. KOOL M. HEIJN M. et al. Specific Detection of Multidrug Resistance Proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-Glycoprotein with a Panel of Monoclonal Antibodies. Cancer Research 60, 2000;5269-5270.

SHANKEL CA. Choanal lymphosarcoma in a 7-year-old golden retriever: Diagnosis and treatment. Can Vet J 2005;46:167-169.

SHIRASAKA Y. OMISHI Y. SAKURAI A. et al. Evaluation of Human P-Glycoprotein (MDR1/ABCB1) ATPase Activity Assay Method by Comparing with in Vitro Transport

Measurements: Michaelis–Menten Kinetic Analysis to Estimate the Affinity of P-Glycoprotein to Drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 12, 2006;29:2465.

SIEDLECKI CT. KASS PH. JAKUBIAK MJ. DANK G. LYONS J. KENT MS. Evaluation of an actinomycin-D-containing combination chemotherapy protocol with extended maintenance therapy for canine lymphoma. *Can Vet J* 2006;47:52-53.

SUGIMOTO H. HIRABAYASHI H. KIMURA Y. FURUTA A. et al. Quantitative Investigation of the Impact of P-Glycoprotein Inhibition on Drug Transport across Blood-Brain Barrier in Rats. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1, 2011;39:8-9.

SUTER SE. CHEIN MB. VON MESSLING V. et al. In vitro Canine Distemper Virus Infection of Canine Lymphoid Cells: A Prelude to Oncolytic Therapy for Lymphoma. *Clinical Cancer Research* 2005;11:1579-1580.

TAKARA K. SAKAEDA T. KAKUMOTO M. TANIGAWARA Y. et al, Effects of alpha-adrenoceptor antagonist doxazosin on MDR1-mediated multidrug resistance and transcellular transport. *Oncol Res.* 2009;17(11-12):527-33.

THILAKARATNE DN. MAYER MN. MAC DONALD V. JACKSON ML. et al. Clonality and phenotyping of canine lymphomas before chemotherapy and during remission using polymerase chain reaction (PCR) on lymph node cytologic smears and peripheral blood. *CVJ* 2010;51:79-81.

THOMAS J. WANG L. CLARK RE. PIRMOHAMED M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 12, 2004;104:3739,3744.

TSAKALOZOU E. ADANE ED. KUO EL. et al. The Effect of Breast Cancer Resistance Protein, Multidrug Resistant Protein 1, and Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B3 on the Antitumor Efficacy of the Lipophilic Camptothecin 7-t-Butyldimethylsilyl-10-Hydroxycamptothecin (AR-67) In Vitros. *Drug Metab Dispos* 2013;41:1404–1405.

WANG H. WORKMAN G. CHEN S. BARKER TH. et al, Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC/osteonectin/BM-40) binds to fibrinogen fragments D and E, but not to native fibrinogen. *Matrix Biol.* 2006;25(1):20-6.

WESSLER DF. GRIP LT. MENDELL J. GIUGLIANO PR. The P-Glycoprotein Transport system and Cardiovascular Drugs. *Journal of the American College of Cardiology* 25, 2013;61;2496.

YUMOTO R. MURAKAMI T. SANEMASA M. NASU R. et al. Pharmacokinetic interaction of cytochrome P450 3A-Related compounds with Rhodamine 123, a P-Glycoprotein substrate, in rats pretreated with dexamethasone. *Drug Metabolism & Disposition* 2, 2001;29;145-147.

ZHOU SF. XUE CC. YU XQ. LI C. WANG G. Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2007;29(6):687-710. [PMID 18043468].

Anexos

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
multidrug resistance protein 1 (Canis lupus familiaris)	2638	2638	100%	0.0	100%
multidrug resistance protein 1 (Canis lupus familiaris)	2637	2637	100%	0.0	99%
P-glycoprotein (Canis lupus familiaris)	2635	2635	100%	0.0	99%
his-tagged-multidrug resistance glycoprotein MDR1 (synthetic construct)	2632	2632	99%	0.0	99%
multidrug resistance p-glycoprotein (Canis lupus familiaris)	2628	2628	100%	0.0	99%
multidrug resistance protein 1 (Canis lupus familiaris) >gb AAC02113.1 multidrug resistance p-glycoprotein (Canis lupus familiaris)	2591	2591	100%	0.0	99%
PREDICTED: multidrug resistance protein 1 (Dobsonus rosmanus diversus)	2499	2499	100%	0.0	95%
PREDICTED: multidrug resistance protein 1-like (Alluropoda melanoleuca)	2476	2476	100%	0.0	95%
multidrug resistance protein 1 (Felis catus) >gb AD477532.1 ATP-binding cassette carrier B1 (Felis catus)	2451	2451	100%	0.0	94%
hypothetical protein PANDA_001851 (Alluropoda melanoleuca)	2434	2434	96%	0.0	96%
PREDICTED: multidrug resistance protein 1 (Pongo abelli)	2380	2380	100%	0.0	91%
PREDICTED: multidrug resistance protein 1 isoform 8 (Pan troglodytes)	2372	2372	100%	0.0	91%
P-glycoprotein, partial (Homo sapiens) >gb AAW82430.1 ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (Homo sapiens) =emb CAL38230.1 hypothetical pr	2371	2371	100%	0.0	91%
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (Homo sapiens)	2371	2371	100%	0.0	91%
multidrug resistance protein 1 (Homo sapiens) >gi P08183.3 MDR1_HUMAN RefName: Full=Multidrug resistance protein 1; AltName: Full=ATP-binding cassette sub-fa	2370	2370	100%	0.0	91%
PREDICTED: multidrug resistance protein 1 (Papio anubis)	2370	2370	100%	0.0	91%
multidrug resistance p-glycoprotein (Macaca fascicularis)	2370	2370	100%	0.0	90%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: multidrug resistance protein 1 (Pan paniscus)	2370	2370	100%	0.0	91%
hypothetical protein EGM_12800 (Macaca fascicularis)	2369	2369	100%	0.0	90%
unnamed protein product (Homo sapiens)	2369	2369	100%	0.0	91%

Figura 1. Porcentaje de homología entre el gen MDR-1 canino VS el gen MDR-1 humano.