

# LA GLICOPROTEINA-P COME MARKER DELLA RESISTENZA MULTIPLA AI FARMACI NELLE NEOPLASIE SPONTANEE DEL CANE

CLAUDIO PETTERINO, DIANA BERTONCELLO, ENRICA ROSSETTI,  
VALENTINA ZAPPULLI, MASSIMO CASTAGNARO

*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria  
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova - AGRIPOLIS, Legnaro (PD)*

## Riassunto

La resistenza multipla ai farmaci (MDR) rappresenta la principale causa di fallimento della chemioterapia delle neoplasie. Il fenotipo classico della MDR è caratterizzato da una ridotta capacità ad accumulare farmaci in conseguenza dell'attività di proteine cellulari transmembranarie funzionanti da pompe regolanti l'efflusso del farmaco e dotate di un'ampia specificità per i substrati. L'MDR classica è determinata da una glicoproteina P (Pgp) transmembranaria o p170. La Pgp gioca inoltre un ruolo importante nella regolazione dei flussi transmembranari nei tessuti normali in condizioni fisiologiche. La sua maggior espressione nelle cellule tumorali induce l'acquisizione di una resistenza ad un'ampia varietà di farmaci antineoplastici e a molti altri farmaci citotossici. La Pgp è stata ampiamente studiata nelle neoplasie umane mentre esistono pochi riferimenti scientifici specifici per i tumori spontanei del cane a parte il mastocitoma cutaneo, il linfoma, l'osteosarcoma e i tumori della ghiandola mammaria. La rilevanza clinica della Pgp è di notevole interesse scientifico poiché può rappresentare un importante fattore prognostico e un indicatore per la risposta alla chemioterapia nei pazienti oncologici animali.

## Summary

*The multidrug resistance (MDR) phenotype is the major cause of failure of cancer chemotherapy. The classical MDR phenotype is characterized by a reduced ability to accumulate drugs, due to activity of an energy dependent transmembrane, drug efflux pump with broad substrate specificity. The classical MDR is due to a transmembrane glycoprotein P (Pgp) or p170. The Pgp plays a pivotal role in the regulation of transmembrane transport in normal tissues as transmembrane transport but it's overexpressed in human tumours as well as in canine tumours. Overexpression of Pgp induce cancer cells to become resistant to a variety of anticancer drugs and many other cytotoxic drugs. Pgp expression was fully studied in human cancer while there are few reports in spontaneous canine tumours apart for cutaneous mast cell tumours, lymphoma, osteosarcoma and mammary gland tumours. The clinical relevance of Pgp is of great research interest because it may represent a prognostic factor and a marker for the response to chemotherapy in oncologic animal patients.*

## INTRODUZIONE

La resistenza multipla ai farmaci o MDR (Multi Drug Resistance) è una delle principali cause del fallimento della chemioterapia nei pazienti oncologici. Questo tipo di resistenza può essere essenzialmente di due tipi: intrinseca o acquisita. Le neoplasie spontanee dotate di resistenza intrinseca rispondono scarsamente già ai primi trattamenti antineoplastici. Nella MDR acquisita dopo un'iniziale ri-

sposta positiva alla chemioterapia subentra una resistenza ai farmaci antineoplastici determinando una conseguente evoluzione della patologia neoplastica. Il denominatore comune in questi due scenari è rappresentato dalla refrattarietà delle cellule neoplastiche ai farmaci antineoplastici. Il termine MDR identifica un fenomeno di resistenza simultanea ad agenti multipli che differiscono in struttura, ma non necessariamente nella funzione, senza però identificare con essa un particolare meccanismo funzionale. Esistono differenti meccanismi molecolari associati alla MDR: 1) l'aumentato efflusso di farmaco dall'ambiente intracellulare versus l'ambiente extracellulare, 2) l'alterazione dei target molecolari dei farmaci, 3) l'aumentata detossificazione intracellulare e 4) la sovraespressione della lung resi-

stance-related protein (LRP). L'**aumentato efflusso di farmaco** è mediato da proteine trasportatrici sovraesprese nelle cellule neoplastiche<sup>1</sup>. Le principali proteine coinvolte in questo meccanismo sono la glicoproteina-P (Pgp) e la proteina associata alla resistenza multipla ai farmaci o MRP1 (Multi Resistance Associated Protein1)<sup>2-4</sup>, e la più recente BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)<sup>5</sup>. Quest'ultima rappresenta un trasportatore di membrana ATP-dipendente, appartenente alla famiglia della *ABC-binding cassette* che deve organizzarsi in dimero o multimerico per divenire unità funzionante<sup>6</sup>. Attualmente non sono disponibili studi relativi alla sua espressione e al suo meccanismo d'azione nelle neoplasie animali. La MRP1 rappresenta una proteina di membrana codificata dal gene MRP1, del peso molecolare di 190 kDa e composta di 1531 aminoacidi che si localizza a livello di membrana cellulare, reticolo endoplasmatico e nelle vescicole che derivano dal reticolo dell'apparato del Golgi. Agisce con una duplice modalità ovvero riducendo l'accumulo di farmaco a livello intracellulare o promuovendone il sequestro. La sua funzione dipende dalla presenza di ATP<sup>7</sup>. Anche la Pgp rappresenta una proteina transmembranaria ATP-dipendente con funzioni analoghe alle precedenti sulla quale ci soffermeremo dettagliatamente nei paragrafi successivi. Fenomeni di MDR sono stati associati all'**alterazione dei target molecolari dei farmaci** in caso di diminuzione del contenuto o dell'attività della topoisomerasi II  $\alpha$ <sup>8</sup>, enzima necessario per la replicazione del DNA. Un altro meccanismo di MDR è stato associato ad un'**aumentata detossificazione intracellulare** dei farmaci ad opera di enzimi intracellulari appartenenti al sistema del glutathione ridotto. In questo caso la resistenza acquisita è correlata ad un aumento del contenuto di GSH, e/o ad un'aumentata attività della GSH S-transferasi<sup>9</sup>. La **sovraespressione della lung resistance-related protein** (LRP) è stata ipotizzata come una possibile causa determinante il sequestro del farmaco all'interno di vescicole intracellulari<sup>1,8</sup>. È stata osservata frequentemente nel carcinoma mammario della donna<sup>10</sup> ma non sono disponibili

attualmente dati relativi alla sua espressione nelle neoplasie spontanee degli animali domestici.

Nel caso in cui il meccanismo funzionale di resistenza venga identificato viene specificato da un prefisso come nel caso della Pgp-MDR o della topo II $\alpha$ -MDR (Tab. 1). Sono stati inoltre identificati meccanismi correlati all'alterazione dei fenomeni di apoptosi cellulare come responsabili di resistenza ai trattamenti chemioterapici e in tal caso si parla di apoptosi-MDR<sup>8</sup>. Per MDR-clinica si intende infine la resistenza a farmaci diversi causata da molteplici fattori<sup>8</sup>. In tabella 1 vengono riportati sinteticamente i termini più comunemente utilizzati per indicare le forme di MDR.

## LA GLICOPROTEINA P

L'opinione scientifica identifica quale principale causa di chemioresistenza delle cellule tumorali l'aumentata espressione della Pgp. La Pgp è una proteina transmembranaria appartenente all'ampio gruppo di proteine trasportatrici della famiglia ABC (ATP Binding Cassette),<sup>11, 12</sup> conferisce resistenza alle cellule di mammiferi agendo come pompa di efflusso-energia dipendente (ATP-dipendente)<sup>13, 14</sup> e mantenendo i livelli di farmaco intracellulari relativamente bassi. Nonostante sia stata osservata un'elevata omologia (superiore al 70%) nelle sequenze amminoacidiche delle varie proteine, i geni che codificano questo gruppo di proteine sono stati suddivisi in due differenti classi<sup>1</sup>. Nella classe I sono stati inseriti i prodotti del gene umano MDR1, dei geni MDR3 (o *mdr1a*) e *mdr1* (o *mdr1b*) del topo, dei geni *pgp1* e *pgp2* dell'hamster e dei geni *pgp1* e *pgp2* (o *mdr1b*) del ratto<sup>1</sup>. Nella classe II sono state inserite le glicoproteine-P non trasportatrici di farmaci, come i prodotti del gene umano MDR2/3, del gene *mdr2* del topo, del *pgp3* dell'hamster, e dei geni *mdr2/mdr3* del ratto. Nei mammiferi le glicoproteine-P sono singole catene proteiche costituite da 1280 aminoacidi. La sequenza amminoacidica primaria descrive una proteina con 12 domini transmembranari in due metà omolo-

**Tabella 1**  
**Termini e meccanismi associati alle varie forme di MDR (Lehnert et al., 1996, modificato)**

Termini	Meccanismi	Caratteristiche
Pgp-MDR	Sovraespressione MDR1/Pgp.	Resistenza a farmaci che differiscono in struttura e funzione; ridotto accumulo di farmaco intracellulare per aumentato efflusso.
MRD-MDR	Sovraespressione di MRP.	Fenotipo simile a quanto descritto per la Pgp-MDR ma con una minor resistenza ai taxani.
Topo II $\alpha$ -MDR	Diminuito contenuto/attività di Topoisomerasi II $\alpha$ .	
GSH-MDR	Aumentato livello di GSH e/o aumentata attività di GSH S-transferasi.	Resistenza al melphalan, ciclofosfamide, clorambucile, BCNU, tiotepa, cisplatino, doxorubicina. Aumentata attività del metabolismo di fase II dei farmaci.
Apoptosi-MDR	Inibizione dell'apoptosi; disfunzioni dei geni coinvolti nei fenomeni di apoptosi.	Resistenza alla maggior parte (degli agenti citotossici).
MDR clinica	Multifattoriale	Resistenza clinica multipla ai farmaci citotossici che differiscono per struttura molecolare e meccanismo d'azione.

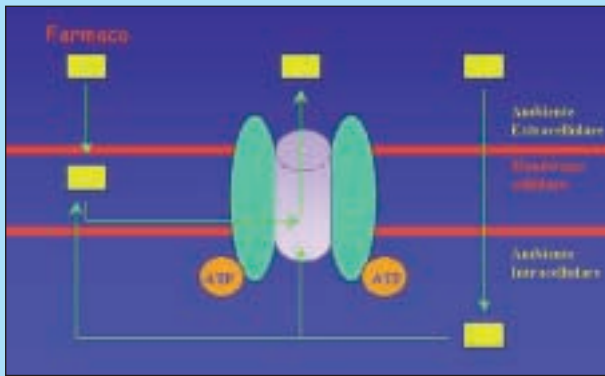


FIGURA 1 - Schema del meccanismo d'azione della Pgp (Gottesman e Pastan, 1993, modificato).

**Tabella 2**  
Molecole per le quali è stata dimostrata l'azione della Pgp  
(Ambdukar et al., 1999, modificato)

Classe	Farmaci
Farmaci antineoplastici	Vincristina
	Vinblastina
	Doxorubicina
	Daunorubicina
	Epirubicina
	Etoposide
	Teniposide
	Paclitaxel
	Actinomicina D
	Topotecan
	Mitramicina
	Mitomicina C
Altri agenti citotossici	Colchicina
	Emetina
	Bromuro d'etidio
	Puromicina
Peptidi lineari e ciclici	Gramicidina
	Valinomicina
	N-acetil-leucil-leucil-norleucina
Altri composti	Hoecst 33342
	Rodamina 123
	Calceina

**Tabella 3**  
Funzioni fisiologiche della Pgp  
(Szabo et al., 2000; Borst e Schinkel, 1996; modificati)

Funzione	Distribuzione cellulare e tissutale
Protezione contro tossine esogene ingerite con gli alimenti	Piccolo intestino, colon, barriere emato-tessutali
Escrezione di metaboliti e tossine	Membrane canalicoli epatocitari, rene
Trasporto di ormoni steroidei	Ghiandole surrenali, trasporto del cortisolo, corticosterone, aldosterone
Estrusione di polipeptidi, citochine	Reticolo endoplasmatico
Trasporto di ioni e regolazione del volume cellulare	Attivazione dell'attività dei canali del Cl
Linfocitotossicità	Possibile coinvolgimento della citotossicità NK-cellulo-mediata

ghe, contenenti ciascuna sei regioni transmembrinarie <sup>1</sup>, e due larghi "loops" glicosilati, costituenti un sito di legame per l'ATP. La Pgp utilizza l'energia fornita sotto forma di ATP per trasportare i farmaci attraverso un canale formato da segmenti transmembranari (Fig. 1).

La sovraespressione della glicoproteina di classe I rende le cellule neoplastiche resistenti all'azione di farmaci diversi, ad agenti citotossici e a prodotti naturali (Tab. 2). In realtà la Pgp svolge importanti funzioni fisiologiche anche nei tessuti normali (Tab. 3) nei quali è normalmente espressa.

Il fenomeno della MDR è legato ad una marcata diminuzione dell'accumulo intracellulare di farmaco. Questo ridotto accumulo è strettamente energia dipendente, e corrisponde ad un contemporaneo aumento, anch'esso ATP dipendente, del rilascio di farmaco in sede extracellulare.

## DISTRIBUZIONE TESSUTALE

La Pgp è stata ampiamente studiata sia nei tessuti umani normali che neoplastici, per contro si hanno meno informazioni sul suo reale ruolo nei tessuti canini. Nei tessuti umani elevati livelli di Pgp sono stati osservati nelle ghiandole surrenali <sup>15</sup>. Livelli intermedi di Pgp sono stati osservati in molteplici tessuti umani come la ghiandola mammaria, l'epitelio delle vie respiratorie, lo stomaco ghiandolare, l'epitelio di differenti tratti intestinali (digiuno, colon, retto), nel fegato, nel pancreas, nel rene, nella prostata, nelle vescicole seminali, nella placenta, negli ureteri e nella vescica urinaria <sup>15</sup>. Bassi livelli di Pgp sono stati invece osservati nei capillari endoteliali a livello encefalico, nell'epitelio esofageo, nelle ovaie, nell'endotelio dei capillari testicolari, nella milza, nel timo, nel midollo osseo, nel cuore, nel muscolo liscio, nel muscolo scheletrico <sup>15</sup>.

Il pattern di distribuzione tissutale della Pgp nel cane, come per altre proteine appartenenti alla famiglia-ABC, differisce solo in parte da quello riscontrabile nell'uomo <sup>16</sup>. Gli studi condotti da due differenti gruppi di lavoro suggeriscono che i prodotti del gene MDR sono altamente conservati comparando l'uomo con la specie canina <sup>17-19</sup>.

Ginn ha riportato l'espressione della Pgp mediante metodologie immunoistochimiche nei tessuti normali e nei tessuti neoplastici di origine canina utilizzando tre differenti anticorpi che rispettivamente identificano 3 cloni differenti della proteina. Le indagini immunoistochimiche attualmente disponibili permettono di identificare tre differenti epitopi intracellulari (citoplasmatici) della Pgp siglati come C219, C494 e i JSB1 <sup>20-23</sup>. I tessuti canini che presentano elevati livelli di Pgp sono il fegato, le ghiandole surrenali, lo stomaco, il pancreas, l'epitelio del colon, il rene, l'epitelio dei dotti delle ghiandole salivari, il polmone, l'endotelio vascolare dei vasi encefalici, le cellule endoteliali <sup>23</sup>.

Ginn ha riportato invece un'immunoreattività variabile nel tessuto miocardico, nell'epitelio delle ghiandole mammarie, nel citoplasma e nel margine apicale delle ghiandole apocrine cutanee, delle ghiandole sebacee, dell'epitelio endometriale, nelle cellule luteali e nelle cellule dei follicoli secondari e dell'epitelio follicolare della tiroide <sup>23</sup>.

## LA PGP NELLE NEOPLASIE

L'espressione della Pgp è stata ampiamente studiata sia nelle neoplasie ematologiche quanto nei tumori solidi. È stata osservata una sovraespressione di Pgp nella leucemia mieloide acuta (AML – Acute Myeloid Leukemia) <sup>24</sup>, nel tumore del seno e dell'ovaio, nei tumori della testa e del collo <sup>25</sup>, nei linfomi non-Hodgkin, nei linfomi HIV-associati <sup>26</sup> e nel sarcoma di Kaposi <sup>27</sup>.

È stato riportato che l'espressione della Pgp nel tumore della mammella della donna aumenta dopo terapia citotossica ed è inoltre associata ad una diminuita velocità di risposta a differenti chemioterapici e ad un peggioramento clinico <sup>28</sup>. Pazienti con neoplasie che sovraesprimono la Pgp tendono a rispondere in maniera insoddisfacente alla chemioterapia antineoplastica rispetto a quelli Pgp-negativi <sup>28</sup>. Il Southwest Oncology Group (SWOG) riporta che la Pgp è espressa nel 71% dei casi di AML in pazienti umani anziani, e nel 58% dei casi è stato dimostrato un efflusso funzionale del farmaco <sup>28</sup>. In base ai dati attualmente disponibili in medicina umana l'espressione della Pgp può essere considerata come un fattore prognostico negativo per l'efficacia della chemioterapia.

Gli studi attualmente disponibili relativi alla Pgp nelle neoplasie animali indicano una certa variabilità nell'espressione della Pgp in differenti tumori spontanei del cane (Tab. 4), <sup>23</sup>. La positività può variare anche in funzione dell'anticorpo utilizzato per l'indagine immunostochimica dell'espressione della Pgp nelle differenti neoplasie <sup>23</sup>. Secondo questo studio, l'anticorpo che riconosce il clone C494 appare quello più indicato per i tes-

suti canini in base alla qualità della reazione cromogena, alla specificità (mdr1) e ai vantaggi economici per le diluizioni utilizzabili <sup>23</sup>.

Attualmente esistono solo dati parziali relativi allo studio comparato e all'impatto clinico dell'espressione della Pgp nelle neoplasie spontanee canine. In questa specie animale è stato riportato che l'espressione della Pgp nel linfoma è simile a quanto osservato nel linfoma non-Hodgkin dell'uomo <sup>19</sup>. La Pgp è sovraespressa nell'osteosarcoma canino, in modo analogo a quanto avviene nell'uomo <sup>30</sup>. Questa similitudine permette di utilizzare l'osteosarcoma e il linfoma del cane come possibili modelli comparativi per la patologia umana.

Per quanto riguarda le neoplasie degli animali i dati attualmente disponibili sono limitati al linfoma, al tumore mammario e al mastocitoma canino. Dati sull'impatto prognostico della Pgp sono già disponibili in letteratura relativamente al linfoma nel cane. Nel caso specifico Lee e colleghi hanno inquadrato la positività all'immunoreazione verso la Pgp dei campioni di linfoma esaminati in 4 differenti classi come indicato in Tabella 5. <sup>19</sup>. Secondo questo lavoro un'intensa immunoreattività tessutale anti-Pgp può essere considerata come un fattore prognostico significativo e predittivo nei soggetti affetti da linfoma. In questa specifica neoplasia la Pgp potrebbe essere quindi considerata come un effettivo ostacolo al successo chemioterapico. In base ai dati riportati da Lee i linfomi che presentano un'immunoreazione anti-Pgp di classe 4 (Tabb. 5, 6) sono da considerarsi come significativamente a rischio per un precoce insuccesso terapeutico. Nei casi di ricaduta i soggetti inizialmente inquadrati nelle categorie 3 e 4 hanno

**Tabella 4**

**Risultati di immunoreazione con tre differenti anticorpi utilizzati per identificare la glicoproteina-P nelle neoplasie canine (Ginn, 1996; modificato)**

Neoplasia	C494	C219	JSB-1
Linfoma	6/22 (27.3%)	0/22	0/22
Plasmacitoma	0/10	0/10	0/10
Istiocitoma	0/10	0/10	0/10
Melanoma maligno	3/13 (23.1%)	1/13 (7.7%)	4/13 (30.8%)
Fibroma	0/3	0/3	0/3
Fibrosarcoma	0/4	0/4	0/4
Emangiopericitoma	15/15 (100%)	1/15 (6.7%)	0/15
Leiomioma	0/4	0/4	0/4
Leiomyosarcoma	3/6 (50.0%)	1/6 (16.7%)	0/6
Adenocarcinoma-ghiandola mammaria	8/19 (42.1%)	8/19 (42.1%)	9/19 (47.4%)
Adenoma-ghiandola mammaria	0/9	3/9 (33.3%)	3/9 (33.3%)
Carcinoma squamocellulare	4/10 (40.0%)	5/10 (50.0%)	7/10 (70.0%)
Tumore delle cellule basali	1/7 (14.3%)	4/7 (57.1%)	5/7 (71.4%)
Adenoma delle ghiandole apocrine	1/2 (50.0%)	1/2 (50.0%)	1/2 (50.0%)
Adenocarcinoma delle ghiandole apocrine	4/5 (80.0%)	4/5 (80.0%)	4/5 (80.0%)
Epatoma	4/4 (100%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)
Colangiocarcinoma	2/3 (66.7%)	0/3	2/3 (66.7%)
Carcinoma delle cellule transizionali	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
Adenoma-ghiandola surrenale	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
Carcinoma tiroideo	0/4	0/4	2/4 (50.0%)
Adenoma coloretale	6/7 (85.7%)	1/7 (14.3%)	5/7 (71.4%)
Adenocarcinoma coloretale	4/4 (100%)	0/4	2/4 (50.0%)



presentato un incremento dell'espressione della Pgp nei campioni citologici esaminati (Tab. 6). Tali osservazioni supportano l'ipotesi che il trattamento farmacologico con antitumorali induca l'espressione della Pgp.

Ginn ha riportato che 16/19 carcinomi mammari canini appaiono positivi alla reazione immunoistochimica per evidenziare la Pgp a livello tissutale<sup>23</sup>. È stata però osservata una differenza statisticamente significativa tra tumori maligni ed iperplasia in soggetti non trattati con protocolli chemioterapici adiuvanti alla terapia chirurgica<sup>31</sup>, e tra tumori maligni e tumori benigni (osservazioni personali, Petterino). Il fatto che i protocolli chemioterapici adiuvanti alla terapia chirurgica del tumore mammario abbiano un incostante effetto clinico sul paziente (L. Peña, osservazioni personali) potrebbe essere in parte spiegato dalla naturale espressione della Pgp nelle neoplasie maligne della ghiandola mammaria canina<sup>31</sup>. A tale proposito sembra che sia importante ed utile dal punto di vista clinico-patologico definire un cut-off di positività immunoistochimica per definire più correttamente una neoplasia positiva o negativa per l'espressione della Pgp. Quest'ultimo aspetto deve essere indagato più dettagliatamente dato che questo tipo di proteina è normalmente espressa anche nei tessuti non

neoplastici<sup>23</sup>, in alcune neoplasie benigne e nell'iperplasia della ghiandola mammaria del cane<sup>31</sup>. Nel tumore del seno nella donna è stato definito un cut-off del 20%, ovvero quando il tessuto in esame presenta una % di cellule positive > al 20% per la Pgp viene considerato positivo<sup>32</sup>. I dati attualmente disponibili relativi all'espressione della Pgp nel tumore mammario canino consentono di definire un cut-off del 18.40% (Petterino, osservazioni personali), ma tali dati assumono un'importanza provvisoria e dovranno essere confermati. L'importanza di ciò è dettata dall'evidenza che una neoplasia considerata Pgp-negativa avrà maggiori probabilità di rispondere ad una chemioterapia ben definita. Per contro, una neoplasia che presenti una maggior espressione di Pgp più facilmente presenterà una risposta chemioterapica insoddisfacente. A tale scopo quindi l'utilità di valutare l'espressione (Figg. 1-3) di tale proteina potrebbe fornire utili valori prognostici.

Nel mastocitoma cutaneo canino è stato osservato che almeno il 26% dei campioni esaminati erano positivi alla Pgp e/o all'MRP<sup>4</sup>. Questi risultati suggeriscono che i mastocitomi ben differenziati esprimono la Pgp o la MRP più frequentemente di quelli scarsamente differenziati<sup>4</sup>. I risultati di tale lavoro indicano che probabilmente nel mastocitoma la resistenza ai protocolli chemioterapici coinvolga anche altri meccanismi oltre a quelli correlati alla Pgp e all'MRP. L'ipotesi si basa sul fatto che i mastocitomi di III grado non esprimono la Pgp e l'MRP ma contemporaneamente sono poco responsivi ai trattamenti chemioterapici<sup>4, 33-35</sup>.

## PGP COME MARKER TUMORALE

In base alle informazioni attualmente disponibili l'aspetto clinico più rilevante è rappresentato dal fatto che le neoplasie positive per la Pgp hanno una minor probabilità di successo terapeutico rispetto a quelle che non la esprimono. In realtà poiché la Pgp è normalmente espressa anche in tessuti normali e nelle neoplasie benigne appare im-

**Tabella 5**  
**Classi di positività immunoistochimica anti-Pgp nel linfoma canino (da Lee et al., 1996)**

Categorie	Caratteristiche della positività immunoistochimica anti-Pgp
Categoria 1	Campioni considerati negativi
Categoria 2	Campioni con positività equivoca
Categoria 3	10-50% delle cellule presentano una marcata positività
Categoria 4	> 50% delle cellule presentano una marcata positività

**Tabella 6**  
**Immunoreattività per i cloni C494 e C219 in preparati a fresco ottenuti da linfomi canini prima e dopo il trattamento con doxorubicina + vincristina (Lee et al., 1996, modificato)**  
**Vengono riportati il numero di casi e fra parentesi il valore percentuale rispetto al totale**

Categoria (vedi Tabella 4)	Tutti i campioni	Campioni accoppiati			
	Pretrattamento	C494 Pretrattamento	C494 Recidiva	C219 Pretrattamento	C219 Recidiva
1+2 (< 10% di cellule positive per Pgp)	10 (67%)	9 (75%)	2 (17%)	8 (73%)	3 (27%)
3+4 (≥ 10% di cellule positive per Pgp)	5 (33%)	3 (25%)	10 (83%)	3 (27%)	8 (73%)
N° Totale di casi	15	12	12	11 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>

Tutti i soggetti sono stati trattati con doxorubicina + vincristina. Tutti i cani hanno conseguito una remissione completa ma 3 soggetti sono rimasti in remissione e quindi non sono stati riportati nei campioni accoppiati.

<sup>a</sup> 1 campione non era disponibile.

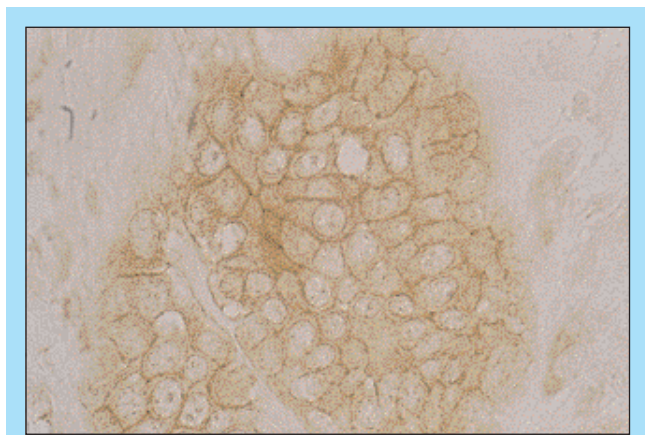


FIGURA 2 - Carcinoma solido con differenziazione squamosa: positività membranaria e debole positività citoplasmatica all'immunoreazione con anticorpo monoclonale anti-Pgp (C494), (elevato ingrandimento).

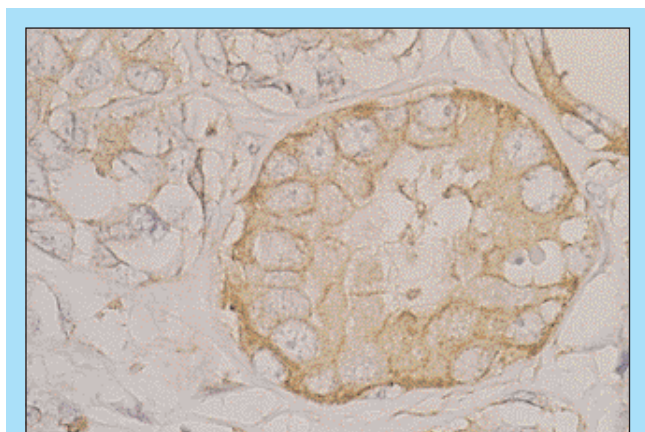


Figura 3A

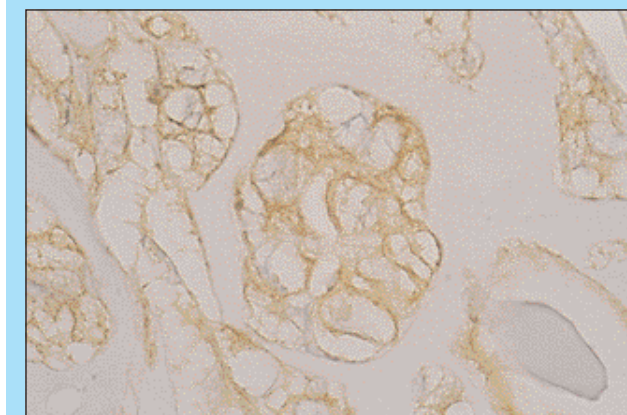


Figura 3B

FIGURA 3 - Carcinoma tubulare semplice: **A)** e **B)** positività membranaria e debole positività citoplasmatica all'immunoreazione con anticorpo monoclonale anti-Pgp (C494), (elevato ingrandimento). Nella foto 3B non tutte le cellule osservabili appaiono positive.

portante definire in futuro un cut-off che serva come limite per stabilire se la positività osservata mediante tecniche immunoistochimiche sia da considerarsi significativa. La definizione di un limite di immunopositività anti-Pgp consentirebbe di discriminare due classi di neoplasie: negative (maggiori probabilità di successo terapeutico) e positive

(minori probabilità di successo terapeutico). La valutazione immunoistochimica dell'espressione della Pgp nelle neoplasie canine spontanee prima o durante la terapia potrebbe fornire utili informazioni al fine di definire un potenziale ruolo predittivo della stessa nei confronti della risposta clinica alla terapia antineoplastica.

## Parole chiave

*Resistenza Multipla ai Farmaci, glicoproteina P, neoplasie, cane, marker tumorale.*

## Key words

*Multi Drug Resistance, P-glycoprotein, neoplasms, dog, tumour marker.*

## Bibliografia

1. Germann UA.: P-glycoprotein – A mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer* 32A:927-944, 1996.
2. Chen C, Chin JE, Ueda K., et al.: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47:381-389, 1986.
3. Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, et al.: Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res*, 54:357-361, 1994.
4. Miyoshi N, Tojo E, Oishi A, et al.: Immunohistochemical Detection of P-Glycoprotein (PGP) and Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *J Vet Med Sci*, 64:531-533, 2002.
5. Tan B.: Multidrug resistance transporters and modulation. *Oncol.*, 12:450-458, 2000.
6. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al.: A Multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:15665-15670, 1998.
7. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, et al.: Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.*, 56:988-994, 1996.
8. Lehnert M.: Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur J Cancer*, 32A:912-920, 1996.
9. Morrow SM, Cowan KH: Glutathione S-transferase and Drug Resistance. *Cancer Cells*, 2:15-22, 1990.
10. Pohl G, Filipits M, Suchomel R, et al.: Expression of the Lung Resistance Protein (LRP) in primary breast cancer. *Anticancer Res*, 19:5051-5056, 1999.
11. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, et al.: Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP-synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, 1:945-951, 1982.
12. Higgins CF, Hyde SC, Mimmack MM, et al.: Binding protein-dependent transport systems. *J Bioenerg Biomembr*, 22:571-593, 1990.
13. Gottesman MM, Pastan I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.*, 62:385-427, 1993.
14. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Ann Rev Biochem*, 58:137-171, 1989.
15. Weinstein RS, Kuzak JR, Kluskens LF, et al.: P-glycoprotein in pathology: the multidrug resistance gene family in humans. *Human Pathol*, 21:34-48, 2000.
16. Conrad S, Viertelhaus A, Orzechowski A, et al.: Sequencing and tissue distribution of the canine MRP2 gene compared with MRP1 and MDR1. *Toxicology*, 156:81-91, 2001.
17. Turker MS, Duffin KZ, Smith AC et al.: Multidrug resistance phenotype associated with selection of aminopterin resistant dog kidney cell line. *Pharmacogenetics*, 11:149-160, 1991.
18. Lieberman DM, Reithmeier RAF, Ling V et al.: Identification of P-glycoprotein in renal brush border membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 162:244-252, 1989.
19. Lee JJ, Hughes CS, Fine RL, Page RL: P-glycoprotein expression in canine lymphoma. A relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer*, 77:1892-1898, 1996.

20. Ambdugar SV, Dey S, Hrycyna CA et al.: Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39:361-398, 1999.
21. Kartner N, Evenden-Porelle D, Bradley G, et al.: Amplification of P-glycoprotein in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*, 316:817-819, 1985.
22. Broxterman HJ, Pinedo HM, Kuiper CM, et al.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in human tumor cells with a low degree of drug resistance. *Int J Cancer* 43:340-343, 1989.
23. Ginn PE.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin embedded normal and neoplastic canine tissues. *Vet Pathol*, 5:533-541, 1996.
24. Leith C, Kopecky K, Godwin J.: Acute myeloid leukaemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. *Blood*, 89:3323-3329, 1997.
25. Ng I, Lam K, Ng M.: Expression of P-glycoprotein, a multidrug resistance gene product, is induced by radiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 83:851-857, 1998.
26. Yuen A, Sikic B.: Multidrug resistance in lymphomas. *J Clin Oncol*, 12:2453-2459, 1994.
27. Nicholson S, Tan B, Swanson P.: P-glycoprotein is expressed in Kaposi's sarcoma. *Modern Pharmacol*, 10:12a, 1997.
28. Trock B, Leonessa F, Clarke R.: Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst*, 89:917-931, 1997.
29. Leith C, Kopecky K, Chen I.: Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukaemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*, 94:1086-1099, 1999.
30. Mealey KL, Barhoumi R, Rogers et al.: Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line. *Cancer Lett*, 126:187-192, 1998.
31. Petterino C, Bertoncello D, Zappulli V, et al.: Immunodetection of P-glycoprotein (Clone C494) in canine mammary gland tumors and hyperplasia. *Proceedings 20th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology*, Grugliasco, Torino, 18-21 Settembre 223, 2002.
32. Linn SC, Pinedo HM, Van Ark-Otte J, et al.: Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. *Int J Cancer*, 71:787-795, 1997.
33. Gerritsen RJ, Teske E, Kraus JS et al.: Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. *Vet Q*, 20:28-31, 1998.
34. Macy DW: Canine and feline mast cell tumors: biologic behavior, diagnosis, and therapy. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 1:72-83, 1986.
35. McCaw DL, Miller MA, Bergman et al.: Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs. *J Vet Intern Med*, 11:375-378, 1997.
36. Szabo D, Keizer H, Kaiser et al.: "Reversal of multidrug resistance of tumour cells". *Anticancer Res*, 20:4261-4274, 2000.
37. Borst P, Schinkel AH: What have learnt thus far from mice with disrupted P-glycoprotein genes? *Eur J Cancer*, 32A:985-990, 1996.