

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ESTUDIO HISTOLOGICO E INMUNOFENOTIPICO DEL LINFOMA CANINO EN EL CENTRO DE MEXICO

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE
LA SALUD ANIMAL
P R E S E N T A
FRANCISCO JOSE ALVAREZ BERGER

TUTOR:

DR. GILBERTO CHAVEZ GRIS

COMITE TUTORAL:

DR. GILBERTO CHAVEZ GRIS

DR. ENRIQUE ABURTO FERNANDEZ

DR. GERARDO ARISTI URISTA

MEXICO D.F.

2005

m343913



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.

ÍNDICE

	Página
1 Etiología	2
1.1 Factores genéticos	2
1.2 Factores ambientales	3
1.3 Factores infecciosos	3
1.4 Factores inmunomediados	4
2 Signos clínicos	5
3 Diagnóstico	7
4 Tratamiento	10
4.1 Tratamiento del linfoma multicéntrico	10
4.2 Tratamiento del linfoma Extranodal	12
4.2.1 Linfoma alimentario	12
4.2.2 Linfoma neural	12
4.2.3 Linfoma ocular	12
4.2.4 Linfoma cutáneo	12
5 Pronóstico	13
6 Clasificación histológica	14
7 Inmunofenotipo	17
8 Justificación del estudio	18
9 Objetivos	19
10 Hipótesis	19
11 Materiales y métodos	19
12 Resultados	20
12.1 Resultados estadísticos	26
13 Discusión	31
14 Conclusiones	33
15 Bibliografía	34

1. ETIOLOGÍA

El linfoma o linfosarcoma es una neoplasia maligna de linfocitos que se origina en órganos sólidos como nódulos linfáticos, hígado, bazo u otro órgano con tejido linfoide, distinguiéndose de la leucemia linfoide ya que esta tiene su origen en la médula ósea¹

El linfoma canino es una de las neoplasias malignas más comunes en el perro, se sugiere que representa el 0.36% de todos los tumores de perros presentados para atención veterinaria y es la neoplasia hematopoyética que se presenta con más frecuencia en esta especie, abarcando el 83% de este tipo de neoplasias en Estados Unidos de América.^{2,3} Tiene una incidencia de 6 a 30 casos de cada 100,000 perros en riesgo al año.⁴ Generalmente se presenta en perros de edad media a avanzada (6 a 12 años de edad) aunque puede presentarse en perros de cualquier edad.⁵

1.1 FACTORES GENÉTICOS

La causa del linfoma se desconoce, aunque se sugieren factores genéticos como parte de su etiología, debido a que se ha informado de una mayor incidencia de presentación en ciertas razas como Boxer, Terrier Escocés, Basset Hound, Airedale Terrier, Chow Chow, Pastor Alemán, Rottweiler, Poodle, San Bernardo, Bulldog Inglés, Beagle y Cobrador Dorado, mientras que existe una menor incidencia en otras como Pomeranian y Dachshound.^{1,4} En la raza Boxer existe una mayor predisposición que en otras razas, ya que el riesgo para desarrollar linfoma es de hasta diez veces mayor que las demás razas en conjunto.⁶ Debido a la existencia de una predisposición racial, se sugiere que el linfoma canino tiene una base genética, siendo esta desconocida hasta el momento, o bien en cierta manera tiene una relación con una característica heredable, esto además es apoyado por la ocurrencia del linfoma canino con mayor frecuencia en familias de Bull Mastiff,¹ Rottweiler y Otterhound,⁷ sin embargo la mayor frecuencia familiar de la enfermedad, no implica que la base sea exclusivamente genética, ya que puede también implicar influencias de factores ambientales o infecciosos.¹ Aunque se ha observado una predominancia mayor en hembras por algunos autores, no se ha revelado alguna predisposición de sexo en la mayoría de los estudios.⁸

Evaluaciones citogenéticas en linfoma tipo no Hodgkin en humanos proveen una importante información diagnóstica y pronóstica, muchas alteraciones cromosómicas son asociadas de manera constante con subgrupos específicos histopatológicos o inmunológicos. En estudios de análisis citogenéticos de linfoma canino, se han detectado anomalías cromosomales,⁹ tales como hipoploidías, hiperploidías y duplicaciones, como la trisomía del cromosoma 13 que se relaciona con un mejor pronóstico.³ Sin embargo, poco se conoce sobre posibles translocaciones o realineamientos de genes en el linfoma canino, sin embargo se piensa que como en el caso del humano, se puedan detectar aberraciones cromosomales constantes, que permitan identificar subgrupos específicos. Aunque

se han informado alteraciones cromosomales en el linfoma canino, un número de casos insuficientes han sido estudiados para determinar el significado diagnóstico o pronóstico de estas u otras aberraciones.^{3,10}

1.2 FACTORES AMBIENTALES

Los factores ambientales asociados al desarrollo de cáncer en humanos, también se han relacionado con el desarrollo de linfoma en el perro. Se ha sugerido que la exposición con algunos herbicidas, como al ácido 2-4, diclorofenoxiacético, asociado con un riesgo incrementado de los perros a padecer linfoma. En algunos estudios, se demostró que la posibilidad para desarrollar linfoma en perros es dos veces mayor cuando el propietario ha aplicado este herbicida más de cuatro veces al año en su propiedad.^{2,6,10} Los resultados de estos estudios, no se han comprobado en otros informes,^{11,12,13} así mismo tampoco se pudo encontrar una relación del linfoma canino con el uso de pesticidas y otros químicos como pinturas, solventes, gasolina, lubricantes y diesel.¹¹

Se ha relacionado la exposición a campos magnéticos de baja frecuencia (50-60 Hz) creados por corrientes eléctricas en los hogares con el desarrollo de cáncer en niños, especialmente con leucemia.^{4,14} Así mismo, esta exposición se ha considerado como un incremento en el riesgo de la presentación de enfermedades malignas linfoides en los adultos. Esta relación también se ha considerado como una causa de incremento en el riesgo de desarrollo de linfoma en el perro, sin embargo, en otros estudios se han obtenido resultados inconsistentes o poco representativos para demostrar esta relación, existiendo incertidumbre en el tema.¹⁴

1.3 FACTORES INFECCIOSOS

La hipótesis de que algún retrovirus este involucrado como causa del linfoma en el perro no se ha confirmado, como en el caso de gatos y bovinos, sin embargo, se han encontrado con microscopía electrónica partículas virales con características similares a las de retrovirus en cultivos celulares de tejido de linfoma canino.^{7,10} También se han identificado partículas virales en perros Beagle, posterior a la transmisión celular de la enfermedad,¹⁵ sin embargo, el hallazgo de estas partículas no ha sido confirmado en otros estudios.⁷ La actividad de transcriptasa de reversa se ha demostrado en 64 a 79% del sobrenadante de cultivos celulares de linfoma canino,¹ así como el hallazgo de ARN con alto peso molecular (60-70s) asociado a la actividad de transcriptasa de reversa, mientras que este ARN no fue detectado en cultivos de células linfoides normales del perro.¹⁵ Otros estudios no han encontrado evidencia de actividad de la enzima transcriptasa de reversa,⁷ además no se han aislado virus a partir de cultivos que presentan actividad de esta enzima. Hay evidencia que la actividad de la enzima de transcriptasa de reversa es mayor en muestras obtenidas postratamiento o a la necropsia de perros que recibieron tratamiento, que en biopsias de perros que no han recibido tratamiento, esto sugiere que los efectos inmunosupresores de la terapia inducen a una mayor expresión de la actividad de esta enzima. Recientemente, un

retrovirus con morfología típica de un lentivirus, fue aislado a partir de células mononucleares obtenidas de sangre periférica de un perro con leucemia.¹⁶ La posibilidad de una acción directa causada de un virus, que implica la introducción de oncogenes virales o la alteración del genoma con la activación consecuente de un proto-oncogen específico, como es el caso de la leucemia viral felina o de la leucosis viral bovina, es menos probable en el perro, siendo más probable que una posible acción oncogénica de un agente viral en esta especie solamente pudiera ser ejercida por una susceptibilidad ampliada por factores genéticos. Otra posible causa del modo de acción es por una estimulación no específica de la proliferación linfóide, que pudiera incrementar la posibilidad de cambios genéticos específicos resultando en una expansión monoclonal, como sucede de manera más común en el linfoma de Burkitt con el virus Epstein-Barr (EBV) y en la leucemia de células T asociada con el virus linfotrópico de células T tipo 1 (HTLV-1) en el humano.¹⁷ Como se ha mencionado, algunos linfomas en el humano se asocian de manera definitiva con virus, como es el caso del HTLV-1, que establece una infección latente por vía de transcripción de reversa en células T- de ayuda activadas, pudiendo inducir leucemia o linfoma de células T en adultos. Otro virus asociado con la ocurrencia de linfoma en humanos es el EBV, quien juega un papel importante en la forma endémica del linfoma de Burkitt. Así mismo, se conoce que el EBV juega un papel en la etiología del linfoma tipo no Hodgkin, especialmente en personas con inmunosupresión adquirida o heredada.¹ Últimamente, se ha establecido la asociación de linfoma de células B con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

1.4 FACTORES INMUNOMEDIADOS

Los linfomas son un grupo diverso de neoplasias de las células que intervienen en el sistema inmunológico y se ha propuesto que los defectos en el este sistema, responsables de la enfermedad inmunomediada y permitan el desarrollo de la neoplasia.¹⁸ Algunos desórdenes inmunomediados han sido asociados con neoplasias en humanos, siendo el linfoma el cáncer más común que se relaciona con enfermedades inmunomediadas como la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, que incluye la triada de queratoconjuntivitis seca, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico; dermatomiositis y tiroiditis.^{18,19} Una reactividad alterada en el sistema inmunológico humoral y celular, se ha demostrado en perros con linfoma.¹⁹ El que esta inmunosupresión sea causada por la neoplasia, o bien que este déficit inmunológico proceda del desarrollo del linfoma, necesita ser determinado.¹ Enfermedades autoinmunes también han sido asociadas con varios tipos de neoplasias en el perro,²⁰ como la trombocitopenia inmunomediada que se ha asociado con un mayor riesgo en el desarrollo de linfoma canino, leucemia linfocítica y otros tumores sólidos.^{10,18,19} En contraste, se ha sugerido que esta relación es debida a que los pacientes que presentan enfermedades inmunomediadas son pacientes de edad avanzada, etapa con mayor frecuencia de presentación de neoplasias.¹⁹ En humanos se ha observado un mayor riesgo de contraer cáncer linforreticular en personas con inmunosupresión espontánea o iatrogénica, así como los pacientes con transplante de órganos presentan mayor riesgo en desarrollar linfoma.^{1,4} Se ha

señalado que la sobre expresión de ciertos oncogenes como por ejemplo *MYC* o *BCL-2* en los linfocitos de pacientes con diversas enfermedades autoinmunes puede ocurrir, y eventualmente provocar el desarrollo de linfoma.¹

2. SIGNOS CLÍNICOS

El linfoma al caracterizarse como una proliferación maligna de células linfoides, puede presentarse en cualquier órgano que contenga tejido linfoide. Se reconocen cuatro formas de presentación anatómica del linfoma en el perro y el gato, que son multicéntrica (generalizada), alimentaria, mediastínica (tímica) y extranodal (renal, neural, ocular y cutánea), sin embargo, independientemente del sitio de origen, la enfermedad finalmente puede diseminarse e involucrar otros tejidos linfoides o de otro origen, particularmente el bazo, hígado y médula ósea.^{4,5,10}

La **presentación multicéntrica** es la más común en el perro, abarcando más del 80% de los casos⁴⁷ y se caracteriza por una linfadenomegalia generalizada, llegando a tener de 2 a 15 veces el tamaño normal de los ganglios linfáticos, con o sin hepatomegalia, esplenomegalia o lesiones extranodales. En ciertos casos sólo se pueden encontrar uno o más ganglios linfáticos afectados. También es común encontrar signos clínicos no específicos como fiebre, letargia, pérdida de peso y anorexia. Si la linfadenomegalia es muy marcada, pueden causar obstrucción mecánica de los vasos linfáticos y sanguíneos, causando edema en miembros y cara, así mismo pueden llegar a causar una compresión parcial de las vías respiratorias causando tos en el paciente. Un 10 a un 20% de los perros con linfoma multicéntrico presentan hipercalcemia. Estos pacientes presentan poliuria, polidipsia, anorexia, vómito, diarrea, debilidad, depresión y arritmias cardiacas.⁴

La **presentación mediastínica** se caracteriza por los signos respiratorios como disnea, intolerancia al ejercicio y tos. Algunos pacientes llegan a presentar disfagia y regurgitación. Estos signos se deben a la compresión causada por la linfadenomegalia del ganglio linfático mediastínico anterior y por una efusión pleural maligna. La hipercalcemia se presenta hasta en un 40 % de los casos de presentación mediastínica en el perro.⁴

En el **linfoma gastrointestinal**, se observan signos como vómito, anorexia, diarrea, mala absorción y pérdida de peso. Pueden ocurrir signos de obstrucción intestinal o peritonitis. Suele presentarse como una masa solitaria o bien de manera difusa en el tracto gastrointestinal. Los ganglios mesentéricos, hígado y bazo pueden o no estar involucrados.^{4,5,10}

El **linfoma extranodal** presenta signos clínicos inespecíficos (letargia, anorexia, pérdida de peso, poliuria, polidipsia) o específicos del órgano o sistema involucrado. Los ganglios linfáticos pueden o no estar afectados. Las presentaciones extranodales comunes en el perro son la cutánea y la ocular.^{4,10}

El **linfoma cutáneo** es la presentación extranodal más común en el perro, abarcando del 3% al 8 % de los linfomas en esta especie. Se clasifica en epiteliotrópico (presencia de linfocitos neoplásicos en la epidermis) que tiende a tener un origen de células T, y no epiteliotrópico (presencia de linfocitos neoplásicos en la dermis) con origen generalmente de células B.²¹ Se caracteriza por la infiltración de linfocitos neoplásicos en cualquier área de la piel, y puede ocurrir como una forma primaria o bien como resultado de la diseminación del tumor a partir de otras áreas anatómicas. Es muy fácil confundir el diagnóstico por su presentación clínica tan variable y porque puede tener similitud con otras enfermedades cutáneas. En ocasiones los pacientes son presentados para una segunda opinión después de haber estado en terapias sistémicas y tópicas con antibióticos, antimicóticos o esteroides, y que no han sido exitosas a causa de un diagnóstico erróneo. Las lesiones pueden ser aisladas o generalizadas, e incluyen nódulos, placas, pústulas, úlceras, eritroderma, despigmentación o dermatitis exfoliativa. El tamaño de las áreas afectadas va desde pequeñas (milímetros) hasta grandes placas o nódulos (varios centímetros). Inicialmente aparecen lesiones de parches eritematosos con alopecia y escaras, en cara y cabeza, que progresan hacia el tronco. Esta forma evoluciona a placas eritematosas circulares a irregulares, algunas con ulceración central y formación de costras en bordes mucocutáneos. El prurito es variable. Tanto los parches como las placas pueden sufrir regresión y reaparecer tiempo después, o progresar en una forma más agresiva, apareciendo nódulos de tamaño variable, solitarios o múltiples, firmes, elevados, de color rojo oscuro, brillosos, con escalas o ulcerados, y con exudado seroso que tiende a formar costras. Si las costras son removidas, la piel se observa hemorrágica e hiperémica. Es común encontrar infecciones bacterianas secundarias, que ocasionan un mayor prurito y mal olor. En este estado el progreso hacia los ganglios linfáticos u otros órganos puede ocurrir. En más de un tercio de los casos, la cavidad oral está involucrada, y presenta lesiones en forma de nódulos o placas eritematosas en mucosa, encías y labios. Los perros con presentación epiteliotrópica tienden a tener un mayor tiempo de supervivencia que los que presentan un linfoma cutáneo no epiteliotrópico.²¹

El **linfoma renal** es relativamente común en gatos, pero es raro en perros. Incluye signos de insuficiencia renal. Los riñones se pueden encontrar aumentados de tamaño, firmes e irregulares y generalmente la afección es bilateral.^{5,10}

El **linfoma ocular** se presenta en ambas especies, reconociéndose en el perro con mayor frecuencia de manera secundaria a la forma multicéntrica, mientras que en el gato es más común encontrarlo de forma primaria. Los signos clínicos incluyen uveítis, hemorragia retinal, infiltrado conjuntival, queratitis intersticial, hipema, hipopión, glaucoma, masas oculares, afección retinal e infiltración al nervio óptico.⁴

El **linfoma neural** puede afectar tanto al sistema nervioso central como al periférico, y puede ser de presentación primaria o bien como parte de la fase multicéntrica. Los signos clínicos asociados con esta presentación incluyen

convulsiones u otras anomalías neurológicas debido a la infiltración de células malignas al sistema nervioso central. La compresión de la médula espinal puede ocurrir por la presencia de tumores extradurales o intramedulares causando paresis o parálisis.⁵

3. DIAGNÓSTICO

El linfoma es una enfermedad sistémica, sin embargo, es importante determinar la extensión de la enfermedad en los distintos órganos e identificar condiciones secundarias a la enfermedad o no relacionadas a esta, que necesiten ser tratadas o controladas antes de instituir un tratamiento. Se deben de realizar varios procedimientos para establecer el diagnóstico definitivo y grado clínico del linfoma, incluyendo un hemograma, química sanguínea y urianálisis. El diagnóstico se basa en los resultados de los datos clínicos y resultados del estudio histopatológico.⁴

Existen distintos grados en la presentación de la enfermedad, para clasificarlos, se evalúa la extensión de la enfermedad, presencia de signos paraneoplásicos y la existencia de una enfermedad adyacente o no. En la clasificación se reconocen si los signos de enfermedad sistémica están presentes o no, utilizándose el esquema de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para su clasificación (cuadro 1). Esta se basa en los resultados del examen físico, resultados de pruebas de laboratorio, estudios imagenológicos, evaluación citológica de aspirados con aguja fina de tejidos linfoides y médula ósea, evaluación histológica de tejidos linfoides, biopsia de médula ósea y evaluación oftalmológica. Si se encuentran presentes signos sistémicos del sistema nervioso central, un examen citológico del líquido cefalorraquídeo debe ser realizado.¹⁰

CUADRO 1

CLASIFICACIÓN DE GRADOS CLÍNICOS DEL LINFOMA EN PERROS Y GATOS POR LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD¹⁰

- Grado I
 Cuando un solo ganglio linfático o tejido linfoide de un solo órgano se encuentra implicado
 - Grado II
 Cuando una cadena ganglionar se encuentra implicada.
 - Grado III
 Implicación generalizada de todos los ganglios linfáticos.
 - Grado IV
 Implicación del hígado, bazo o ambos con o sin los grados I a III.
 - Grado V
 Manifestación en sangre periférica, implicación de la médula ósea con o sin grados I a IV.
 Cualquier implicación extranodal.

 - Subgrado *a*
 Sin signos sistémicos.
 - Subgrado *b*
 Con signos sistémicos.
-

La anemia es una de las anormalidades más comunes que se encuentran asociadas con linfoma, se presenta en un porcentaje mayor a 38% de los casos. Esta generalmente es de tipo normocítica, normocrómica, no regenerativa (anemia de enfermedad crónica) y es causada, de manera secundaria, por una inflamación crónica asociada a la enfermedad, a un tiempo de vida disminuido de los eritrocitos y a un metabolismo anormal de hierro, o bien por una respuesta disminuida de la médula ósea a la eritropoyetina. La trombocitopenia se encuentra en más del 58% de los casos en perros⁴, esta generalmente esta causada por una disminución en la producción plaquetaria secundaria a una invasión directa a la médula ósea (mieloptisis) y a una capacidad disminuida de la médula para producir megacariocitos. Las variaciones en el conteo total leucocitario ocurren en algunos casos, se encuentra leucopenia aproximadamente en un 20% y leucocitosis en un 30% de los casos.²² Las alteraciones leucocitarias pueden estar causadas por la implicación neoplásica de la médula ósea, sin embargo otros factores pueden causar estas alteraciones como el estrés por la enfermedad o infecciones secundarias, ya que en la mayoría de los pacientes con linfoma se encuentran inmunosuprimidos por lo que son susceptibles a padecer infecciones.^{4,5,10}

La hipercalcemia es un signo paraneoplásico común asociado al linfoma en el perro que va de un 10% al 40% de los casos. El mecanismo propuesto para la hipercalcemia en perros con linfoma es la hipercalcemia humoral de malignidad, causada por la producción inducida por el tumor de un péptido relacionado a la

hormona de la paratiroides (PTHrP) que estimula una resorción ósea osteoclástica.^{4,5,10}

La hiperproteinemia se presenta rara vez, se puede encontrar una elevación de IgG, IgA o IgM producida por linfocitos B neoplásicos. La alteración de las proteínas séricas puede inducir un síndrome de hiperviscosidad, causando diatesis hemorrágica, signos nerviosos, lesiones oculares, renales y proteinuria de Bence-Jones.⁸

La radiología es una herramienta de gran ayuda para determinar la extensión de la enfermedad. Las radiografías torácicas revelan un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos retroesternales o taqueobronquiales, infiltrados pulmonares, masas mediastínicas, efusión pleural o ambas. Las anomalías detectadas en radiografías abdominales incluyen un aumento de tamaño del hígado, bazo, ganglios linfáticos iliacos, efusión abdominal o ambas. La ultrasonografía abdominal confirma anomalías en el tamaño, textura y estructura de los órganos, así como el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos internos.¹⁰

Aunque un aspirado con aguja fina de un nódulo linfático para su estudio citológico, puede ser de gran ayuda para el establecimiento del diagnóstico, la evaluación histopatológica por medio de una biopsia o de la remoción total de un nódulo linfático, tiene un mayor valor diagnóstico y pronóstico, debido a que en la biopsia se conserva la arquitectura del nódulo linfático para ser evaluada y provee una mayor cantidad de tejido para su análisis, lo que permite la clasificación histológica del caso.⁵

La citología de aspirados o biopsias de médula ósea deben ser realizadas para confirmar la implicación de esta, así como la evaluación citológica de líquido cefalorraquídeo, fluido torácico y del aspirado de masas intracavitarias, es indicada en pacientes con presentación de signos en el sistema nervioso central, efusión pleural o masas intracavitarias.⁵

4. TRATAMIENTO

4.1 TRATAMIENTO DEL LINFOMA MULTICÉNTRICO

El manejo clínico del linfoma canino es muy variable debido a que ciertos casos de linfoma responden mejor al tratamiento que otros por lo que no se ha logrado establecer un protocolo quimioterapéutico estándar para todos los casos.⁴

Una vez que se ha obtenido un diagnóstico definitivo y se ha establecido el grado clínico correcto, se debe llevar a cabo una discusión con el propietario en cuanto al pronóstico. El propietario debe ser informado sobre las probabilidades de remisión y supervivencia, duración de estas, costos del tratamiento y efectos secundarios. Le debe ser entregada una copia del protocolo que se va a administrar junto con el programa de los tratamientos y revisiones. La probabilidad de alcanzar una cura en un perro o gato con linfoma es remota, pero sin tratamiento, la mayoría de los casos mueren por la enfermedad en un tiempo de 4 a 8 semanas. La quimioterapia sistémica continúa siendo la terapia de elección para el linfoma, esta produce en la mayoría de los casos una resolución de los signos clínicos y anormalidades en los resultados de laboratorio vistos en la presentación del caso, por varios meses sin el compromiso de la calidad de vida. Con el uso de protocolos quimioterapéuticos combinados (cuadro 2), los perros tienen una expectativa de vida de 12 a 16 meses y alrededor de un 20 % se encuentran vivos después de los 2 años de haber sido diagnosticado.⁵ Existen varios protocolos quimioterapéuticos efectivos contra el linfoma y la mayoría de los pacientes toleran los efectos secundarios con baja o nula toxicidad. Aunque el uso de protocolos con un solo fármaco puede ser efectivo, la mayoría de los protocolos están conformados por varios fármacos debido a que el uso simultáneo de fármacos con diferentes mecanismos de acción, son más efectivos en la destrucción celular y desarrollan una menor resistencia a estos. Los fármacos que conforman este tipo de protocolos, idealmente deben ser efectivos como agentes únicos contra el tipo de tumor específico, poseer diferentes mecanismos de acción y no presentar toxicidad coincidente. Generalmente, los protocolos combinados que ofrecen mayor duración del tiempo de remisión son los que incluyen a la doxorubicina.^{4,10}

Cuadro 2

Resumen de los protocolos quimioterapéuticos más utilizados en linfoma canino¹⁰

Protocolo	Número de perros	Porcentaje de remisión	Tiempo de remisión en promedio (meses)	Tiempo de supervivencia en promedio (meses)	% de perros vivos al año
COP	20	70%	3.3	7.5	<10%
COP	77	75%	6.0	NR	19%
A	22	77%	6.3	6.3	NR
A	21	76%	6.8	9.0	NR
A	37	59%	4.4	7.7	NR
A	121	85%	4.3	7.9	NR
VMC-L	59	90%	4.4	7.3	25%
VMC-L	147	77%	4.7	9.7	25%
VCA-L	112	73%	7.9	11.5	50%
L-COPA	41	76%	11.0	NR	48%
L-COPA	68	75%	9.0	5.8	27%
VLCAP	98	69%	12.5	17	NR
L-PVCA	24	87%	10.3	17	NR
L-PVCD	21	71%	5	7.6	NR
L-VCAM	55	84%	8.4	11.9	50%
L-VCA	51	94%	9.1	13.2	NR

C: ciclofosfamida, O: vincristina, P: prednisona, A: doxorubicina, V: vincristina, M: metotrexato, L: asparaginasa, NR: no reportado.

Los efectos secundarios pueden presentarse en uno o varios órganos o sistemas, así como dependen del fármaco que se utilice; por lo que siempre, antes de administrar cualquier fármaco, se debe de considerar cuales pueden ser los posibles efectos secundarios no deseables y el tiempo aproximado de presentación de estos, ya que en muchas ocasiones, con la administración de medicamentos de manera preventiva, los efectos secundarios pueden ser evitados o controlados. Las recomendaciones dependen del órgano o sistema que pueda llegar a ser afectado. Las alteraciones que se presentan con mayor frecuencia en oncología veterinaria, causadas por la administración de la quimioterapia, y por lo tanto, las de mayor significado clínico, son: toxicidad de la médula ósea (leucopenia, trombocitopenia y anemia), gastrointestinal (anorexia, vómito, diarrea), en el sistema urinario, cardiotoxicidad y reacciones de hipersensibilidad.⁵

4.2 TRATAMIENTO DEL LINFOMA EXTRANODAL

La mayoría de las veces, linfomas únicos (ganglios solitarios, masas cutáneas o gastrointestinales) eventualmente se vuelven sistémicos, y aunque se han obtenido curas después de la excisión quirúrgica o radioterapia de linfomas solitarios, son muy raras, por lo que generalmente se recomienda que a pesar de que la neoplasia pueda ser tratada quirúrgicamente o con radioterapia, se administre un protocolo quimioterapéutico.^{4,5,10}

4.2.1 Linfoma gastrointestinal

El tratamiento del linfoma gastrointestinal es generalmente complicado debido a la disfunción del este sistema. Si el tumor se encuentra de manera localizada y puede ser removido quirúrgicamente, este debe ser extraído y posteriormente una quimioterapia combinada debe ser administrada y los resultados generalmente son favorables. En el linfoma gastrointestinal difuso se utiliza la quimioterapia combinada con doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona y L-asparaginasa, aunque los tiempos de supervivencia son más cortos que en la presentación multicéntrica.^{5,10}

4.2.2 Linfoma neural

La mayoría de los linfomas neurales son consecuencia de manera secundaria al linfoma multicéntrico, aunque puede presentarse de forma primaria. En gatos y perros con linfoma del sistema nervioso central, la quimioterapia con o sin radioterapia es la modalidad de elección. Los protocolos deben incluir citarabina o lomustina, ya que estos fármacos alcanzan grandes concentraciones en líquido cefalorraquídeo.⁵

4.2.3 Linfoma ocular

La implicación ocular generalmente esta dada por la forma multicéntrica y si las lesiones oculares no son severas la vista puede ser recuperada una vez que el linfoma ha presentado remisión. Sin embargo, el ojo puede estar afectado directamente por implicación tumoral y siendo que este órgano se comporta de manera similar a la barrera hematoencefálica, es difícil obtener concentraciones intraoculares adecuadas de los fármacos quimioterapéuticos, por lo que se recomienda utilizar protocolos que incluyan a la citarabina o lomustina. Se puede utilizar quimioterapia subconjuntival utilizando citarabina a dosis de 20 a 40 mg/m², diluido en solución Ringer, dos veces por semana para un total de seis a ocho dosis. La enucleación es una alternativa.⁴

4.2.4 Linfoma cutáneo

El tratamiento del linfoma cutáneo pocas veces es exitoso, incluso en caso de ser secundario al linfoma multicéntrico. En el caso del linfoma cutáneo primario, la mayoría de los tratamientos deben ser considerados paliativos, pero al aliviar

algunos signos clínicos, son de gran ayuda. Por ejemplo los baños regulares con champúes basados en sulfuros hacen sentir al paciente más confortable y mejora su apariencia, aunque no tenga ningún efecto sobre la enfermedad primaria. La prednisona puede ser utilizada para el control del prurito, ya que no tiene un efecto apreciable en el tiempo de supervivencia. Las lesiones localizadas deben ser tratadas por medio de cirugía o radioterapia. Muchos fármacos y combinaciones de éstos han sido utilizados en el tratamiento del linfoma cutáneo con resultados variables. Las mejores respuestas al tratamiento generalmente se dan con el uso de la lomustina como único agente o en combinación con prednisona; otra opción de tratamiento es el uso de protocolos quimioterapéuticos combinados con doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona y L-asparginasa. Existen informes variables sobre el uso de los retinoides como la isotretinoína y el etretinato en el tratamiento de linfoma cutáneo canino. El mecanismo de acción de los retinoides se desconoce, aunque se sostiene que al ser análogos de la vitamina A, y ésta, al tener la función de ayudar a la regulación del crecimiento y diferenciación de las células, pueden actuar regulando la diferenciación epitelial y crear un efecto de reversa en la diferenciación de malignidad,^{1,4} sin embargo su utilidad es controvertida.

5. PRONÓSTICO

Los factores que de manera independiente definen el pronóstico, son variables.¹ La búsqueda para identificar a un grupo constante de factores pronósticos, que pueda ayudar al clínico en determinar el tiempo de supervivencia o la duración de la remisión, ocurre tanto en medicina veterinaria como en humana.^{4,6,10,23,24} Algunas variables evaluadas en medicina veterinaria con significado pronóstico incluyen sexo, edad, peso corporal, raza, grado y subgrado clínico, administración previa al tratamiento de corticoesteroides, condiciones paraneoplásicas, respuesta inicial al tratamiento, anomalías cromosómicas, clasificación histológica e inmunofenotipo celular^{15,23,25,26}. Los factores que se han relacionado de manera negativa al tiempo de remisión y de supervivencia son: Subgrado *b*, hipercalcemia, presentación mediastínica, cutánea, renal y nerviosa e inmunofenotipo celular T. Tomando en cuenta estos datos es posible clasificar al linfoma canino en diferentes grupos que presenten características similares e idealmente establecer protocolos de tratamiento específicos para cada grupo y lograr una mayor confiabilidad en la determinación del pronóstico. El grado clínico de la enfermedad tiene gran relación con el pronóstico,^{26,27,28} los perros que presentan una menor extensión de la enfermedad (grado clínico I a II) tienen mayor probabilidad de alcanzar una remisión completa, un mayor tiempo de la remisión y supervivencia que en perros con grado clínico IV o V, así mismo los perros con subgrado *b*, presentan un menor periodo de remisión.⁶ Los perros con hipercalcemia son considerados dentro del subgrado *b*.

En los casos sin tratamiento, el pronóstico es grave, siendo la supervivencia de 30 a 60 días, sin embargo, el linfoma es una de las neoplasias más susceptibles a la quimioterapia por lo que se pueden alcanzar tiempos de supervivencia de meses a años postratamiento.^{3,4,5,10,29,30}

El inmunofenotipo celular es el factor que de manera independiente es el más importante asociado con el pronóstico,^{31,32} sin embargo, muy pocos estudios se han realizado sobre su importancia pronóstica en el linfoma canino.³³ Por medio de la técnica de inmunohistoquímica, la descripción inmunofenotípica es cada vez más utilizada en el diagnóstico del linfoma canino. Se ha encontrado que la mayoría de los linfomas caninos son de origen de células B y presentan un mejor pronóstico en comparación de los linfomas de origen de células T, siendo en estos de hasta la mitad del tiempo de remisión de la enfermedad después de recibir un tratamiento y del tiempo de supervivencia respecto a los linfomas de células B.^{23,31,32,33,34,35} En un estudio de 162 perros con linfoma, se informa una diferencia en promedio de 60 y 160 días de remisión y de 157 y 335 días de supervivencia entre linfomas de origen de células T y células B respectivamente.³²

Un sistema para determinar el pronóstico es el estudio de regiones nucleares argirofílicas organizadas (AgNORs).³³ Las regiones nucleolares organizadas (NORs) son cadenas de ADN en el nucleolo de las células que contienen ARN ribosomal, la configuración o número de regiones son el reflejo de la actividad celular y nuclear, utilizándose como marcadores de la síntesis proteica que se relaciona con la velocidad en la proliferación celular. Estas regiones se visualizan con microscopía como puntos en el nucleolo utilizando tinciones de plata (AgNORs). Se ha determinado que mientras mayor sea el número de AgNORs presentes, mayor tiempo de duración en la remisión y supervivencia.^{4,33}

6 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

Un factor que presenta una posible relación con el pronóstico es el grado histológico. Los sistemas de clasificación histológica para el linfoma humano basados en la apariencia microscópica, han sido aplicados para el perro, sin embargo, el comportamiento biológico del tumor es difícil de predecir con base a las características histológicas únicamente.^{33,36} Las clasificaciones que toman en cuenta tanto características histológicas como inmunofenotípicas, han demostrado un mejor significado pronóstico.³³ Los esquemas más utilizados son: el de *Kiel*,¹ el del *National Cancer Institute* llamado *Working Formulation (NCI-WF)*^{1,25,30} y la Clasificación Histológica Internacional de la Organización mundial de la Salud.³⁷

El esquema de clasificación *Kiel* (anexo 1), divide al linfoma en grado alto y bajo; y considera la morfología y el inmunofenotipo celular.^{1,23} En este esquema, la composición celular es considerada de mayor importancia que el patrón de crecimiento.

El esquema de clasificación desarrollado por el *National Cancer Institute-Working Formulation (NCI-WF)* (anexo 1), tiene un mayor uso en oncología veterinaria que otros esquemas humanos de clasificación. Este sistema describe diez tipos celulares básicos que son divididos en tres grados de comportamiento

clínico: bajo, intermedio o alto.^{1,23,25,30} También es considerado el patrón de crecimiento (folicular o difuso) y el índice mitótico, el cual generalmente es menor en los casos de grado histológico bajo.²⁵ El patrón histológico que comúnmente se observa en perros con linfoma, es el difuso con un índice mitótico alto y de grado intermedio a alto.^{10,23,25}

En un estudio donde se evaluaron 138 perros con linfoma, se determinó que los perros con grado alto en el sistema de clasificación *Kiel*, presentaron con mayor frecuencia remisiones completas pero con una duración más corta de esta en comparación con los perros clasificados con un grado bajo.⁴ Al evaluar los mismos perros con la clasificación *NCI-WF*, los perros con grado alto presentaron un periodo de sobrevivencia más largo comparado con los perros con grado bajo.²³

La actualización de la *Clasificación Histológica Internacional de Tumores Hematopoyéticos y Tejidos Linfoides de la Organización Mundial de la Salud*³⁷ (anexo 1), es una lista más completa que incluye neoplasias linfoides, enfermedades mieloproliferativas agudas y crónicas, síndromes mielodisplásicos, desórdenes histiocíticos y mastocitomas. Este sistema también cuenta con un número de rastreo específico para cada enfermedad que facilita su identificación. Además provee un mayor grado de precisión y reproducibilidad en la identificación anatómica, arquitectónica y citológica de las neoplasias hematopoyéticas,³⁷ sin embargo hasta el momento, no se cuenta con el equipo y marcadores celulares necesarios en México para utilizar este sistema de clasificación en Medicina Veterinaria, por lo que a la fecha la clasificación del *National Cancer Institute-Working Formulation (NCI-WF)* y de *Kiel*, tienen una mejor aplicación en patología veterinaria en México.

En el humano los linfomas se dividen en tipo Hodgkin y tipo no Hodgkin, pero la ocurrencia del tipo Hodgkin en el perro es disputable, siendo descritos linfomas tipo no Hodgkin en prácticamente todos los casos documentados.

Los resultados de diversos estudios de clasificación histológica del linfoma canino, utilizando el sistema de clasificación del *National Cancer Institute – Working Formulation (NCI-WF)* encontrados en distintas zonas geográficas del mundo se muestran en el cuadro 3:

Cuadro 3

Resultados en porcentajes de casos de linfoma canino utilizando la clasificación histológica NCI-WF

Categoría	Grado	Greenle ²³ (EUA)	Carter ²⁵ (EUA)	Teske ²⁸ (EUR)	Ferrer ²⁹ (EUR)	Foumel ³⁶ (EUR)	Ruslander ¹⁷ (EUA)	Carter ³⁹ (EUA)
DSL	Bajo	11.2%	4.9%	0.0%	14.14%	13.04%	0%	4.4%
FSC		0%	0%	12%	0%	1.08%	0%	0.4%
FM		1.1%	0.4%	4.3%	0%	0%	0%	0.4%
FL	Intermedio	3.4%	0.4%	31%	4.04%	0%	0%	0.2%
DSC		3.4%	5.9%	8.6%	0%	0%	0%	5.2%
DM		5.1%	2.1%	5.2%	16.16%	1.08%	7.69%	1.8%
DL		48.3%	20.0%	30.2%	29.29%	40.22%	30.77%	14.4%
IB	Alto	25.6%	24.9%	6%	11.11%	14.13%	7.69%	21.5%
LB		0.6%	17.2%	0%	7.07%	1.08%	53.85%	17.1%
SNC		3.2%	24.2%	0%	3.03%	4.34%	0%	34.6%
MF	Misceláneo	-	-	1.7%	15.15%	14.13%	-	-
N		176	285	116	99	92	15	543

DSL: Linfocítico o plasmáticos de células pequeñas, FSC: Folicular predominantemente de células pequeñas hendidas, FM: Folicular mixto de células grandes y pequeñas, FL: Folicular predominantemente de células grandes, DSC: Difuso de células pequeñas hendidas, DM: Difuso mixto de células pequeñas y grandes, DL: Difuso de células grandes, IB: Inmunoblástico, LB: Linfoblástico, SNC: Células pequeñas no hendidas, MF: Micosis fungoides.

Grado bajo: DSL,FSC,FM. Grado intermedio: FL,DSC,DM,DL. Grado alto: IB,LB,SNC.

n= número de casos

EUA: Estados Unidos de America, EUR: Europa

7 INMUNOFENOTIPO

La inmunofenotipificación se refiere a la aplicación de anticuerpos monoclonales para la diferenciación de antígenos de membrana de linfocitos con el fin de identificar la línea de las células presentes en un tejido. Los antígenos de leucocitos se han clasificado, dando el surgimiento de una nomenclatura común para antígenos humanos y sus homólogos en otras especies, llamada *cluster of differentiation* o antígenos CD. Existen más de 160 antígenos CD asignados al sistema inmunológico en el humano, así como muchas otras moléculas que aún no han sido asignadas al sistema *cluster of differentiation*, sin embargo sólo pocos antígenos CD han sido asignados en el sistema del perro. En la actualidad, de los anticuerpos disponibles para establecer el inmunofenotipo de linfocitos, los más utilizados en el perro son: el anti-CD3 de reacción específica de linfocitos T y el anti-CD79 para detección de linfocitos B.^{18,21,22,29,31,33-36,40,41} Otros anticuerpos utilizados en el perro son el anti-CD4, -CD5 y -CD8 para detección de células T y anti-CD21 para células B maduras.^{31,36,42,43.}

El CD3 es una molécula accesoria de membrana que se asocia con el receptor de células T (TCR) formando el complejo de membrana TCR-CD3, complejo expresado únicamente en la superficie de células T maduras y timocitos. La función del CD3 es participar en la transducción de señal después de la interacción con otra célula T, célula B o un antígeno. El CD3 esta compuesto por 5 cadenas polipeptídicas invariables, que en asociación forman tres dímeros: Un heterodímero de cadenas gamma y épsilon ($\gamma\epsilon$), un heterodímero de cadenas delta y épsilon ($\delta\epsilon$) y un homodímero de cadenas zeta ($\zeta\zeta$) o un heterodímero de cadenas zeta y eta ($\zeta\eta$).⁴⁴ La evaluación de la expresión de CD3 es posible en tejidos fijados en formalina y preservados en parafina utilizando anticuerpos anti-CD3 comerciales (DAKO) siendo específico para varias especies, entre ellas el humano, perro, caballo y gato.²² La demostración de la expresión de CD3 es uno de los análisis inmunofenotípicos mas útiles actualmente realizados en inmunodiagnóstico veterinario y es utilizado para el diagnóstico de leucemia y linfoma de células T.²² La expresión de CD3 confirma la presencia de linfocitos T en un tejido.

El CD79 es una molécula accesoria de membrana asociada al complejo receptor de células B (BCR). El BCR esta compuesto por una inmunoglobulina de membrana (mIg) y por un heterodímero con una cadena α y una β , también llamadas CD79a y CD79b respectivamente, y que tienen como función la transducción de señal hacia el interior de la célula. El CD79 es expresado en todas las fases de desarrollo de las células B inmaduras a maduras, persistiendo en las células plasmáticas.⁴⁴ El CD79a es un marcador útil en el establecimiento del diagnóstico de plasmacitoma, leucemia y linfoma de células B.²² La expresión de CD79a puede ser detectada con productos comerciales (DAKO) en muestras de tejido fijadas en formalina y son anticuerpos específicos para varias especies como el humano, ratón, perro, gato y caballo.²²

Los resultados de diversos estudios de inmunofenotipificación del linfoma canino encontrados en distintas zonas geográficas del mundo se muestran en el cuadro 4:

Cuadro 4

Porcentajes del inmunofenotipo de casos estudiados de linfoma canino

	Foumel ³⁶	Ferrer ²⁹	Kosarek ⁴⁰	Caniatti ⁴²	Fisher ⁴³	Dobson ³⁷	Burnett ⁴⁵	Teske ³⁸
Origen	Europa	Europa	EUA	Europa	EUA	Europa	EUA	Europa
Células B	73.91%	58%	65.41%	77.78%	88.89%	82.60%	50%	58.9%
Células T	26.09%	42%	22.70%	16.67%	11.11%	13.04%	35%	37.9%
No T/No B o células nulas	0%	0%	11.89%	5.56%	0%	4.35%	15%	3.20%
Numero de casos	92	99	185	18	11	48	24	95

8 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Se ha sugerido que las características morfológicas e inmunológicas del linfoma canino varían dependiendo de las distintas zonas geográficas mundiales.³⁴ Se han documentado diferencias morfológicas entre casos de linfoma canino en Europa con casos de linfoma canino en los Estados Unidos de América y en un estudio reciente se encontraron diferencias entre distintas zonas geográficas dentro de los Estados Unidos de América.³⁴ En humanos se ha determinado que en el América y Europa solamente del 10 % al 20 % de los linfomas tipo no Hodgkin tienen origen de células T, mientras que en Asia los linfomas de células T son más comunes.¹ En México no se ha realizado ningún estudio que establezca características histológicas e inmunofenotípicas en un sistema de clasificación. Lo que permitirá proporcionar las bases para estudios futuros sobre la determinación del pronóstico y tratamiento adecuados en esta zona geográfica.

En el ámbito mundial, existen pocos estudios en los que se establece el inmunofenotipo celular del linfoma canino, por lo que hace falta la realización de más estudios donde el inmunofenotipo sea determinado, debido a que la identificación precisa del tumor, es necesaria con el fin de proveer un programa óptimo para el manejo de esta neoplasia.

9 OBJETIVOS

1. Clasificar con base a las características histológicas e inmunofenotípicas al linfoma canino en México.
2. Determinar si existen diferencias basándose en las características histológicas e inmunofenotípicas entre México y otras dos regiones geográficas con estudios previos (Estados Unidos de América (EUA) y Europa).

10 HIPÓTESIS

Los resultados de la clasificación histológica e inmunofenotípica serán diferentes respecto a los resultados de otras clasificaciones realizadas en distintas zonas geográficas mundiales.

11 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 31 muestras de tejidos conservados en bloques de parafina de 31 casos de linfoma en perros del departamento de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México presentados de 1995 al año 2002, así como muestras de casos de linfoma recopilados de manera posterior a esa fecha, dichos casos fueron conservados en formol al 10% por un periodo de 48 horas y posteriormente fijados en parafina. Las muestras de los bloques de parafina fueron cortadas con un microtomo en un grosor de 4 μ m y teñidas con hematoxilina y eosina para el estudio histopatológico y fueron clasificadas de acuerdo a sus características histológicas, tomando como referencia el esquema de clasificación del *National Cancer Institute-Working Formulation (NCI-WF)*.³⁰ Los resultados del presente estudio, fueron analizados estadísticamente con la prueba de ji cuadrada con clasificaciones publicadas anteriormente por otros autores que utilizaron el sistema de clasificación NCI-WF basándose en el grado histológico bajo, intermedio y alto.

Las muestras, también fueron clasificadas con base a su inmunofenotipo, determinando su origen de células B o células T por medio de la técnica de inmunohistoquímica, demostrando la expresión de marcadores contra receptores de membrana de linfocitos del sistema CD, utilizando anticuerpos comerciales marca DAKO, anti-CD3 para linfocitos T y anti-CD79a (HM57) para linfocitos B, con una dilución de 1:100 para ambos anticuerpos (anexo 2). De cada caso, se realizaron conteos de las células malignas marcadas positivamente para CD3 y CD79a, en 5 campos con el objetivo seco fuerte (40X), promediando los resultados de los cinco conteos y estimando el porcentaje aproximado para cada población celular e identificando la población con características malignas. Los resultados del presente estudio, fueron analizados estadísticamente con la prueba

de ji cuadrada con clasificaciones publicadas anteriormente por otros autores que utilizaron el sistema de clasificación NCI-WF basándose en el origen celular T, B o no-T/no-B.

Los estudios de clasificación histológica y de clasificación inmunofenotípica anteriormente realizados además de ser analizados por separado con los resultados del presente trabajo, fueron clasificados por su origen en dos áreas geográficas: Europa y Estados Unidos de América, analizando así los resultados de México con dichas áreas geográficas.

Para el análisis estadístico, la prueba de ji cuadrada fue utilizada y una significancia de $P < 0.05$ fue establecida para el análisis de los datos. El programa de computo GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, Software Incorporated. San Diego, CA) fue utilizado para realizar el análisis estadístico.

12 RESULTADOS

De los 31 casos, 18/31 (58.06%) fueron machos y 13/31 (41.93%) fueron hembras. La edad promedio de presentación fue de 6.51 años con un rango de 2 a 12 años. Las razas con mayor frecuencia fueron: Mixto 4/31, Cocker Spaniel 3/31, Cobrador de Labrador 4/31, Rottweiler 3/31, Cobrador Dorado 2/31, Pastor Alemán 2/31, Schnauzer Gigante 2/31 (cuadro 8).

Histológicamente, los 31 casos seleccionados en el presente estudio, 6/31 (19.35%) fueron clasificados como linfoma linfocítico de células pequeñas, 1/31 (3.22%) como folicular mixto, 1/31(3.22%) como folicular de células grandes, 1/31(3.22%) como difuso de células pequeñas hendidas, 12/31(38.71%) como difuso de células grandes, 6/27 (19.35%) como Inmunoblástico, 3/31 (9.68%) como linfoblástico y 1/31(3.22%) como linfoma de células pequeñas no hendidas. Considerando el grado histológico, 22.57% de los casos corresponden a un grado bajo, 45.15% a un grado intermedio y 32.25% a un grado alto (Cuadro 5-Figura 1).

Inmunofenotípicamente 31 casos fueron clasificados en 13/31 (41.94%) en linfomas de células B, 15/31 (48.39%) como linfomas de células T y 3/31 (9.68%) como linfomas no-T/no-B o indeterminado. (Cuadro 6 – Figura 2, 3, 4 y 5)

Cuadro 5

Resultado de la clasificación histológica con el sistema NCI-WF

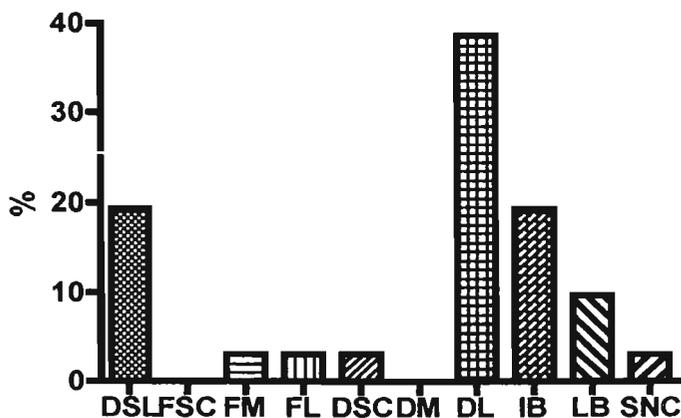
Categoría	Grado histológico	Número de casos	Porcentaje	Porcentaje considerando el grado
DSL	Bajo	6	19.35%	22.57%
FSC		0	0	
FM		1	3.22%	
FL	Intermedio	1	3.22%	45.15%
DSC		1	3.22%	
DM		0	0	
DL		12	38.71%	
IB	Alto	6	19.35%	32.25%
LB		3	9.68%	
SNC		1	3.22%	
MF		-	-	
Total		31	100 %	100%

DSL: Linfocítico o plasmacitoide de células pequeñas, FSC: Folicular predominantemente de células pequeñas hendidas, FM: Folicular mixto de células grandes y pequeñas, FL: Folicular predominantemente de células grandes, DSC: Difuso de células pequeñas hendidas, DM: Difuso mixto de células pequeñas y grandes, DL: Difuso de células grandes, IB: Inmunoblástico, LB: Linfoblástico, SNC: Células pequeñas no hendidas, MF: Micosis fungoides.

Grado bajo: DSL,FSC,FM. Grado intermedio: FL,DSC,DM,DL. Grado alto: IB,LB,SNC

Figura 1

Resultado de la clasificación histológica con el sistema NCI-WF



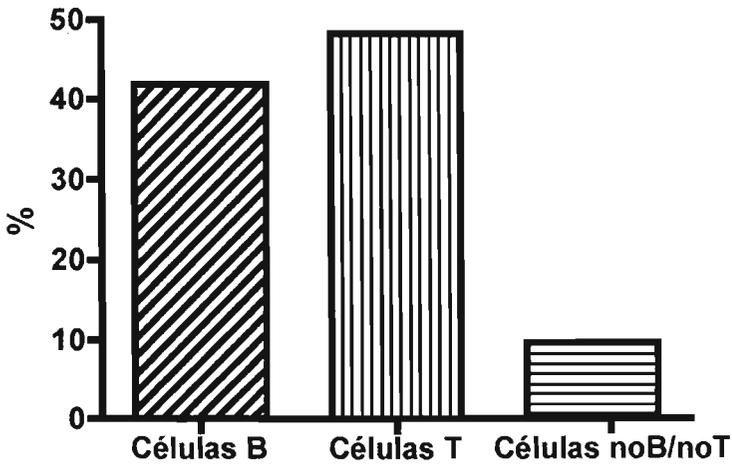
Cuadro 6

Resultado de la clasificación inmunofenotípica

	Número de casos	Porcentaje
Células B	13	41.94 %
Células T	15	48.39 %
Indeterminado (no-T/no-B)	3	9.68 %
Total	31	100 %

Figura 2

Resultado de la clasificación inmunofenotípica



De los 6 casos clasificados como linfoma difuso de células pequeñas o linfocítico, 2 fueron de inmunofenotipo B, 3 de células T y 1 no-T/no-B; 1 caso de linfoma folicular mixto de células T; 1 de células pequeñas hendidas de células T; 1 folicular de células grandes de células B; de los 12 casos de linfoma difuso de células grandes, 3 de células B y 9 de células T; 5 linfomas inmunoblásticos de células B y 1 caso no-B/no-T; de 3 linfoblásticos, 1 de células T, 1 de células B y 1 no-B/no-T; y un caso de linfoma de células pequeñas hendidas de células B. (Cuadro 7).

Cuadro 7
Relación de la clasificación histológica e inmunofenotipo

Categoría	Número de casos	Inmunofenotipo		
		B	T	no-B/no-T
DSL	6	2	3	1
FSC	0			
FM	1		1	
FL	1	1		
DSC	1		1	
DM	0			
DL	12	3	9	
IB	6	5		1
LB	3	1	1	1
SNC	1	1		
MF				
Total	31	13	15	3

DSL: Linfocítico o plasmacitoide de células pequeñas, FSC: Folicular predominantemente de células pequeñas hendidas, FM: Folicular mixto de células grandes y pequeñas, FL: Folicular predominantemente de células grandes, DSC: Difuso de células pequeñas hendidas, DM: Difuso mixto de células pequeñas y grandes, DL: Difuso de células grandes, IB: Inmunoblástico, LB: Linfoblástico, SNC: Células pequeñas no hendidas, MF: Micosis fungoides.

Grado bajo: DSL,FSC,FM.

Grado intermedio: FL,DSC,DM,DL. Grado alto: IB,LB,SNC.

Figura 4. Inmunohistoquímica de un linfoma inmunoblástico de inmunofenotipo celular B. El marcaje es positivo a CD79a (Figura 4-A) y negativo a CD3, en la muestra se observan algunas células T con marcaje positivo a CD3 presentes en el tejido (Figura 4-B).

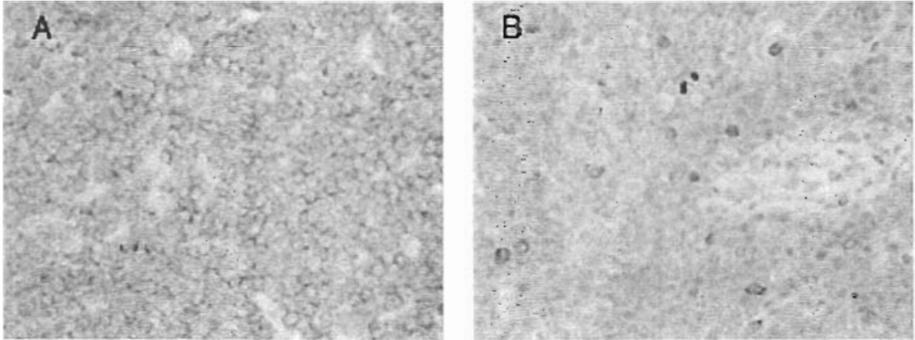


Figura 5. Inmunohistoquímica de un linfoma difuso de células grandes hendidas de inmunofenotipo celular T. El marcaje es negativo a CD79a (Figura 5-A) y positivo a CD3 (Figura 5-B).

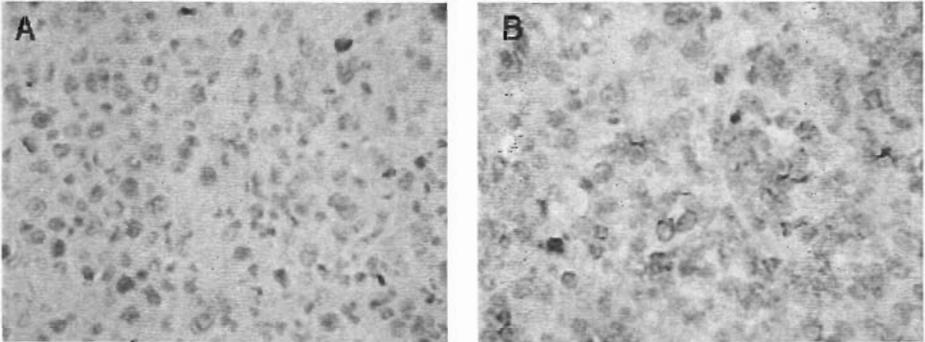
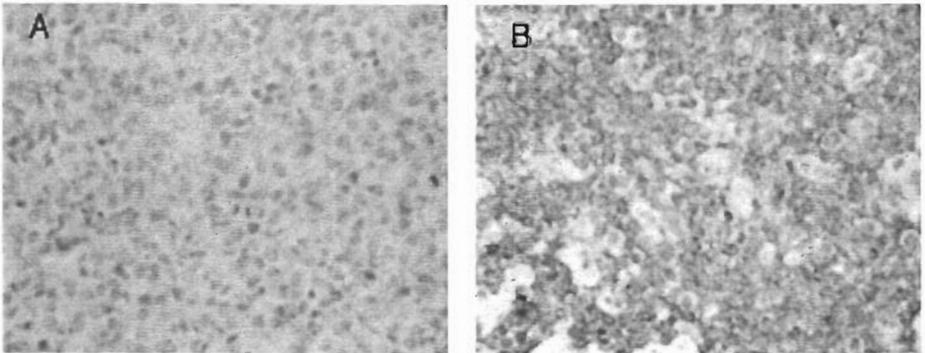


Figura 5. Inmunohistoquímica de un linfoma difuso de células grandes no hendidas de inmunofenotipo celular T. El marcaje es negativo a CD79a (Figura 6-A) y positivo a CD3 (Figura 6-B).



Cuadro 8
Clasificación histológica e inmunofenotípica, raza, sexo y edad de los 31 casos

Raza	Sexo
Akita	
Afgano	
Airedale Terrier	
Airedale Terrier	
Alaskan Malamute	
Bloodhound	
Cobrador de Labrador	
Cobrador de Labrador	
Cobrador Dorado	
Cobrador Dorado	
Cocker Spaniel	
Cocker Spaniel	
Cocker Spaniel	
Gran Danés	
Indeterminado	
Labrador	
Lobero Irlandés	
Mestizo	
Mestizo	
Mestizo	
Mestizo	
Pastor Alemán	
Pastor Belga	
Rottweiler	
Rottweiler	
Rottweiler	
Scotish Terrier	
Schnauzer Gigante	
Schnauzer Gigante	
Schnauzer miniatura	
Viejo Pastor Inglés	

DSL: Linfocítico o plasmacitoide de células pequeñas, FSC: Folicular predominantemente de células pequeñas y grandes, DL: Difuso de células grandes, IB: Inmunoblástico, LB: Linfoblástico.

M: macho, H: hembra

Grado bajo: DSL,FSC,FM. Grado intermedio: FL,DSC,DM,DL. Grado alto: IB,LB,SNC.

12.1 RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Histológicamente al comparar los resultados del presente estudio con los resultados de diferentes autores, se encontró una mayor proporción de linfomas de grado bajo con respecto a los demás estudios (Cuadro 9); y se encontró una diferencia estadísticamente significativa con los estudios de Carter⁴ (P<0.0001), Ruslander¹⁷ (P=0.0233) y Carter²⁹ (P<0.0001) y no se encontró una diferencia estadística con los demás estudios en comparación (Cuadro 10-Figura 4). Al comparar los resultados con los estudios realizados en las dos áreas geográficas en comparación, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con la región de Estados Unidos de America (P<0.0001) mientras que no se encontró una diferencia estadística con la región de Europa (P=0.5984) (Cuadro11-Figura 5).

Inmunofenotípicamente, en este estudio se encontró una mayor proporción de linfomas de origen celular T (CD3 +); encontrándose una diferencia estadísticamente significativa con los autores Fournel¹³ (P=0.0001), Ferrer²⁹ (P=0.0033), Kosarek⁴⁰ (P=0.0376), Cinniatti⁴² (0.0001), Fisher¹¹ (P=0.0113), Dobson³¹ (P=0.0001) y Teske³⁸ (P=0.106) (Cuadro 12-Figura 6). Al comparar los resultados con las dos áreas geográficas, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con la región de Europa (P=0.001) y no se encontró una diferencia significativa con la región de Estados Unidos de América (P=0.1158) (Cuadro 13-Figura 7).

Cuadro 9

Comparación de la clasificación histológica con resultados de otros autores

Categoría	Greenle ²³	Carter ²⁵	Teske ³⁸	Ferrer ²⁹	Fournel ³⁶	Ruslander ¹⁷	Carter ³⁹	Resultados en el presente estudio
DSL	10.2%	4.9%	0.0%	14.14%	13.04%	0%	4.4%	19.35%
FSC	0%	0%	12%	0%	1.08%	0%	0.4%	0
FM	1.1%	0.4%	4.4%	0%	0%	0%	0.4%	3.22%
FL	3.4%	0.4%	31%	4.04 %	0%	0%	0.2%	3.22%
DSC	3.4%	5.9%	8.6%	0 %	0%	0%	5.2%	3.22%
DM	5.1%	2.1%	5.2%	16.16%	1.08%	7.69%	1.8%	0
DL	48.3%	20.0%	30.2%	29.29%	51.12%	30.77%	14.4%	38.71%
IB	25.6%	24.9%	6%	11.11%	14.13%	7.69%	21.5%	19.35%
LB	0.6%	17.2%	0%	7.07%	1.08%	53.85%	17.1%	9.68%
SNC	3.2%	24.2%	0%	3.03%	4.34%	0%	34.6%	3.22%
MF	-	-	1.7%	15.15%	14.13%	-	-	-
n	176	285	116	99	92	11	543	31

DSL: Linfocítico o plasmáticos de células pequeñas, FSC: Folicular predominantemente de células pequeñas hendidas, FM: Folicular mixto de células grandes y pequeñas, FL: Folicular predominantemente de células grandes, DSC: Difuso de células pequeñas hendidas, DM: Difuso mixto de células pequeñas y grandes, DL: Difuso de células grandes, IB: Inmunoblástico, LB: Linfoblástico, SNC: Células pequeñas no hendidas, MF: Micosis fungoides.

Grado bajo: DSL,FSC,FM. Grado intermedio: FL,DSC,DM,DL. Grado alto: IB,LB,SNC.

n: número de casos.

Cuadro 10**Comparación de la clasificación histológica con resultados de otros autores basándose en el grado histológico**

	N	Grado bajo (%)	Grado intermedio (%)	Grado alto (%)	Misceláneo (%)	Región de Origen	Valor de ji Cuadrada	Significancia	Diferencia estadística
Resultados en el presente trabajo	31	22.57	45.15	32.25	0.00	México			
Greenle ²³	176	11.30	60.20	29.40	0.00	EUA	0.3624	0.5472	No
Carter ²⁵	285	5.30	28.40	66.30	0.00	EUA	19.14	< 0.0001	Si
Teske ³⁸	116	16.40	75	6.0	1.70	Europa	1.941	0.1636	No
Ferrer ²⁹	99	14.14	49.49	21.21	15.15	Europa	2.361	0.1244	No
Foumel ³⁶	92	14.12	51.12	19.55	14.13	Europa	1.816	0.1778	No
Ruslander ¹⁷	15	0.00	38.46	61.54	0.00	EUA	5.149	0.0233	Si
Carter ³⁹	543	5.20	21.60	73.20	0.00	EUA	28.68	< 0.0001	Si

Cuadro 11**Comparación de la clasificación histológica con resultados de otros autores, considerando el área geográfica y basándose en el grado histológico.**

	N	Grado bajo (%)	Grado intermedio (%)	Grado alto (%)	Misceláneo (%)	Valor de ji Cuadrada	Significancia	Diferencia estadística
Resultados en el presente trabajo	31	22.57	45.15	32.25	0.00			
Europa ^{29,36,38}	275	15.08	60.32	15.08	9.51	0.9354	0.3334	No
EUA ^{17,23,25,39}	1029	5.45	33.07	57.61	0.00	51.15	<0.0001	Si

Figura 4
Comparación de la clasificación histológica con resultados de otros autores basándose en el grado histológico

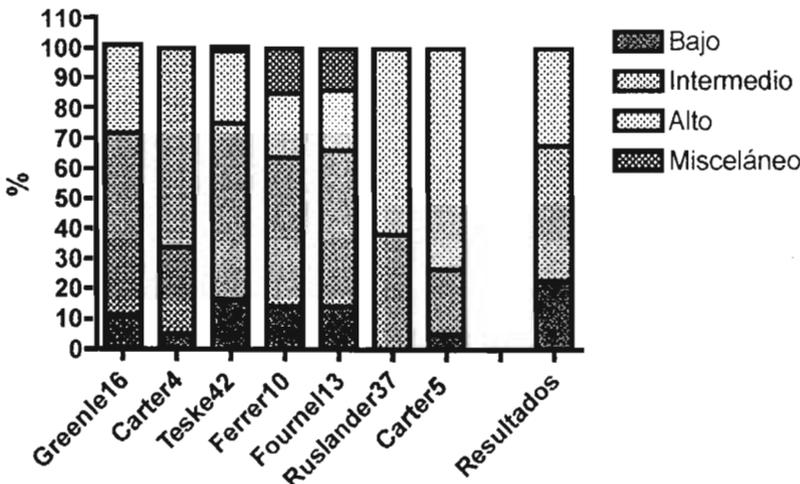
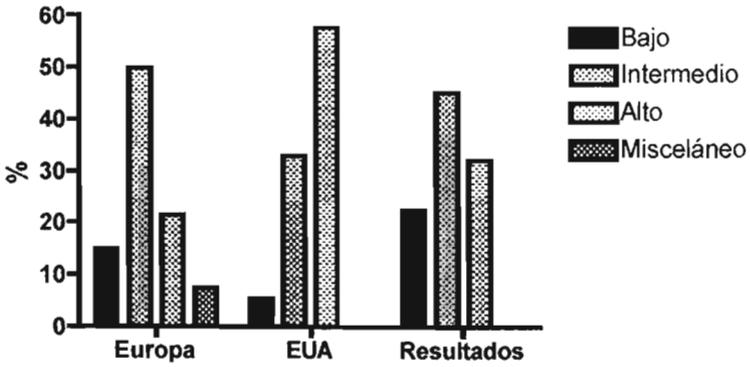


Figura 5
Comparación de la clasificación histológica con resultados de otros autores, considerando el área geográfica y basándose en el grado histológico.



Cuadro 12**Comparación de los resultados del inmunofenotipo con otros autores**

	Número de casos	Células B (%)	Células T (%)	No-B/no-T (%)	Región de Origen	Valor de ji Cuadrada	Significancia	Diferencia estadística
Resultados del trabajo	31	41.94	48.39	9.68				
Fournel ³⁸	92	73.91	26.09		Europa	23.37	0.0001	Si
Ferrer ²⁹	99	58	42		Europa	8.652	0.0033	Si
Kosarek ⁴⁰	185	65.41	22.70	11.89	EU	4.322	0.0376	Si
Caniatti ⁴²	18	77.78	16.67	5.56	Europa	18.43	0.0001	Si
Fisher ⁴³	11	88.89	11.11		EU	45.34	0.0001	Si
Dobson ³¹	48	82.60	13.0	4.35	Europa	25.55	0.0001	Si
Bumett ⁴⁵	24	50	35	15	EU	0.1539	0.8627	No
Teske ³⁹	95	58.90	37.90	3.20	Europa	6.525	0.0106	Si

Cuadro 13**Comparación de los resultados del inmunofenotipo con resultados de otros autores, considerando el área geográfica.**

	Número de casos	Células B (%)	Células T (%)	No-B/no-T (%)	Valor de ji Cuadrada	Significancia	Diferencia estadística
Resultados en el presente estudio	31	41.94	48.39	9.68			
Europa ^{29,31,36,38,42}	374	62.83	29.68	1.60	10.88	0.001	Si
EU ^{40,43,45}	220	65.00	23.18	11.82	2.473	0.1158	No

Figura 6
Comparación de los resultados del inmunofenotipo con otros autores.

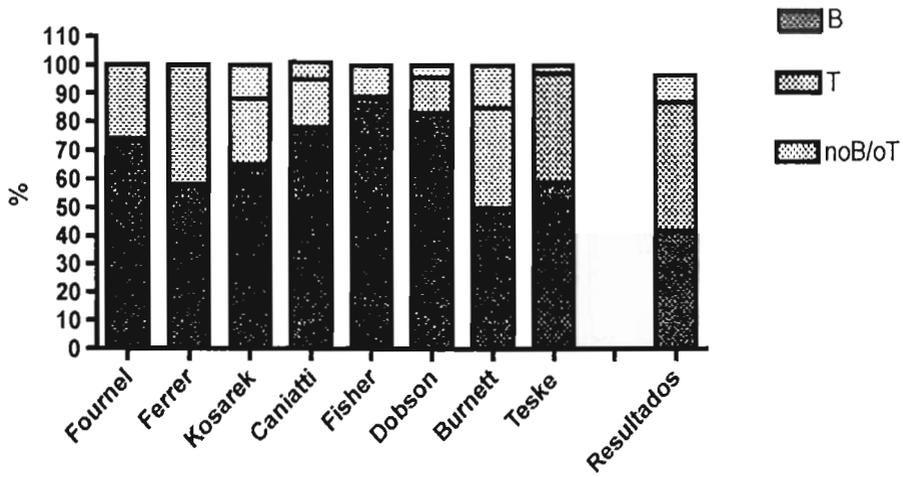
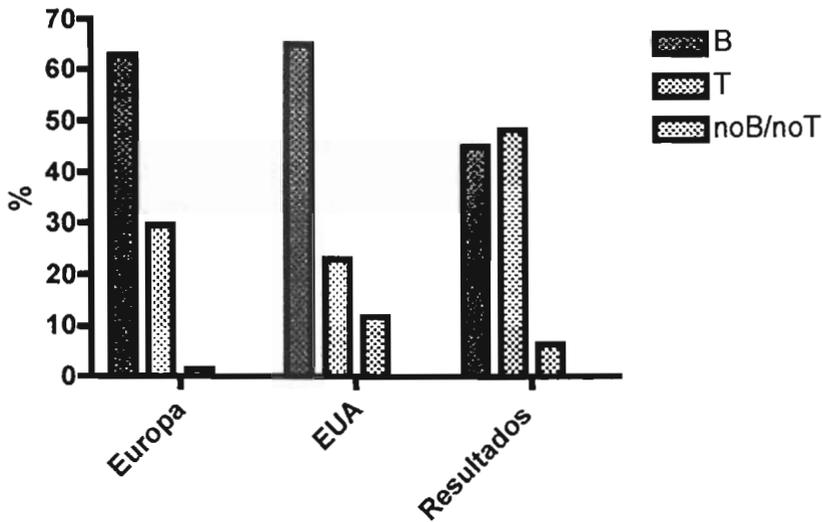


Figura 7
Comparación de los resultados del inmunofenotipo con resultados de otros autores, considerando el área geográfica.



13 DISCUSIÓN

En la actualidad, se han desarrollado diversos sistemas de clasificación del linfoma de tipo no Hodgkin, sin embargo solamente los sistemas de clasificación de *Kiel* y del *NCI-WF*, han demostrado tener una mayor utilidad en la clasificación del linfoma canino.^{4,10,23,25} En el presente estudio fue seleccionado el sistema del *NCI-WF*, por su mayor aceptación y difusión en México así como en otras regiones.^{17,23,25,29,36,39,46} De los casos presentados, al evaluar estadísticamente los datos del presente estudio con los estudios de otros autores, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con tres estudios realizados en Estados Unidos de América, mientras que no se encontró diferencia con el resto de los estudios evaluados. Al comparar los resultados con las dos áreas geográficas establecidas (EUA y Europa), se encontró una diferencia estadísticamente significativa con la región de EUA, mientras que no se encontró diferencia con la de Europa. Dicha diferencia puede ser debida a que en el presente estudio, 22.57% fueron clasificados de grado bajo, encontrando mayor cantidad de estos de grado bajo con respecto a otros estudios, que encontraron una menor frecuencia de casos de grado bajo (Cuadro 10),^{17,23,25,29,36,39,46} donde se informa entre 0% y 14.14% de casos de bajo grado, observándose una mayor diferencia con los estudios realizados en la zona geográfica de EUA que con los estudios realizados en Europa, sin embargo la mayoría de los casos fueron clasificados dentro de los linfomas de grado intermedio a alto, lo que coincide con los resultados de todos los autores en otros estudios (ver cuadro 10),^{17,23,25,29,36,39,46} lo que sugiere que en México como en otras áreas geográficas, la mayoría de los casos de linfoma canino, presenta un grado histológico de intermedio a alto, sin embargo, los resultados en este estudio sugieren una mayor proporción de casos de grado bajo. Como se ha mencionado, el sistema de clasificación *NCI-WF* no es un sistema ideal de clasificación histológica del linfoma canino, razón por la que pudieran encontrarse diferencias con otras zonas geográficas, por lo que se sugiere la evaluación con nuevos sistemas como la *Clasificación Histológica Internacional de Tumores Hematopoyéticos y Tejidos Linfoides de la Organización Mundial de la Salud*, sea utilizada para corroborar los hallazgos encontrados. Los anticuerpos utilizados en este trabajo: anti-CD3 y anti-CD79a (HM57) (Dako), demostraron su funcionalidad en la inmunofenotipificación de los tejidos de linfoma canino preservados en parafina como había sido validado anteriormente por otros autores.^{18,21,22,29,31,33-36,40,41} Al evaluar los resultados del inmunofenotipo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con siete de los ocho estudios realizados, en cinco regiones europeas y en dos de EUA. Al comparar los resultados con las dos regiones geográficas establecidas, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con la región de Europa; no encontrándose dicha diferencia con la de EUA. Esta diferencia pudiera estar dada debido a que en comparación con Europa y con EUA, en el presente estudio, se encontró un mayor porcentaje de casos de linfoma de origen celular T que de origen B.^{29,31,36,40,42,43,45} (ver cuadro 12), lo que sugiere que en México exista una proporción mayor de casos de linfoma canino de células T; sin embargo estudios con un mayor número de casos se deben realizar para confirmar dicha afirmación. Por otro lado, en México se encontró un mayor porcentaje de linfomas de células

no-T/no-B o células nulas con respecto a las dos zonas geográficas, diferencia más notoria con los estudios de Europa, lo que sugiere que en México o en América exista una mayor proporción de casos de células no-B/ no-T. En tres casos del presente trabajo, uno clasificado histológicamente como linfoma linfoblástico, uno como inmunoblástico y otro como linfoma linfocítico, no se logró marcar para ninguno de los anticuerpos utilizados (CD3 y CD79a), clasificándose como células nulas o no-B/no-T. Una baja incidencia de linfomas no-B/no-T, ha sido informada anteriormente independientemente del tipo histológico^{31,40,42,45}, fenómeno que también ha sido reconocido en linfoma tipo no Hodgkin en humanos donde se atribuye que el origen de este tipo de linfomas es a partir de células naturales citocidas o NK, para su confirmación sería necesario la utilización de otros anticuerpos específicos para antígenos de membrana de las células NK, siendo en humanos el CD56, CD94 y CD16⁴⁷ sin embargo dichos antígenos, en la revisión de la literatura realizada hasta este momento, no han sido utilizados en perros, desconociéndose si existe una reactividad cruzada entre ambas especies.^{31,36,42,43} Una segunda posibilidad del marcaje negativo a CD3 y CD79a, es que su origen fuera a partir de células precursoras B o inmaduras T, las cuales en este estado, no presentan la expresión de CD79a y CD3 en sus membranas, con lo que sería necesario utilizar marcadores de membrana específicos para la expresión de antígenos de membrana en estas fases celulares, en humanos se informa la utilización de CD9 y CD10 para linfocitos precursores B y células pre-B⁴⁷ así como CD44, CD25 y CD117 para precursores tempranos de linfocitos T y linfocitos inmaduros T,⁴⁷ en un estudio (Greenle 1990),²³ en cinco casos fue utilizado como marcador el CD25, de los cuales todos fueron negativos, con lo que no puede determinarse su utilidad en perros. El CD9, CD10, CD44 y CD 117 no han sido utilizados en el perro en la revisión de literatura realizada hasta este momento.^{31,36,42,43} O bien, una posible causa es la presencia de linfocitos malignos anaplásicos o pobremente diferenciados que no expresen las mismas moléculas o proteínas que las células bien diferenciadas. Otra posibilidad del resultado negativo tanto a CD3 como a CD79a, es el de una fijación inadecuada de la muestra, que hubiera causado daños estructurales a los antígenos de membrana, causando que los anticuerpos no reconocieran a dichos antígenos, el presente estudio, al ser de carácter retrospectivo, carece de control sobre la fijación y manejo de la muestra antes de ser procesada en parafina. Dos casos presentaron marcaje positivo a ambos anticuerpos, existen informes de linfomas linfoblásticos T, que demuestran la expresión conjunta de CD3 y CD79a en la misma célula,⁴¹ sin embargo, en estos casos, las células malignas fueron reconocidas como positivas para los marcadores específicos y existía una predominancia en el porcentaje en la expresión de alguno de los antígenos de membrana, por lo que fueron clasificados en linfomas B o T dependiendo de las células neoplásicas predominantes de cada marcador, con un estimado de 60% de células B con características neoplásicas, en uno de los casos, y 50% de células B neoplásicas en el segundo caso, este criterio ha sido tomado por otros autores.^{31,42} La utilización únicamente del criterio morfológico para la clasificación del linfoma canino, ha demostrado ser inadecuado en previos estudios.⁴⁸ La utilización del inmunofenotipo, ya sea por la técnica de inmunohistoquímica o citometría de flujo, ha demostrado ser de gran ayuda en el diagnóstico a través de la identificación de

marcadores específicos de líneas celulares. Recientemente ha sido demostrado que en la mayoría de los linfomas y leucemias en humanos, existen perfiles de expresión génica que caracterizan a los diferentes tipos de estas neoplasias, además, dentro de los distintos tipos histológicos e inmunofenotípicos de linfoma y leucemia, diferentes subtipos pueden ser identificados en base al perfil de expresión génica.^{49,50} Hasta el conocimiento de los autores, en medicina veterinaria, solamente un estudio en el perfil de expresión génica del linfoma canino esta siendo efectuado actualmente en los Estados Unidos de América,⁴⁹ siendo investigaciones poco comunes y de alto costo. En el futuro, este tipo de proyectos podrían ser realizados con mayor facilidad, obteniendo así una mejor clasificación del linfoma canino basado en características histológicas, inmunofenotípicas y genéticas.

14 CONCLUSIONES

1. El sistema de clasificación del *NCI-WF* es aplicable al linfoma canino para su identificación histológica, siendo uno de los sistemas mas utilizados en diversas áreas geográficas, sin embargo no es un sistema ideal de clasificación para el linfoma canino.

2. La técnica de inmunohistoquímica realizada en este trabajo (anexo 2) es válida para la utilización de los marcadores de membrana anti-CD3 y anti-CD79a para la clasificación inmunofenotípica del linfoma canino. De acuerdo a los resultados mostrados en el presente estudio se sugiere la utilidad de los marcadores CD3 y CD79a en una dilución de 1:100 utilizando la técnica de inmunohistoquímica descrita (ver anexo 2), para la identificación inmunofenotípica de casos de linfoma canino, que pudiera servir como indicador en el pronóstico y tratamiento en estos pacientes, sugiriendo la necesidad de realizar este tipo de estudios en los casos de linfoma canino.

3. Los resultados indican diferencias con respecto a otros informes en diferentes áreas geográficas, tanto Europa como Estados Unidos de América: histológicamente se encontró diferencia estadísticamente significativa con los Estados Unidos de América, encontrándose un mayor número de linfomas de grado bajo, específicamente linfoma de células pequeñas o linfocítico, sin embargo, la mayoría fue clasificada como linfomas de intermedio a alto grado histológico; inmunofenotípicamente, se encontró una mayor proporción de casos de linfoma de células T con respecto a otras áreas geográficas, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa con la región de Europa. Un mayor número de casos en México debe de ser evaluado, para corroborar los hallazgos de este trabajo.

15 LITERATURA CITADA

1. Teske E: Canine Malignant Lymphoma: A Review and Comparison with Human Non-Hodgkin's Lymphoma. *Vet Q* 1994. 16: 209-219.
2. Couto CG: Canine Lymphomas: Something Old, Something New. *Compend Cont Ed Pract Vet* 1985. 7: 291-302.
3. Hahn KA, Richardson RC, Hahn EA, Crisman CL: Diagnostic and Prognostic Importance of Chromosomal Aberrations Identified in 61 Dogs with Lymphosarcoma. *Vet Pathol* 1994. 31:528-540.
4. Vonderhaar MA, Morrison WB: Lymphosarcoma. En: *Cancer in Dogs and Cats*, Wallace B. Morrison (Ed) Williams and Wilkins, Baltimore EUA, 1998, pp.667-695.
5. Nelson RW, Couto GC: Lymphosarcoma in the Dog and Cat. En: *Small Animal Internal Medicine* R.W. Nelson, C.G. Couto (Ed). Mosby, 2a Edición, St. Louis, EUA, 1998, pp.1123-1133.
6. Ogilvie GK, Moore AS: Lymphoma. En: GK Ogilvie, AS Moore. *Managing the Veterinary Cancer Patient*. (Ed) Trenton: Veterinary Learning Systems. EUA, 1995.
7. Teske E, de Vos JP, Egberink HF, Vos JH: Clustering in Canine Malignant Lymphoma. *Vet Q* 1994. 2:134-136.
8. Capurro C, Buracco P, Rossi L. Lymphoma in Dogs. *European Journal of Companion Animal Practice*. 1992, 2(2):7-19
9. Grindem CB, Buoen LC: Cytogenetic Analysis of Leukaemic Cells in the Dog. A Report of 10 Cases and a Review of the Literature. *J Comp Path* 1986. 96: 623-635.
10. Vail DM, MacEwen EG, Young KM: Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemias. En: *Small Animal Clinical Oncology*, S.J. Withrow, E.G. MacEwen (Ed). W. B. Saunders Company, 3a Edición, Philadelphia, EUA, 2001, pp.558-590.
11. Gavazza A, Presciuttini S, Barale R, Lubas G, Gugliucci B: Association Between Canine Malignant Lymphoma, Living in Industrial Areas, and Use of Chemicals by Dog Owners. *J Vet Intern Med* 2001. 15: 190-195.
12. Hayes HM, Tarone RE, Cantor KP: On the Association Between Canine Malignant Lymphoma and Opportunity Exposure to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Environmental Res* 1995. 60: 119-125.

13. Kaneene Jb, Miller RA: Re-Analysis of 2,4-D Use and Occurrence of Canine Malignant Lymphoma. *Vet Human Toxicol* 1999. 41: 164-170.
14. Reif JS, Lower KS, Ogilvie GK: Residential Exposure to Magnetic Fields and Risk of Canine Lymphoma. *Am J Epidemiol* 1995. 141:352-359.
15. Madewell BR. Canine Lymphoma. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract* 1985. 15(4): 709-722
16. Safran N, Perk K, Eyal O: Isolation and Preliminary Characterization of a Novel Retrovirus Isolated from a Leukaemic Dog. *Res Vet Scie* 1992. 52:250-255.
17. Ruslander D, Moore AS, Gliatto JM, L'Heureux D, Cotter SM: Cytosine Arabinoside as a Single Agent for the Induction of Remission in Canine Lymphoma. *J Vet Inter Med* 1994. 8(4):299-301.
18. Keller ET: Immune-Mediated Disease as a Risk Factor for Canine Lymphoma. *Cancer* 1992. 70: 2334-2337.
19. Foster AP, Sturgess CP, Gould DJ, Iwasaki T, Day MJ: Pemphigus Foliaceus in Association with Systemic Lupus Erythematosus, and Subsequent Lymphoma in a Cocker Spaniel. *J Small Anim Pract* 2000. 41: 266-270.
20. Helfand SC, Couto CG, Madewell BR: Immune-Mediated Thrombocytopenia Associated with Solid Tumors in Dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1985. 21:787-794.
21. Day MJ: Immunophenotypic Characterization of Cutaneous Lymphoid Neoplasia in the Dog and Cat. *J Comp Path* 1995. 112: 79-96.
22. Vernau B, Moore P: Immunophenotyping in the Dog. *Veterinary Cancer Society Newsletter* 2001. 25(1):1-10.
23. Greenlee, P.G., Filippa, D.A., Quimby, F.W., Patnaik, A.K., Calvano, S.E., Matus, R.E., Kimmel, M., Hurvitz, A.I. and Lieberman, P.H: Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 1990. 66:480-490.
24. Rosenthal RC: The Treatment of Multicentric Canine Lymphoma. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1990. 20 (4): 1093-1102.
25. Carter RF, Valli VE, Lumsden JH: The Cytology, Histology and Prevalence of Cell Types in Canine Lymphoma Classified According to

- the National Cancer Institute Working Formulation. *Can J Vet Res* 1986, 50:154-164.
26. Morris JS, Dunn JK, Dobson JM: Canine Lymphoid Leukemia and Lymphoma with Bone Marrow Involvement: A Review of 24 Cases. *J Small Anim Practice* 1993. 34:72-79
 27. Cotter SM: Treatment of Lymphoma and Leukemia With Cyclophosphamide, Vincristine and Prednisone. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983. 19:159-165.
 28. Keller ET, MacEwen EG, Rosenthal RC, Helfand SC, Fox LE: Evaluation of Prognostic Factors and Sequential Combination Chemotherapy With Doxorubicin for Canine Lymphoma. *J Vet Internal Med* 1993. 7: 289-295.
 29. Ferrer L, Fondevila D, Rabanal R, Tarres J, Ramis A: Immunohistochemical detection of CD3 Antigen (Pan T Marker) in Canine Lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 1993 5:616-620.
 30. National Cancer Institute. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project: National Cancer Institute Sponsored Study of Classifications of Non-Hodgkin's Lymphomas: Summary and Description of a Working Formulation for Clinical Usage. *Cancer* 1982.49: 2112-2135.
 31. Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P, Hoather TM, Tom BDM: Prognostic Variables in Canine Multicentric Lymphosarcoma. *J Small Anim Pract* 2001. 42: 377-384.
 32. Page R. Canine and Feline Lymphoma: Review of Prognostic Factors and Treatment Options. 26th World Congress Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association, 2001: 546-548.
 33. Kiupel M, Teske E, Bostok D: Prognostic Factors for Treated Canine Malignant Lymphoma. *Vet Pathol* 1999, 36:292-300.
 34. Raskin RE, Fox LE: An Interim Analysis of Geographic Differences in Morphology and Immunophenotype from 138 Cases of Canine Lymphoma. Mid-year Conference Proceedings of the Veterinary Cancer Society, 2002: 11.
 35. Teske E: Prognostic Factors for Malignant Lymphoma in the Dog: an Update. *Vet Q* 1994.16: 29s-31s.
 36. Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Marchal T, Chabanne B, Delverdier A, Byron PA, Felman P: Cytohistological and Immunological

- Classification of Canine Malignant Lymphomas: Comparison with Human Non-Hodgkin's Lymphomas. *J Comp Path* 1997. 117:35-59.
37. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF: Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals. Ed Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, USA, 2002.
 38. Teske E, Wisman P, Moore PF, van Heerde P.: Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. 1994 *Exp Hematol* 22(12):1179-87.
 39. Carter RF, Valli VE. Advances in the Cytology Diagnosis of Canine Lymphoma. *Seminars in Vet Medicine Surgery* 1988. 3 (3): 167-168.
 40. Kosarek CE, Kisseberth WC, Kociba GJ. Use of Microarrays for Analysis of Canine Lymphoma. *Proceedings of the 22nd Annual Conference of the Veterinary Cancer Society*, 2002: 22.
 41. Thomas R, Smith KC, Gould R, Gower SM, Binns MM, Breen M: Molecular Cytogenetic Analysis of a novel High-grade Canine T-Lymphoblastic Lymphoma Demonstrating Co-expression of CD3 and CD79a Cell Markers. *Chromosome Res* 2001. 9:649-657.
 42. Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF: Canine Lymphoma: Immunocytochemical Analysis of Fine-needle Aspiration Biopsy. *Vet Pathol* 1996. 33:204-212.
 43. Fisher DJ, Naydan D, Werner LL, Moore PF: Immunophenotyping Lymphomas in Dogs: A Comparison of Results From Fine Needle Aspirate and Needle Biopsy Samples. *Vet Clin Path* 1995. 24:118-123.
 44. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA: *En: Kuby Immunology*. Ed Freeman and Company, 4^a Edición. New York, USA, 2000.
 45. Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, Olver CS, Moore PF, Avery AC: Diagnosis of Canine Lymphoid Neoplasia Using Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes. *Vet Pathol* 2003. 40:32-41.
 46. Milner RJ, Pearson J, Nesbit JW, Close P: Immunophenotypic Classification of Canine Malignant Lymphoma on Formalin-Fixed Paraffin Wax-Embedded Tissue by Means of CD3 and CD79a Cell Markers. *Onderstepoort J Vet Res* 1996. 63:309-313.

47. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: En: *Inmunología Celular y Molecular* (Ed) Interamericana-McGraw Hill. 3ª edición, Madrid España, 1999 pp 71-101, 186-210, 519-526.
48. Vernau W, Moore PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 69:145-164, 1999.
49. Kisseberth WC. Gene expression profiling of relapsed lymphoma in dogs. MAF Project No.: D03CA-132.
50. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503-511, 2000.

Anexo 1

Clasificación Histológica de los Linfomas Tipo No Hodgkin de Kiel

Linfomas de bajo grado

- Linfocítico
 - Células B, células T
 - Micosis fungoides, Síndrome de Sézary
- Linfoplasmacítico, linfoplasmacitoide (LP-inmunocitoma)
 - Plasmacítico (Plasmacitoma)
 - Centrocítico
 - Centroblastico / centrocítico
 - Folicular / difuso

Linfomas de alto grado

- Centroblastico
 - Puro
 - Polimórfico
 - Centrocitoide
- Linfoblástico
 - Células B, células T
 - Tipo Burkitt
 - Células convultas
- Inmunoblástico
- Inclasificable de alto grado

Clasificación Histológica de los Linfomas Tipo No Hodgkin del National Cancer Institute – Working Formulation

- Linfomas de bajo grado
 - Linfocítico o plasmáticos de células pequeñas
 - Folicular predominantemente de células pequeñas hendidas
 - Folicular mixto de células grandes y pequeñas
- Linfomas de grado intermedio
 - Folicular predominantemente de células grandes
 - Difuso de células pequeñas hendidas
 - Difuso mixto de células pequeñas y grandes
 - Difuso de células grandes (hendidas / no hendidas)
- Linfomas de alto grado
 - Inmunoblástico
 - Linfoblástico
 - Células pequeñas no hendidas (Tipo Burkitt's)
- Misceláneos
 - Micosis fungoides
 - Histiocítico
 - Plasmacitoma extramedular
 - Inclasificable

Clasificación Histológica Internacional de Neoplasias Hematopoyéticas en Especies Domésticas de la Organización Mundial de la Salud

Tumores del Sistema Linfoide

- 1 Neoplasias Linfoides de Células B
 - 1.1 Neoplasias de células B precursoras
 - 1.1.1 Linfoma / leucemia linfoblástica de células B
 - 1.2 Neoplasias de células B maduras
 - 1.2.1 Linfoma / leucemia linfocítica crónica de células B
 - 1.2.2 Linfoma linfocítico de células B de tipo intermedio (LLI)
 - 1.2.3 Linfoma linfoplasmacítico (LPL)
 - 1.2.4 Linfomas foliculares
 - 1.2.4.1 Linfoma de células del manto (MCL)
 - 1.2.4.2 Linfoma folicular de células centrales I
 - 1.2.4.3 Linfoma folicular de células centrales II
 - 1.2.4.4 Linfoma folicular de células centrales III
 - 1.2.4.5 Linfoma nodal de la zona marginal
 - 1.2.4.6 Linfoma esplénico de la zona marginal
 - 1.2.5 Linfoma extranodal de células B de la zona marginal asociado a la mucosa de tejido linfoide (Linfoma MALT)
 - 1.2.6 Linfoma de células *hairy*
 - 1.2.7 Tumores plasmacíticos
 - 1.2.7.1 Plasmacitoma indolente
 - 1.2.7.2 Plasmacitoma anaplásico
 - 1.2.7.3 Mieloma de células plasmáticas
 - 1.2.8 Linfoma de células B grandes
 - 1.2.8.1 Linfoma de células B enriquecido en células T
 - 1.2.8.2 Linfoma inmunoblástico de células grandes
 - 1.2.8.3 Linfoma de células B grandes difuso (hendidadas y no hendidadas)
 - 1.2.8.4 Linfoma tímico de células B (B mediastínico)
 - 1.2.8.5 Linfoma intravascular de células B grandes
 - 1.2.9 Linfoma tipo Burkitt
 - 1.2.9.1 Linfoma de alto grado de células B tipo Burkitt
- 2 Neoplasias Linfoides de Células T y Células NK
 - 2.1 Neoplasias de células T precursoras
 - 2.1.1 Linfoma / leucemia linfoblástico de células T
 - 2.2 Neoplasias de células T y células NK maduras
 - 2.2.1 Desórdenes linfoproliferativos de células granulares grandes (LGL)
 - 2.2.1.1 Leucemia linfocítica crónica de células T
 - 2.2.1.2 Linfoma / leucemia de células T LGL
 - 2.2.1.3 Leucemia linfocítica crónica de células NK
 - 2.2.2 Neoplasias cutáneas de células T
 - 2.2.2.1 Linfoma cutáneo epiteliotrópico (CEL)
 - 2.2.2.1.1 CEL, tipo micosis fungoides

- 2.2.2.1.2 CEL, tipo reticulosis pagetoide
 - 2.2.2.2 Linfoma cutáneo no epiteliotrópico
 - 2.2.3 Linfoma extranodal / periférico de células T (PTCL)
 - 2.2.3.1 PTCL de tipo linfoide mixto
 - 2.2.3.2 PTCL de tipo linfoide inflamatorio
 - 2.2.4 Linfoma / leucemia adulto tipo células T
 - 2.2.5 Linfoma angioinmunoblástico (AILD)
 - 2.2.6 Linfoma angiotrópico
 - 2.2.6.1 Linfoma angiocéntrico
 - 2.2.6.2 Linfoma angioinvasivo
 - 2.2.7 Linfoma intestinal de células T
 - 2.2.8 Linfoma anaplásico de células grandes (ALCL)
- 3 Tumores Misceláneos
- 3.1 Tumores de células cebadas
 - 3.2 Linfoma tipo Hodgkin
 - 3.3 Timoma
 - 3.4 Carcinoma tímico
 - 3.5 Mielolipoma
 - 3.6 Histiocitoma maligno fibroso
- 4 Proliferaciones Linfoides Benignas
- 4.1 Hiperplasia linfoide folicular
 - 4.2 Hiperplasia linfoide folicular atípica
 - 4.3 Hiperplasia linfoide paracortical

Anexo 2

Técnica de inmunohistoquímica utilizada

De los bloques de parafina, se realizaron cortes de 4µm de grosor, montándose sobre el cubreobjetos, posteriormente se realizó el marcaje por la técnica de inmunohistoquímica:

1. Desparafinación de los cortes:
 - 60° C en incubadora seca eléctrica durante 30 minutos.
 - 3 cambios de Xilol de 3 minutos cada uno.
 - Acetona 3 minutos
 - Alcohol absoluto 3 minutos
2. Inhibición de la peroxidasa endógena:
 - Solución de 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30% por cada 100 ml de metanol, por un periodo de 30 minutos.
 - Sumergir en alcohol al 96% 5 segundos
 - Lavar con agua corriente por 5 minutos
 - Agua destilada por 3 minutos
3. Exposición de antígenos:
 - Para CD3:
 - i. Solución de citratos (1 litro de agua destilada, 2.1 gr de ácido cítrico, 13 ml de hidróxido de sodio) con pH de 5.7 a 6.0
 - Para CD79a:
 - i. Solución alcalina (10 mmol/L Tris buffer, 1 ml mmol/ EDTA) con pH 9.0
 - Se utiliza un contenedor con tapa
 - Microondas por 3 minutos (80 power)
 - Reposar 1 minuto
 - Microondas por 3 minutos (80 power), alcanzando 90° C aproximadamente
 - Reposar 40 minutos
 - Enjuagar agua corriente 1 minuto
 - Sumergir en agua destilada por 10 minutos
4. 2 cambios de 5 minutos cada uno en solución de Buffer (BFS) (6.17 g de fosfato de sodio dibásico, 0.89 g de fosfato de sodio monobásico, 9 g de cloruro de sodio y cbp un litro de agua destilada)
5. Bloqueo de la unión no específica del anticuerpo primario
 - Secar BFS alrededor del tejido
 - Colocar las laminillas en la cámara húmeda
 - Agregar suero normal de cabra y dejar a temperatura ambiente por 30 minutos.
6. Aplicación del anticuerpo primario
 - Se escurre el suero de cabra
 - Secar alrededor del tejido
 - Se aplica el anticuerpo primario correspondiente (CD3 o CD79a) en dilución de 1:100
 - Incubar en cámara húmeda a 4 °C por 24 horas

7. Se enjuagan con tres cambios de 3 minutos cada uno en BFS con solución de tween 20 (6.17 g de fosfato de sodio dibásico, 0.89 g de fosfato de sodio monobásico, 9 g de cloruro de sodio y cbp un litro de solución salina y se agrega 1 ml de solución tween 20 por cada litro)
8. Aplicación del anticuerpo secundario biotinilado (Kit comercial ABC, Dako)
 - Escurrir
 - Secar alrededor del tejido
 - Incubación en cámara húmeda 30 minutos a temperatura ambiente
 - Se enjuaga en BFS tres veces de 3 minutos en en BFS con solución de tween 20
9. Aplicación de reactivo enzima Avidina-Biotina (Kit comercial ABC, Dako)
 - Escurrir
 - Secar alrededor del tejido
 - Incubación en cámara húmeda 30 minutos a temperatura ambiente
 - Se enjuaga en BFS tres veces de 3 minutos en en BFS con solución de tween 20
10. Revelado
 - Solución de diaminobencidina (DAB) (5 ml de buffer Tris pH 2.4, cbp 50 ml de agua destilada, 0.0125 g de diaminobencidina y 30ul de peróxido de hidrógeno al 30 %)
 - Se sumergen dentro de una caja de petri por aproximadamente 3 a 5 minutos.
 - Agua destilada por 1 minuto
 - Agua corriente por 3 minutos
 - Sumergir en solución de sulfato de cobre al 1% por 10 minutos
 - Agua corriente por 1 minuto
11. Deshidratación y montaje
 - Contrastar con hematoxilina de Mayers 2 segundos
 - Solución Scott 2 minutos
 - Alcohol 96% 10 segundos
 - Xilol
 - Se montan y se coloca cubreobjetos