

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO DE
LEUCEMIA VIRAL FELINA EN TEJIDOS DE GATOS
CON ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

WENDY FABIOLA FONSECA AGUILAR

ASESORES

MVZ MC CARLOS GERARDO SALAS GARRIDO
MVZ EAPV CARLOS CEDILLO PELÁEZ

MÉXICO D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi madre, con todo el amor del mundo, gracias por tu apoyo,
confianza y amor.

A mi tía y mis primos Chris y Yair, por su cariño y apoyo.

A mis hermanitas que le han dado un toque especial a mi vida, Gaby Karem y Katy.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, MVZ Gerardo Salas y MVZ Carlos Cedillo, por la confianza, apoyo y paciencia para la realización de este trabajo, por sus consejos y enseñanzas que ayudaron para mi formación profesional y personal.

Al Dr. Alfonso López Mayagoitia, gracias por su tiempo y compromiso para poder proporcionarme el testigo positivo de LVFe.

A la HT Guadalupe Juárez Jiménez por realizar los cortes histológicos de esta tesis.

Al técnico, Miguel Ángel Martínez Ramírez por su disposición y ayuda en la parte experimental de esta tesis.

A la Diseñadora Gráfica Karem Antonio Domínguez por su apoyo en la ilustración.

A Luis, por toda su infinita paciencia, comprensión y amor.

A todos mis amigos, Oscar, Karina, Daniel, Poncho, Guadalupe, Ángeles, Irving, Blanca y Adriana que han estado conmigo y han sido parte importante de mi vida.

Y a todos mis compañeros y amigos del Departamento de Patología.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y a todos los profesores que contribuyeron en mi formación profesional y personal.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
• GENERALIDADES DE LEUCEMIA VIRAL FELINA.....	2
• ETIOLOGÍA DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA FELINA.....	3
• TRANSMISIÓN.....	6
• PATOGENIA.....	7
• TIPOS DE ENFERMEDAD	8
• MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	14
• TRATAMIENTO.....	17
• PRONÓSTICO.....	18
• PREVENCIÓN.....	19
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
HIPÓTESIS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
• MÉTODO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	22
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	28

CONCLUSIONES	32
REFERENCIAS	33
APÉNDICE	43

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	<u>Página</u>
FIGURAS.....	38
CUADROS DE FRECUENCIAS.....	40

RESUMEN

FONSECA AGUILAR WENDY FABIOLA. Diagnóstico inmunohistoquímico de Leucemia Viral Felina en tejidos de gatos con enfermedad linfoproliferativa (bajo la dirección de MVZ MC Carlos Gerardo Salas Garrido y MVZ EAPV Carlos Cedillo Pelaez).

Se realizó un estudio retrospectivo de 21 casos correspondientes al periodo entre los años 2000 al 2005, en tejidos de gatos provenientes de necropsias realizadas en la FMVZ-UNAM que presentaron enfermedad linfoproliferativa (EL) diagnosticada por histopatología, sugerentes a Leucemia Viral Felina (LVFe). Las muestras de tejido fueron reevaluadas mediante la técnica de inmunohistoquímica para la identificación de antígenos virales en las células neoplásicas. Del total de casos evaluados, el 71.4% (15/21 casos) fueron inmunopositivos y 28.6% (6/21 casos) inmunonegativos.

El linfoma multicéntrico fue la neoplasia de mayor presentación con 61% (13/21 casos), así como mayor frecuencia de inmunopositividad 77% (10/13 casos), seguida del linfoma extranodal que correspondió al 19% (4/21 casos) de los cuales 75% (3/4 casos) fueron inmunopositivos. El linfoma mediastínico y gastrointestinal constituyeron cada uno el 9.5% (2/21 casos), donde el 50% (1/2) de cada uno fue inmunopositivo. De los casos evaluados, el 28.5% (6/21 casos) se informaron con invasión a médula ósea, de estos el 67% (4/6 casos) fueron inmunopositivos. Los gatos de edad más afectada tanto por la enfermedad linfoproliferativa como por LVFe fueron los menores de 3 años 42.9% (9/21 casos), de los cuales 88.9% (8/9 casos) fueron inmunopositivos.

Se concluye que la inmunohistoquímica es una herramienta útil para el diagnóstico de LVFe, en gatos con enfermedad neoplásica, proporcionando al clínico y al patólogo un diagnóstico eficiente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de Leucemia Viral Felina

La leucemia viral felina (LVFe) es una enfermedad infecciosa viral que afecta a felinos domésticos y silvestres, siendo los animales jóvenes los más frecuentemente afectados. (1-7)

La LVFe es una enfermedad de distribución mundial, considerándose una de las causas más importantes de mortalidad en gatos. (1-7)

El Virus de la Leucemia Felina (VLFfe) puede causar enfermedades proliferativas, así como inmunosupresión, esto depende de la respuesta del hospedero y la patogenicidad del virus. Fue detectado por primera vez por W. Jarret en 1964 en un gato con linfoma. Desde entonces, este virus se ha identificado en coinfecciones con diversos agentes infecciosos secundarios, debido a su efecto inmunosupresor en los gatos susceptibles. Razas puras de gatos como los siameses, se menciona que pueden tener cierta predilección. (1-7)

La forma clínico-patológica de la infección por el VLFfe es muy diferente en cada gato, mucho depende del estado inmunológico del animal, edad, patogenicidad del virus y concentración del virus. La producción de anticuerpos está relacionada con la edad del animal, ya que los gatos infectados en edades tempranas, no presentan una adecuada respuesta inmunológica por lo que la posibilidad de desarrollar la enfermedad se incrementan. (1-10)

Los efectos del VLFfe pueden ser directos causando citotoxicidad o bien indirectos, a través de moléculas citosupresoras. (1-7)

Dentro de las enfermedades proliferativas la leucemia y el linfoma constituyen el 30% de todos los tumores felinos y el 90% de todas las neoplasias hematopoyéticas en gatos domésticos, de los cuales 70% son positivos al VLFfe. (1-10)

1.2 Etiología

El VLFe es un virus ARN perteneciente a la familia de los retrovirus, subfamilia *oncoviridae* genero *gammaretrovirus*. Es un retrovirus felino exógeno el cual posee tres subtipos A, B y C. Esta clasificación está basada en las diferencias estructurales de un tipo específico de glicoproteína de envoltura (gp70).⁽¹⁻⁴⁾

Existen también retrovirus endógenos que no son patogénicos (RD-114 virus, enFeLV, MAC-1 virus) y se encuentran de manera normal en los gatos, se transmiten de forma vertical por células de líneas germinales las cuales pueden poseer ADN proviral (proviral *sin*) el cual no produce partículas virales infecciosas y no se replica. La importancia de estos retrovirus endógenos radica en el potencial que tienen las fracciones de ADN proviral de recombinarse con el ADN del Virus de Leucemia Felina- subtipo A, lo que puede incrementar la patogenicidad del subtipo exógeno.⁽¹⁻⁴⁾

El VLFe es de forma esférica, en su núcleo contiene una cadena simple de ARN, estrechamente ligado a la enzima transcriptasa reversa que le concede la propiedad de codificar ADN a partir del ARN viral. Posee tres genes principales *gag*, *pol* y *env*, los cuales tienen funciones reguladoras, controlan la expresión de otros genes y la replicación viral. El gen *gag* (antígeno grupo asociado) está involucrado en la producción de proteínas estructurales internas asociadas con el núcleo (p15c, p12, p27 y p10); el gen *pol* (polimerasa) interviene en la transcripción genética por parte de la transcriptasa reversa, y el gen *env* (envoltura) codifica para la proteína de superficie gp70 y p15e, asimismo se le relaciona con efectos inmunosupresores, neoplásicos y con la patogenicidad del virus.⁽¹⁻⁴⁾

El núcleo esta rodeado por una cápside hexagonal (nucleocápside), la cual posee tres proteínas estructurales internas p27, p10 y p15c, cuya función es proteger el genoma del virus durante la replicación. Estas proteínas se producen dentro de las células

infectadas, aunque también pueden circular libres por plasma y excretarse por lágrima o saliva; por esta razón la proteína p27 se emplea para el diagnóstico de la enfermedad, mediante la evaluación de fluidos corporales. ^(1-7,11) La nucleocápside está rodeada por una capa interna esférica (p12) y una envoltura externa la cual presenta la glicoproteína de superficie gp70, que es considerada como la unidad externa de superficie, misma que varía según el subgrupo en su regulación de genes, así como en su capacidad de interferencia cruzada con la replicación de homólogos pero no subgrupos heterólogos del VLFe y es responsable de la respuesta inmune que puede proporcionar protección contra la infección. Otra proteína que se encuentra a nivel de envoltura externa es la p15E considerada inmunosupresora por su capacidad de disminuir la función de leucocitos (*in vitro*). Externamente el VLFe posee protuberancias en forma de espiga que son continuación de su envoltura y sitios de unión para las células hospedadoras (Figura 1). ⁽¹⁻⁷⁾

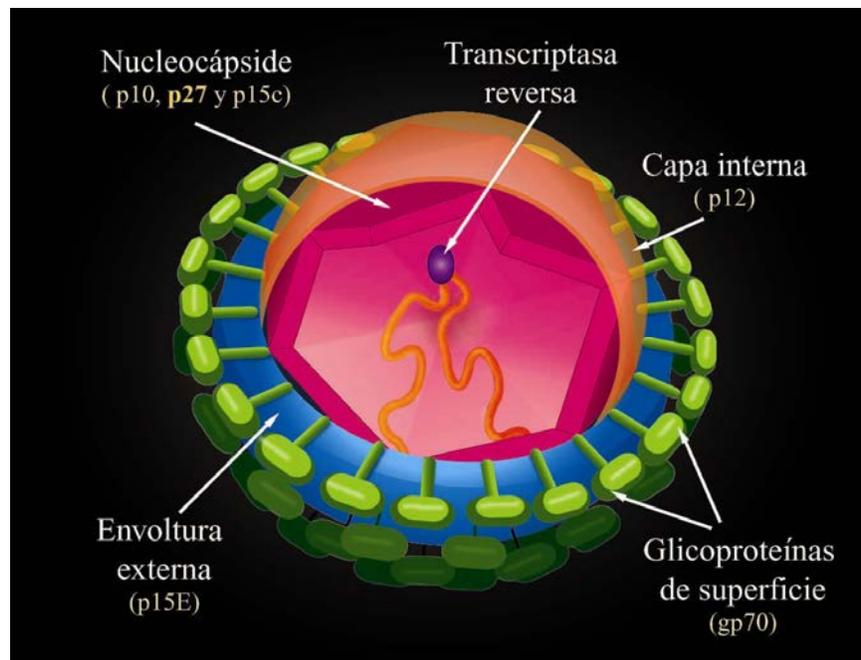


Figura 1. Esquema del Virus de la Leucemia Felina.

Debido a las diferencias entre subtipos, las células previamente infectadas con un subtipo de VLFe-A no pueden ser superinfectadas con otro subgrupo A, pero pueden infectarse con cualquiera de los otros subtipos (B o C). La interacción entre los subtipos también determina diferencias en el desarrollo de la enfermedad. ^(1-4, 8,9)

Solo el subgrupo A es infecto-contagioso y se puede transmitir horizontalmente por secreciones naturales, ha sido aislado en todos los gatos infectados y esta relacionado con enfermedades linfoproliferativas, los otros dos subgrupos (B y C) son el resultados de mutaciones y recombinaciones entre VLFe-A y secuencias de ADN proviral de retrovirus endógenos. De igual forma los subgrupos B y C requieren la presencia del subgrupo A para su replicación. El subgrupo B no es patógeno solo, requiere del subtipo A y estos se aíslan de aproximadamente el 50% de los gatos positivos al VLFe. El subgrupo C, rara vez se aísla (1% de los casos) y puede encontrarse en combinación con el subgrupo A, B o con ambos (AB), este subgrupo se relaciona con anemia no regenerativa resultante de la inhibición del crecimiento y/o diferenciación de los primeros progenitores eritrocíticos. Las diferencias en el resultado de la infección por el VLFe pueden ser atribuidas a diferencias entre los subtipos. ⁽¹⁻¹⁰⁾

La capacidad que presenta el VLFe para formar parte del propio genoma de las células hospedadoras, es el factor más importante de prevalencia de la infección, ya que una vez que el virus ha infectado células hematopoyéticas (durante la división), las células hijas contendrán el ADN viral y esto predispone al desarrollo de neoplasia. ⁽¹⁻¹⁰⁾

Las células infectadas por retrovirus pueden expresar un antígeno de membrana celular asociado a oncovirus felino (AMCOF), que resulta de la recombinación del *gen env* del VLFe con secuencias de retrovirus endógenos, asimismo ha sido aislado de gatos infectados por el Virus del Sarcoma Felino. Este antígeno ha sido encontrado en la membrana celular de gatos con linfoma, leucemia mielógena y fibrosarcoma. AMCOF

es una proteína compuesta por péptidos únicos de la membrana de la célula neoplásica infectada, los cuales precipitan con anticuerpos específicos; asimismo es considerado un antígeno no viral, codificado por las células del gato, los cuales son expresados, cuando la célula es infectada por el VLFe o al momento en que la célula se transforma en cancerígena. ⁽¹⁻¹⁰⁾

Los gatos que presentan títulos altos de anticuerpos anti-AMCFO, no desarrollan enfermedad neoplásica, aunque estén infectados, sin embargo, estos anticuerpos no protegen contra la enfermedad no neoplásica. ⁽¹⁻¹⁰⁾

1.3 Transmisión

La transmisión del virus puede ser vertical u horizontal. La transmisión horizontal es la más común ya que los gatos virémicos eliminan al virus principalmente por saliva, aunque también se menciona que existe eliminación por secreciones respiratorias, lágrima, leche, orina y semen. Debido al comportamiento social de los gatos el contagio es mayor durante el apareamiento, por mordidas, acicalamiento y en gatos que comparten recipientes. El tiempo de contacto necesario para existir infección, varía según las condiciones inmunológicas de cada animal. ⁽¹⁻⁷⁾

La transmisión vertical es menos frecuente, sin embargo, la transmisión transplacentaria y por calostro, está descrita. Muchas de las hembras infectadas presentan problemas reproductivos por lo que el aborto y la reabsorción embrionaria pueden presentarse y de esta forma disminuir la frecuencia en la transmisión vertical. ⁽¹⁻⁷⁾

La infección también puede ser transmitida a través de transfusiones sanguíneas, sin embargo, el virus es muy inestable a temperatura ambiente, por lo que no se consideran importantes los instrumentos quirúrgicos, jaulas etc., como fuente de infección.

En los gatos infectados, el periodo de inducción para el desarrollo de linfoma, leucemia o enfermedad no neoplásica varía de 3-41 meses. ⁽¹⁻¹⁰⁾

1.4 Patogenia

El VLF_e tiene la capacidad de replicarse en diferentes tejidos. Después de la infección inicial y si la respuesta inmune del gato no es la adecuada, el virus inicia su replicación en células linfoides, internalizándose por fusión de membranas o endocitosis, en este paso el virus pierde su envoltura, posteriormente en el citoplasma deja su cápside, quedando el ARN viral libre. La enzima transcriptasa reversa, que se encuentra ligada al genoma viral, se encarga de sintetizar ADN viral (provirus) a partir del ARN viral; el provirus se integra al genoma de la célula hospedadora, donde pueden ocurrir diferentes procesos: 1) la destrucción de la célula infectada por parte del sistema inmune, 2) infección con o sin replicación viral (latencia), y/o 3) transformación a célula tumoral. (1-10,12)

El virus puede replicarse en orofarínge, glándula salival y posteriormente invadir tejido linfoide y especialmente médula ósea. (1-10)

El gato expuesto al virus puede desarrollar alguna de las siguientes condiciones:

- A) No infectado: debido a una exposición deficiente y a la susceptibilidad del animal.
- B) Persistentemente infectado: si la respuesta inmune es deficiente, el gato desarrolla la infección con replicación viral, distribución sistémica a los diferentes órganos linfoides (timo, bazo, linfonodos y médula ósea) y por lo tanto una viremia persistente detectable serológicamente (ELISA+, IFA+). La susceptibilidad a infecciones secundarias incrementa. Existe riesgo elevado de mortalidad debido a la inmunosupresión, anemia, linfoma y otras alteraciones.
- C) Infección transitoria: desarrolla una infección, que puede ser en algún momento controlada por el sistema inmune, los gatos infectado llegan a presentar una viremia transitoria (ELISA+, IFA+) con eliminación del virus y posteriormente recuperación, sin embargo, el gato puede quedar como portador latente.

En los gatos inmunocompetentes la replicación viral es controlada por una respuesta inmune efectiva mediada por células y mecanismos humorales para la eliminación del virus; en estos gatos se detectan altos niveles de anticuerpos neutralizantes, mismos que eliminan al virus sin ser virémicos.

D) Infección latente: el virus se elimina como parte del proceso de recuperación durante 9-16 meses. En algunos casos la latencia permanece indefinidamente, por lo que el gato puede desarrollar enfermedades secundarias, riesgo de contagio a otros gatos, replicación activa del virus, transmisión viral transplacentaria o por amamantamiento. (1,4-7)

La infección latente puede ser reactivada espontáneamente o durante procesos de inmunosupresión (estrés, gestación o tratamientos con glucocorticoides).

Más de la mitad de los gatos con recuperación aparente pueden llegar a desarrollar infección latente en médula ósea. En algunos casos cuando el virus llega a infectar médula ósea, los provirus pueden permanecer en las células precursoras hematopoyéticas, sin ser activos, por lo que pueden haber resultados serológicos negativos (ELISA-, IFA-) en gatos con infección latente. (1,4-10)

Los signos clínicos pueden ser muy variados según el tipo de enfermedad que desarrolle o bien la complicación que tenga. Con frecuencia los gatos presentan anorexia, depresión, cierto grado de anemia y episodios recurrentes de fiebre. (1,4-7)

1.5 Tipos de enfermedad

Las enfermedades que se desarrollan en LVFe se clasifican en dos tipos: 1) Enfermedad no neoplásica y 2) Enfermedad neoplásica. (1,4-10)

1.5.1 Enfermedad no neoplásica: Los gatos pueden desarrollar inmunosupresión, asociada a una disminución de la capacidad funcional de las células del sistema inmune (linfocitos y neutrófilos), citotoxicidad y estimulación de la apoptosis de linfocitos por efecto viral, y de este modo existir complicaciones con diversas infecciones parasitarias, bacterianas y virales. La atrofia tímica secundaria a la infección por el VLFe, se presenta con mayor frecuencia en gatos jóvenes (6 meses edad). De igual forma se puede presentar hipoplasia mielocítica y anemias, debido a efectos citopáticos en células precursoras hematopoyéticas. ^(1,4-9,13) También puede haber glomerulonefritis por depósitos de complejos inmunes, poliartritis progresiva crónica inmunomediada que puede ser de dos formas: como artritis fibrosa anquilosante y periosteitis en gatos jóvenes y como una sinovitis linfoplasmocitaria con deformidad articular en gatos adultos, así como trastornos reproductivos como abortos, infertilidad y reabsorción embrionaria en el primer tercio de la gestación ^(1,8). Asimismo se informan enteropatías caracterizadas por diarrea crónica y pérdida severa de peso, ocasionada por atrofia y fusión de vellosidades intestinales, debido a la infección directa en células de las criptas del epitelio intestinal. ^(1, 4,14)

Algunas de las infecciones secundarias más importantes a las que están predispuestos los gatos con LVFe son infecciones por *Hemobartonella sp*, *Ehrlichia sp*, Coronavirus felino, Virus de la inmunodeficiencia felina, Parvovirus felino, *Toxoplasma gondii*, *Aspergillus sp*, *Candida sp* y septicemias bacterianas entre otras. ^(1,4-8, 14,15)

1.5.2.-Enfermedad neoplásica: Los gatos infectados que desarrollan enfermedades linfoproliferativas pueden afectar diferentes órganos incluyendo médula ósea y ocasionar diversos signos clínicos. ^(1,4-10,16-18)

En médula ósea, la infección por el VLFe puede ocasionar leucemia, donde las células neoplásicas pueden o no estar en circulación sanguínea. ^(1, 9, 10,16-18)

La leucemia se puede clasificar de acuerdo a su curso clínico y al tipo de línea hematopoyética afectada. ^(1, 9,16)

Acorde al curso clínico se encuentran las leucemias agudas caracterizadas por su comportamiento biológico agresivo y presencia de células blásticas (células inmaduras) a diferencia de las leucemias crónicas que son menos agresivas y las células que predominan están bien diferenciadas; este tipo de leucemia es raro en gatos y está poco relacionada con infecciones por el VLFe. ^(1,4- 9,16)

La clasificación de acuerdo a la línea celular de origen comprende a las leucemias mieloides y linfoides. Con respecto a las mieloides estas pueden ser, leucemias indiferenciadas agudas, leucemias mielógenas o granulocíticas, leucemias eritroides, leucemias mielomonocíticas, leucemias monolíticas y leucemias megacariocíticas. ^(1,4- 9,16)

Las leucemias de la línea linfoide se reducen a leucemia linfocítica crónica o linfoblástica aguda. ^(1,4- 9,16)

Cerca del 90% de los gatos con leucemia son positivos al VLFe. Los signos clínicos en el caso de leucemia se limitan a letargia y anorexia, aunque también pueden presentar fiebre como consecuencia de septicemia (por granulocitopenia), hemorragias (por trombocitopenia) y diferentes grados de anemia. También pueden llegar a desarrollar hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, metástasis y en ocasiones hematopoyesis extramedular. ^(1,4- 9,16)

Los síndromes mielodisplásicos (preleucemia) caracterizados por anormalidades hematológicas como pancitopenias, citopenias relacionadas con una médula ósea normo o hiper celular con alteraciones funcionales de granulocitos y plaquetas, se presenta con relativa frecuencia en gatos que desarrollan leucemia mieloide aguda y el 80% de los casos son positivos a LVFe. ^(1,4- 9,16)

El linfoma es la neoplasia que con mayor frecuencia se presenta en gatos, aproximadamente un tercio de todos los tumores felinos. La edad donde se encuentra el mayor rango de presentación de linfoma, es en gatos adultos jóvenes de alrededor de 2 años y en adultos maduros de 6-12 años, aunque pueden presentarlo también animales jóvenes desde los 6 meses. ^(8,10, 17,18)

Aproximadamente 2/3 de los gatos con linfoma no presentan anormalidades hematológicas y alrededor del 50% de los gatos con linfoma tienen invasión a médula ósea. ^(8,10, 17,18)

La clasificación de los linfomas se basa en su localización anatómica y en sus características celulares. ^(10, 17,18)

Dentro de la clasificación anatómica de linfoma se encuentran:

- a) Linfoma mediastínico: El tumor se encuentra en el mediastino anterior, puede presentar diferentes dimensiones, aunque frecuentemente son tumores de gran tamaño. En cavidad torácica se puede encontrar ligera o moderada cantidad de líquido asociado a compresión linfática o hemorragias, donde se pueden encontrar células neoplásicas. Los linfonodos mediastínicos usualmente son invadidos, los pulmones se comprimen dorsalmente por el tumor y muy rara vez están infiltrados. También puede haber derrame pleural.
- b) Linfoma gastrointestinal: Las lesiones en esta región, se aprecian como tumores nodulares, que pueden tener diferentes tamaños y frecuentemente se encuentran localizados en intestino delgado (yeyuno e íleon), aunque pueden encontrarse en cualquier zona del tracto gastrointestinal. La compresión del intestino por la neoplasia puede provocar estenosis, dilatación de la sección

proximal y engrosamiento de la pared intestinal con edema transmural. Usualmente están involucrados linfonodos mesentéricos, hígado y/o riñones.

- c) Linfoma multicéntrico: Los linfonodos periféricos son los más comúnmente afectados, la mayoría de las veces de forma simétrica. Pueden estar involucrados varios órganos, entre ellos; hígado, riñón, bazo, corazón, tracto gastrointestinal, hueso, linfonodos profundos y médula ósea.
- d) Linfoma extranodal: La forma extranodal, solitaria o regional se presenta con menor frecuencia. Las lesiones se limitan a un solo órgano, son lesiones aisladas de localización única, donde el linfoma renal es la forma más común de linfoma extranodal en gatos.
- e) Linfoma cutáneo: Se presentan en piel y son muy raros en gatos, están subdivididos en dos variedades, la epiteliotrópica y no epiteliotrópica. La primera forma se origina en la piel y no presenta invasión a otros órganos. La variedad no epiteliotrópica, puede ser causada por extensión de linfoma multicéntrico, si se presenta de forma aislada se considera una variedad de linfoma extranodal.
- f) Linfoma en sistema nervioso central: Se puede presentar en cualquier área del sistema nervioso central (SNC) o periférico, corresponde al 12% de todos los linfomas felinos, la edad de presentación varía de 1 a 4 años, aproximadamente 90% de los casos son positivos a LVFe. Puede haber invasión por médula espinal a través del espacio epidural.

La clasificación histológica de linfoma con base a las características celulares, según la Fórmula de trabajo del Instituto Nacional de Cáncer (NCI-WF) ⁽¹⁰⁾ son:

Grado	Distribución, tamaño y forma nuclear
Bajo	Difuso, linfocítico de células pequeñas (DLP) Folicular, predominante de células pequeñas hendidas Folicular, mixto
Intermedio	Folicular, predominante células grandes Difuso, de células pequeñas hendidas Difuso, mixto Difuso, de células grandes hendidas Difuso, de células grandes no hendidas
Alto	Inmunoblástico Linfoblástico Folicular o difuso, de células pequeñas no hendidas

La clasificación de los linfomas según la (NCI-WF) y el fenotipo, se correlaciona con el desarrollo biológico del tumor, respuesta al tratamiento y el pronóstico del animal. ^(10, 17,18)

El clasificación del linfoma según su desarrollo biológico es en tres grados, bajo, intermedio y alto grado, basados en su índice mitótico, distribución y características celulares. De este modo el conteo de figuras mitóticas por campo de 1000X de 0-1 corresponden a bajo grado, de 2-4 grado intermedio y ≥ 5 grado alto (promedio de 10 campos). ^(10, 17)

El tipo de distribución puede ser folicular o difuso, las características celulares que se observan son el tamaño nuclear (pequeño o grande) y la forma nuclear (núcleos hendidos o no hendidos). El tamaño nuclear se determina con la comparación relativa del núcleo de la célula linfoide con el diámetro de un eritrocito. Los núcleos pequeños

tienen un diámetro relativo a 1-2 eritrocitos y los núcleos grandes su diámetro es igual o mayor a 2 eritrocitos. ^(10, 17)

Existen otros términos utilizados para esta clasificación como es el linfoma linfoblástico, que refiere un linfoma de células pequeñas de alto grado de malignidad, sus núcleos presentan cromatina densa y nucléolos inaparentes. El término inmunoblástico se aplica a linfomas difusos de células con núcleos grandes, con anisocitosis y anisocariosis marcada, un nucléolo central evidente y de alto índice mitótico, esta variedad constituye el 37% de todos los linfomas felinos. ^(10, 17)

Para la caracterización de los fenotipos se realiza inmunohistoquímica o inmunocitoquímica para detectar antígenos específicos de la superficie citoplasmática de los linfocitos. Existe una amplia variedad de anticuerpos para linfocitos T y B, algunos marcadores para linfocitos B son CD21, CD20 y CD79a, que identifican linfocitos T están CD3, CD4 y CD8 entre otros. ^(9,10, 17-19)

La clasificación clínica de linfoma es por estadio, está relacionado con el pronóstico del animal y la presentación clínica. ^(1,6-10,18)

Estadio	Características clínicas
I	Sólo está involucrado un linfonodo
II	Más de un linfonodo afectado (craneal o caudal al diafragma)
III	Afección generalizada de linfonodos
IV	Estadio III, además de estar involucrados otros órganos (hígado, bazo)
V	Estadio IV, más compromiso extranodal o de médula ósea

1.6 Métodos de diagnóstico

1.6.1 Diagnóstico de enfermedad linfoproliferativa

Las pruebas de elección para el diagnóstico de linfoma son:

A) Citología por punción con aguja fina (PAF): se realiza directa a linfonodos periféricos o bien guiada por ultrasonografía para órganos internos; las características

celulares que se consideran son principalmente cambios morfológicos nucleares como; tamaño, forma, membrana nuclear, cromatina, nucléolos y mitosis atípicas. (18,20)

B) Histopatología: se utilizan tejidos que son obtenidos por biopsias quirúrgicas o bien por necropsias; los hallazgos microscópicos que se observan en los órganos afectados son el incremento o infiltración de linfocitos. En el caso de tejidos linfoides es difícil identificar de la población normal de células linfoides o de una hiperplasia linfoide, por lo que las características celulares como forma y tamaño nuclear, presencia de mitosis atípicas, la distribución de las células (folicular y difusa), así como la infiltración de linfocitos en senos subcapsulares y a través de la cápsula son consistentes con linfoma. Se utiliza la NCI-WF para la clasificación histológica. (8,10,17)

C) Aspirado o improntas de médula ósea: estas técnicas se utilizan para la valoración de médula ósea en el caso de leucemias y para su evaluación en los casos de metástasis. (7, 9,16, 18,20)

Los hallazgos en los aspirados de médula ósea de gatos leucémicos son principalmente hiper celularidad, (incremento de la población de una o varias líneas celulares) la cual puede ser en su mayoría células inmaduras, con hipoplasia o aplasia de otras líneas, la correlación con hemograma es de gran ayuda. El diagnóstico de leucemia aguda se da cuando más del 30% de las células son blastos. Las leucemias crónicas se caracterizan por presentar proliferación de células maduras, además de leucocitosis, trombocitosis o eritrocitosis. (7, 9,16, 18,20)

En el síndrome mielodisplásico se aprecia menos del 30% de células blásticas en el aspirado de médula ósea, con anormalidades morfológicas eritrocitarias, disminución en el porcentaje de la línea eritrocítica, citopenia afectando más de una línea de células hematopoyéticas. (7, 9,16, 18)

D) Análisis de líquido cefalorraquídeo: es de utilidad para el diagnóstico de linfoma de SNC, los cambios que se observan son pleocitosis marcada y se pueden apreciar células linfoides neoplásicas en el líquido. ^(7, 10,16, 18,20)

1.6.2. Diagnóstico de LVFe

El diagnóstico microbiológico de LVFe se realiza por aislamiento viral.

La detección serológica se puede hacer con la prueba de inmunoabsorbencia ligada a enzimas (ELISA) e Inmunofluorescencia indirecta (IFA), o bien en tejido por técnicas como la inmunohistoquímica (IHQ). Estas pruebas detectan el antígeno viral VLFe p27. ^(1,4-7, 9, 11, 12, 21-26)

A) Aislamiento viral: Se puede realizar para el diagnóstico de LVFe, sin embargo, sólo dará resultados positivos cuando el virus esté replicándose activamente en médula ósea, por lo que se encontrarán partículas virales en sangre, además es un método poco práctico, prolongado y de alto costo. ^(1,4-7,9, 11,22)

B) ELISA: Esta prueba está diseñada para detectar antígenos virales solubles en líquidos corporales como saliva, lágrima, suero, plasma o sangre completa. Existe una amplia variedad de reactivos comerciales, prácticos y rápidos. Esta prueba es más sensible que la de IFA, por lo que los resultados falsos negativos son raros, un gato negativo por ELISA es un gato no infectado, recuperado o puede presentar una infección latente. Los casos positivos se encuentran en gatos virémicos, los falsos positivos son debido a errores en el laboratorio. ^(1,4-7, 9, 11, 12,21-25)

En el caso de obtener reacciones positivas débiles, el resultado se toma como sospechoso y se repite la prueba o se realiza IFA. En caso de ser un gato sano (ELISA-) la prueba se debe confirmar, repitiéndola a las 4-6 semanas o bien realizando IFA.

C) IFA: Se realiza en laboratorios especializados, con la ayuda de microscopios especiales para tinciones fluorescentes y personal capacitado, esta técnica se realiza en

frotis de sangre periférica o de aspirados de médula ósea. Esta prueba detecta antígenos virales en neutrófilos o plaquetas circulantes infectadas por VLFe, resultados positivos indican un estado avanzado de la enfermedad, por lo que los falsos positivos son raros, estos pueden estar relacionados a frotis muy gruesos o fallas técnicas. Los casos negativos se deben correlacionar con la prueba de ELISA, ya que en casos de infecciones tempranas, sin replicación viral son falsos negativos, de igual forma, gatos con neutropenia o trombocitopenia pueden ser falsos negativos. ^(1,4-6, 11,21-24)

D) IHQ: La prueba de IHQ para LVFe, detecta antígenos virales en células infectadas, al igual que la prueba de IFA, esta técnica utiliza anticuerpos específicos para detectar antígenos sobre cualquier tejido (incluidos en parafina o congelados) o en células aisladas (inmunocitoquímica). ^(19,26-28)

Esta técnica se realiza en laboratorios y requiere personal especializado. Los resultados positivos y negativos son confiables ya que se utilizan testigos positivos y negativos durante cada prueba. Los resultados falsos negativos se darán si la infección es aislada y no se encuentra presente en el tejido que se está utilizando; los resultados falsos positivos serán resultado de fallas técnicas que se detectan con los testigos positivos y negativos utilizados. ^(19,26-31)

E) La reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Las pruebas moleculares como PCR, son técnicas sensibles, las cuales pueden detectar secuencias genéticas del virus en estados tempranos y tardíos de infección, sin embargo, este tipo de técnicas requieren de laboratorios y personal especializados y son de mayor costo inicial. ^(12,25-28)

1.7 Tratamiento

1.7.1 Tratamiento para LVFe:

El uso de moduladores inmunológicos como estimuladores del sistema inmune (immunoregulin®, immunovet®), virustáticos (AZT®, PMEA®) y antivirales (suramin®,

zidovudina®), ayudan al gato a controlar la infección, sin eliminarla, se combina con terapia de sostén y preventiva utilizando antibióticos contra infecciones secundarias y apoyo nutricional. En el caso de presentar enfermedad neoplásica el gato deberá ser tratado además con quimioterapia. ^(1,4-7, 33,34)

1.7.2 Tratamiento para linfoma y leucemia en gatos: Una vez que el diagnóstico serológico, citológico o histopatológico se ha realizado, y tomando en cuenta el estado del animal se considera el protocolo a seguir.

El primer paso a realizar para el tratamiento de linfoma son protocolos combinados con diversos quimioterapéuticos como ciclofosfamida, vincristina, arabinósido de citosina y prednisona, que se utilizan para inducir la remisión del tumor. La resección quirúrgica combinada con radiación o quimioterapia se puede realizar, siempre que la localización anatómica del tumor sea accesible y localizada. ^(1,4-7, 18)

En el caso de linfoma multicéntrico y de SNC, las posibilidades de resección quirúrgica son limitadas. El tratamiento para leucemia varía según el tipo de línea celular proliferante y el estado clínico del animal. ^(1,4-7, 18)

1.8 Pronóstico

El pronóstico de gatos que presentan linfoma, está relacionado con la localización anatómica y el grado de malignidad.

En los casos donde es posible la resección quirúrgica completa, el pronóstico será mejor al aumentar su periodo de vida, sin embargo, en los casos donde los gatos son positivos a LVFe, el pronóstico es malo, pues su índice de supervivencia es pobre, aun cuando la presencia del virus no esté involucrada con la respuesta al tratamiento para linfoma. Gatos con linfoma grado I/II negativos a LVFe tiene un periodo de vida prolongado.

En los casos de linfoma extranodal, cutáneo y gastrointestinal, donde la resección quirúrgica es completa, seguido de tratamiento de quimioterapia el periodo de sobrevida es mayor. ^(1,4-7, 18)

Los casos con linfoma en estadios III, IV, V tienen un pronóstico reservado. ^(1, 6,7, 18)

La tasa de remisión tumoral en felinos con linfoma tratados con diferentes protocolos de quimioterapia son de aproximadamente 65-75%, el promedio de sobrevida es de 6-9 meses, alrededor del 20% de los gatos viven un año. El tiempo de sobrevivencia en gatos sin tratamiento contra linfoma oscila entre 4-8 semanas. De igual forma los gatos con linfoma y positivos a LVFe tienen un pronóstico de sobrevida menor que aquellos negativos, por esta razón la presencia del VLFe es un factor pronóstico negativo en gatos con linfoma y leucemia. ^(1,4-7, 18)

Los gatos que son diagnosticados con leucemias agudas tratadas presentan una sobrevida de 1-7 meses, con menor sobrevida en las leucemias mieloides que las linfoides. Las leucemias crónicas tratadas suelen ceder a los protocolos quimioterapéuticos combinados, por lo que su periodo puede ser bueno, con tiempos de sobrevida mayores a 1 año. ^(1,4-7, 9, 10,16-18)

Los gatos con leucemia que no son tratados mueren a los pocos días del diagnóstico. El índice de mortalidad varía del 40 al 75%, los signos clínicos que presenten están en relación con el sistema u órganos afectados. ^(1,4-7, 9, 10, 17,18)

1.9 Prevención

Esta enfermedad se puede prevenir por medio de la vacunación de gatos sanos y evitar el contacto de gatos sanos con enfermos. ^(1,4-7,33-35)

La vacunación se recomienda dentro de las primeras 8 a 10 semanas de edad, continuándose con vacunaciones anuales. En gatos infectados la vacunación no produce ningún efecto positivo o negativo sobre el animal. ^(1,4-7, 33-35)

Existen diferentes vacunas: de subunidades de proteínas inactivadas, con subunidades recombinantes de la proteína gp70 y la mayoría contienen virus completo inactivado, asimismo, pueden contener anticuerpos antiAMFCO que protegen al gato de desarrollar enfermedad neoplásica.

Todas las vacunas disponibles, generan menos del 100% de protección, por lo que es necesario disminuir el riesgo de exposición en el animal para reducir las posibilidades de infección. ^(1,4-7,33-35)

Se han desarrollado vacunas recombinantes que contienen además citocinas como IL-12 e IL-18, las cuales favorecen el desarrollo de la respuesta inmune. Las vacunas con estimuladores inmunes confieren una alta protección, pero no han sido usadas comercialmente. ⁽³⁴⁾

Los anticuerpos anti gp70 son neutralizantes virales, por lo que títulos altos de anticuerpo contra gp70 indican que el gato es inmune a la infección contra VLFe. ^(1,4-7)

2. JUSTIFICACIÓN

Es necesario implementar un método diagnóstico *antemortem* y *postmortem*, específico y certero de LVFe, ya que no todos los felinos con enfermedad linfoproliferativa necesariamente han sido infectados con el VLFe. Asimismo, es necesario correlacionar casos diagnosticados como LVFe por histopatología e IHQ, para corroborar o descartar la infección por el VLFe en casos sospechosos de LVFe.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia del VLFe en gatos que fueron diagnosticados con enfermedad linfoproliferativa por histopatología.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar la presencia del virus de leucemia felina por medio de la prueba de inmunohistoquímica en gatos con enfermedad linfoproliferativa.
- 2.- Adecuar y utilizar la técnica de IHQ para establecer el diagnóstico de LVFe en gatos con enfermedad linfoproliferativa.
- 3.- Comparar los resultados positivos por IHQ con los diagnosticado por histopatología como sugerentes a LVFe.
- 4.- Comparar los resultados obtenidos por IHQ, con los informados en otros estudios.

5. HIPÓTESIS

- 1.-El número de gatos inmunopositivos a LVFe detectados por IHQ serán menores a los diagnosticados como sugerentes por histopatología.
- 2.-La frecuencia de casos positivos por IHQ para el VLFe será mayor en gatos menores de 2 años que en adultos mayores de 7 años.
- 3.-La frecuencia de casos positivos por IHQ para el VLFe será mayor en gatos que presenten linfoma multicéntrico y mediastínico que en gatos que presenten linfoma gastrointestinal, extranodal, en SNC o cutáneo

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo corresponde a un estudio retrospectivo, observacional, descriptivo, comparativo y transversal. El estudio se llevó a cabo utilizando tejidos de necropsias de gatos que se encuentran incluidos en bloques de parafina y pertenecen al acervo del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se seleccionaron 24 casos de los años 2000-2005, diagnosticados previamente por histopatología como sugerentes a la infección por el VLFe. Se reevaluaron los casos y se eligieron aquellos que presentaban lesiones compatibles con enfermedad linfoproliferativa (EL), dando un total de 21 casos, los cuales fueron utilizados para su estudio inmunohistoquímico, para detectar antígenos de LVFe, en los tejidos.

De igual forma se determinó la frecuencia de linfoma por edades con base a los archivos de informes de necropsias. Los casos se dividieron en tres grupos; el primero involucró a gatos menores de 3 años, el segundo fue conformado por gatos entre 3 y 7 años, y el tercer grupo fueron gatos mayores de 7 años.

6.1 Método de Inmunohistoquímica

La técnica de IHQ⁽³⁰⁻³²⁾ empleada fue la del complejo Avidina Biotina Peroxidasa (ABC), para la cual se utilizó un anticuerpo primario policlonal de origen caprino anti FeLV p27^a y un anticuerpo secundario biotinilado anti cabra de origen murino^b.

A los tejidos de los casos seleccionados se les realizaron cortes de 5 µm de grosor y se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Poly-L-lisina^c al 1% diluida en agua destilada.

^a Biotdesing Internacional, catálogo B65221G Industrial Park Road, Saco, Maine 04071 USA

^b Biocare Medical, catálogo MG610G Headquarters, 4040 Pike Lane, Concord CA 94520-1227

^c SIGMA-ALDRICH CO. Catálogo P 8920. St. Luis, MO 14508 USA.

Posteriormente las laminillas se desparafinaron en estufa^d por 2 horas a 60° C, y se lavaron realizando dos cambios con xilol de 30 minutos cada uno y dos con acetona por 5 minutos cada uno a temperatura ambiente (TA).

Para la rehidratación de los tejidos las laminillas se sumergieron en alcohol etílico en concentraciones decrecientes de (100, 96, 80 y 50%), realizando 3 lavados de 3 minutos cada uno, por cada concentración utilizada. Finalmente se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada a TA.

Para inhibir la peroxidasa endógena de los tejidos, las laminillas se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno al 30%^e con metanol absoluto^f a una relación 1:5, realizando 2 cambios de 45 minutos cada uno a TA. Posteriormente las laminillas se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con pH de 7.2, 3 veces durante 5 minutos cada uno a TA.

Para la recuperación antigénica las laminillas se sumergieron en solución Dako Target Retrieval^g diluida en solución TRIS con pH 7.6 en una relación 1:40 y posteriormente se sometieron a tratamiento físico (calor) en horno de microondas convencional marca Sanyo, modelo No. EMA-108s, a potencia 4 por 5 minutos, inmediatamente se detuvo la reacción al sumergir las laminillas en PBS frío. Para el bloqueo de la avidina y biotina endógena se utilizó la solución bloqueadora de avidina y biotina^h (solución A y solución B), donde se aplicó 50 µl de cada solución por laminilla y se incubaron en cámara húmeda por 30 minutos a TA.

^d Chicago Surgical and Electrical Co. Catálogo 200 No. serial 1065 Melrose Park, Illinois USA.

^e JT Baker, Catálogo 218601 Estado de México, México.

^f Técnica Química, Catálogo A1760 DF. México.

^g Dako corporation. Catálogo. 51699. Carpintería CA 43013 USA

^h Endogenous Avidin/Biotin Kit. Zymed Laboratorios INC. San Francisco, CA 94080 USA.

Para bloquear la unión no específica del anticuerpo secundario a proteínas tisulares, se utilizó suero de cabra no inmuneⁱ, aplicando 50 µl sobre las muestras e incubando por 30 minutos en cámara húmeda a TA, posteriormente se decantó la solución para colocar el anticuerpo primario.

Se utilizó un anticuerpo primario policlonal anti FeLV a una dilución de 1/25 de origen caprino diluido en PBS. Las laminillas se incubaron en cámara húmeda por 12 horas a temperatura de 4° C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. En seguida se aplicó el anticuerpo secundario biotinilado de origen murino anti-cabra y se incubó por 1 hora en cámara húmeda a TA. Después se hicieron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Seguidamente se aplicó a cada laminilla un conjugado enzimático^j que contiene estreptoavidina y peroxidasa, y se incubó en cámara húmeda por 30 minutos a TA. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Para identificar la presencia de antígenos, se utilizó como cromógeno AEC (aminoetilcarbazol)^k, sustrato buffer y peróxido de hidrógeno al 0.6%, revelando durante 1 minuto. Inmediatamente después se realizó 1 lavado con agua destilada sobre cada laminilla para detener la reacción y se sumergieron las laminillas en agua destilada. Como contraste se utilizó hematoxilina de Meyer^l, durante 1 minuto. Finalmente se hizo el montaje, colocando un cubreobjetos en las muestras de tejido sellado con resina hidrosoluble^m.

ⁱZymed Laboratorios Inc. Catálogo 95-6543B San Francisco, CA 94080 USA

^jZymed Catálogo 95-6543B, San Francisco California, CA 94080 USA

^kZymed catálogo 00-2007 San Francisco California USA Phone (650) 871-4494

^lZymed catálogo 008001 San Francisco California USA Phone (650) 871-4494

^mZymed catálogo 95-6543 San Francisco California USA Phone (650) 871-4494

Durante cada procesamiento de inmunotinción se corrieron testigos positivos y negativos.

6.1.2 Tejidos utilizados como testigos

a) Testigo positivo: Se utilizaron secciones de tejido hepático de gato, el cual fue positivo al VLFe demostrado por la técnica de inmunohistoquímica (Figura 3). El caso testigo fue donado amablemente por el Dr. Alfonso López Mayagoitia de la University of Prince Edward Island, Canadá.

b) Testigo negativo: Se usaron los testigos positivos de LVFe antes mencionados, a los cuales se sustituyó el anticuerpo primario por solución amortiguadora de fosfatos (PBS). (Figura 5).

6.1.3 Interpretación de resultados

Para la evaluación de los casos se utilizó un microscopio ópticoⁿ. Los tejidos considerados como inmunopositivos, presentaron gránulos intracitoplasmáticos e intranucleares de color café rojizo en células linfoides de tejidos linfoproliferados.

RESULTADOS

Los resultados de frecuencias por edades, por ubicación anatómica de la EL y de IHQ se presentan en los cuadros 1,2 y 4.

Resultados histomorfológicos y frecuencias por edades

Con base en los archivos de los informes de necropsias y los hallazgos microscópicos de los 21 casos seleccionados, se identificaron diferentes localizaciones anatómicas de la enfermedad linfoproliferativa; los casos que presentaron linfoma multicéntrico fueron 61% (13/21 casos), linfoma extranodal 19% (4/21 casos), linfoma mediastínico 9.5% (2/21 casos) y linfoma gastrointestinal 9.5% (2/21 casos); aquellos casos que presentaron lesiones en médula ósea fueron el 28% (6/21 casos). (Cuadro 2) (Figuras 2 y 3).

Asimismo, se presentan las frecuencias por edades; el primer grupo se formó por gatos de 0-3 años, siendo el 42.9% del total de los casos (9/21 casos), el segundo grupo por gatos de 3-7 años, correspondientes al 19% (4/21 casos) y el tercer grupo abarcaba todos los gatos mayores de 7 años que fueron el 33.4% del total de casos estudiados (7/21 casos). El 4.7 % de los casos estudiados (1/21 casos) no refería edad del animal por lo que no se incluyó en ninguno de los grupos. (Cuadro 4).

Resultados inmunohistoquímicos

En la evaluación de los tejidos procesados por la técnica de IHQ, se encontraron los siguientes resultados:

De los casos de gatos que presentaban linfoma multicéntrico, 76% fueron inmunopositivos (10/13 casos) y 23% inmunonegativos (3/13 casos). Con respecto a linfoma extranodal el 75% fueron inmunopositivos (3/4 casos) y el 25% inmunonegativo (1/4 casos). Del linfoma mediastínico el 50% inmunopositivo (1/2

casos) y 50% inmunonegativo (1/2 casos). En el linfoma intestinal el 50% inmunopositivo (1/2 casos) y el 50% inmunonegativo (1/2 casos). De los 6 casos en los cuales estaba involucrada la médula ósea, 66% fueron inmunopositivos (4/6 casos) y 28% inmunonegativos (2/6 casos). (Cuadro 3) (Figuras 6-9).

Se analizó la frecuencia de casos inmunopositivos por de IHQ por promedio de edades, los resultados se presentan a continuación: en el primer grupo 0-3 años, 88.9% fueron inmunopositivos (8/9 casos); en el segundo grupo de 3 – 7 años, el 75% fueron inmunopositivos (3/4 casos); el tercer grupo, mayores de 7 años, el 42.2% fueron inmunopositivos (3/7 casos). El caso fuera de la clasificación (sin referencia de edad) fue inmunopositivo. (Cuadro 4).

DISCUSIÓN

En el estudio retrospectivo de los 21 casos de gatos que presentaron enfermedad linfoproliferativa, diagnosticada por histopatología y sugerentes a infección por el VLFe, se encontró que el 71.4% de los casos (15/21 casos) presentaron inmunopositividad y 28.6% de los casos (6/21 casos) fueron inmunonegativos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran la eficacia de la prueba diagnóstica de IHQ para detectar antígenos virales en muestras de tejido de gatos con enfermedad linfoproliferativa, proporcionando al clínico y al patólogo una herramienta adicional para el diagnóstico certero de los gatos infectados.

Aproximadamente el 10% de los gatos sanos que son positivos por ELISA a LVFe no tienen el virus en sangre, esto puede ser por la existencia de antígenos virales en sangre periférica, y/o a la falta de replicación viral en médula ósea por lo que son IFA negativos, ^(1, 4, 6,21-24) por ello la IHQ, es una herramienta útil en el diagnóstico de la enfermedad.

Los casos diagnosticados como positivos por ELISA o IFA sin la presencia de signos clínicos deberán ser interpretados con reserva, y se sugiere que la prueba se repita mensualmente por tres meses consecutivos, para descartar una infección transitoria, la cual mostrará resultados negativos al último mes. En contraste una infección persistente continuará siendo positiva y puede haber manifestación de signos clínicos. Por otro lado los casos negativos son un buen predictor de la ausencia de la enfermedad ya que resultados falsos negativos ocurren muy rara vez. ^(1, 4, 6,21-24) Las pruebas diagnósticas serológicas presentan una alta sensibilidad y especificidad (>98%), sin embargo, no son diagnósticas para la enfermedad linfoproliferativa. De igual forma existen gatos que presentan una infección localizada y/o latente, con resultados serológicos negativos.

Esto se debe a que en estos casos no hay replicación activa viral, ni antígenos solubles, por lo que no es posible el diagnóstico de LVFe. ^(1, 4, 6,21-24)

La ventaja que ofrece la prueba de IHQ sobre las pruebas serológicas convencionales, radica en la posibilidad de detectar la presencia de antígenos del VLFe en gatos con enfermedad neoplásica. Asimismo durante el procedimiento de esta prueba se puede confirmar una enfermedad neoplásica por preparados histológicos o citológicos previos. De igual forma las muestras obtenidas por citología también pueden ser procesadas por esta técnica para detectar antígenos virales (inmunocitoquímica). ⁽²⁶⁻²⁸⁾

La ventaja de la IHQ y la ELISA sobre IFA, es que no requieren de equipo especializado por lo que son más accesibles.

La frecuencia de infección de LVFe diagnosticada por IHQ, en tejidos de gatos con enfermedad linfoproliferativa, fue del 71.4% (15/21 casos) del total de casos evaluados. Los porcentajes obtenidos en el presente estudio son mayores a los informados por Jackson y colaboradores en estudios ^(19,27) en los que informan frecuencias de 54 % y 57% respectivamente de casos positivos por inmunohistoquímica (38/70 casos y 40/70 casos).

Aunque la incidencia mundial de la enfermedad ha ido disminuyendo por la vacunación; en algunos países, la prevalencia de la enfermedad de LVFe todavía es relativamente alta. En un estudio hecho en México⁽³⁵⁾ con 500 gatos se encontró que 20.6% fueron positivos serológicamente a LVFe (103/500 casos). En otro estudio hecho en la Ciudad de México⁽³⁶⁾, en donde se evaluaron 831 gatos, el 30.1% fueron positivos por ELISA a LVFe (250/831 casos).

La frecuencia de infección y la detección de antígenos virales en gatos con enfermedades linfoproliferativa es alta en México en comparación con otros países, ^(19,26-28, 35,37) por lo que se debe seguir considerando al VLFe un agente importante en el

desarrollo de enfermedades linfoproliferativas y continuar los estudios de la enfermedad en el país.

La frecuencia de presentación de linfoma multicéntrico fue mayor en comparación con las otras 3 presentaciones evaluadas, 61% (13/21 casos), también fue el de mayor frecuencia de casos inmunopositivos 77% (10/13 casos), junto con el linfoma extranodal 75% (3/4 casos), sin embargo, también se encontró inmunopositividad en gatos que presentaron linfoma mediastínico 50% (1/2 caso) y gastrointestinal 50% (1/2 caso). Los resultados obtenidos coinciden con los datos informados por Jakson y colaboradores en estudios,^(19,27) en los que informan frecuencias mayores de casos de linfoma multicéntrico, 60% de casos y 68.5% (42/70 y 48/70 casos), y mayores porcentajes de inmunopositivos en linfoma multicéntrico 64.2% y 65% de los casos (27/42 y 31/48 casos).

Del total de casos con invasión a médula ósea el 83.3% correspondieron a linfoma multicéntrico (5/6 casos), de los cuales el 60% fueron inmunopositivos (4/6 casos).

Los casos de gatos jóvenes 0 – 3 años, constituyeron el 42.9% de los casos totales (9/21 casos) que se consideraron para este estudio, y además de ser el grupo mayormente afectado por enfermedad linfoproliferativa, también contó con el porcentaje mayor de casos inmunopositivos 88.9% (8/9 casos) y con sólo el 11.1% de casos inmunonegativos (1/9 casos) lo cual coincide con la literatura.^(1,4—6, 19,26)

Aunque los resultados de casos positivos por IHQ fueron mayores en comparación con otros estudios,^(19, 27,28) la frecuencia de casos inmunopositivos a LVFe por IHQ fue menor a los diagnosticados como los sugerentes por histopatología en un 28.5% (6/21 casos).

Diversos estudios han caracterizado el fenotipo de los linfomas felinos en relación a su distribución anatómica del tumor y edad del animal. En el linfoma alimentario o

gastrointestinal localizado en tejido linfoide asociado a intestino, nódulos linfoides mesentéricos o cualquier área del tracto gastrointestinal, las células que generalmente presentan malignidad son los linfocitos tipo B. Por otro lado el linfoma multicéntrico, cutáneo epiteliotrópico y mediastínico sugieren una transformación de linfocitos T, aunque también se informa una alta incidencia de linfomas T-B en tumores extranodales y multicéntricos. Asimismo en la forma extranodal también se presume que la mayoría de las veces involucra los linfocitos tipo T, mientras que el linfoma cutáneo no epiteliotrópico se relaciona con proliferación de linfocitos tipo B. La frecuencia de linfoma gastrointestinal, cutáneo y extranodal es mayor en gatos adultos maduros 6-12 años, mientras las otras dos presentaciones ocurren más comúnmente en gatos jóvenes menores a 2 años. La presentación cutánea y extranodal, se menciona que tiene poca relación con el virus. ^(10, 17,19)

La literatura menciona que el VLFe tiene cierta predilección por linfocitos T, por lo que la implicación de este en el desarrollo de linfomas de células T en gatos ha sido relacionado con la presencia del virus, sin embargo, estudios informan que el VLFe puede verse implicado en procesos de oncogénesis de linfomas tanto de tipo T, B y T/B. ⁽¹⁹⁾

La técnica de IHQ utilizada en el presente estudio fue el Complejo Avidina Biotina Peroxidasa (ABC), la misma que fue utilizada en otros estudios. ^(19,26-28) Cabe mencionar que en los estudios citados se utilizó un anticuerpo monoclonal FeLV gp 70, proteína de envoltura viral y para el presente estudio se utilizó un anticuerpo policlonal FeLV p27, proteína de nucleocápside que es una proteína interna.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de este estudio se concluye que la prueba de IHQ es una herramienta efectiva para el diagnóstico de LVFe, proporcionando al médico veterinario un panorama más completo para establecer un tratamiento integral y un pronóstico más certero.

Es posible detectar antígenos virales intracitoplasmáticos e intranucleares de LVFe en células neoplásicas e infectadas, por medio de la prueba de IHQ.

La frecuencia de infección de LVFe en gatos con enfermedad linfoproliferativa fue del 75% (15/21 casos) y todas las diferentes formas de linfoma evaluadas presentaron casos inmunopositivos, concluyéndose que en este estudio, el Virus de la leucemia felina es un agente importante en el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas en gatos y que puede estar involucrado en cualquiera de las cuatro presentaciones evaluadas. De igual forma, el VLFe puede afectar tanto gatos jóvenes como adultos.

Los gatos con linfoma multicéntrico presentaron mayor número de casos inmunopositivos, asimismo los gatos menores de 3 años fueron los más afectados tanto por la enfermedad linfoproliferativa como por LVFe.

REFERENCIAS

1. - Jennifer LR, Hardy WD, William DH. Feline Leukaemia Virus and Other Retrovirus. In: Sherding RG Editor. The cat: diseases and clinical management 2nd edition. USA, 1994: 263-399.
2. - Murphy FA, Gibbs PJ, Horzinek MC, Studdert MJ. Editors. Veterinary Virology. Retroviridae, 3rd edition, USA: Academic Press, 1999.
3. - Carter GR, Wise DJ, Flores EJ (eds). Retrovirus In: Concise Review of Veterinary Virology. International Veterinary Information Service. Ithaca NY. Last updated: 19-July-2005. Available from: <http://www.ivis.org.html>
4. - Cotter MS. Neoplasia Viral Felina. En: Green CE. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2^a edición. USA: Mc Graw- Hill Interamericana, 1998: 78-91.
- 5.- Marín. J, editor. Enfermedades infecciosas de los gatos. Leucemia Viral Felina. México: Esfera editores,1989.
- 6.- Robert GS. Enfermedades Infecciosas. En: Birchard SJ, Sherding RG. Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies. 2^a edición. España: Mc Graw Hill, 2000: 91-100.
7. - Couto CG. Oncología. En: Nelson WR. Medicina interna de animales pequeños. 2^a. Edición. Buenos Aires: Inter- Medica, 2000:1123-1133.
8. - Jones TC, Hunt DR, King NW, editors. Veterinary pathology. Diseases Caused by Virus. 6th edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins,1997.
9. - Jain NC. Editor. Essentials of Veterinary Hematology. The Leukemias: General Aspects. 1st edition, USA: Lippincott Williams & Wilkins.1993.
10. - Jacobs RM, Messick JB, Valli VE. Tumors of the Hemolymphatic System. In: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals. 4th edition. Iowa: Blackwell Publishing, 2002:119-195.

11. – Hardy WD Jr. General principles of retrovirus immunodetection tests. Colloquium of FeLV/FIV: Test and Vaccination. *J Am Vet Met Assoc* 1991;199:1282-1286.
- 12.- Cattori V, Tandon R, Pepin A, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Rapid detection of feline leukemia virus provirus integration into feline genomic DNA. *Molecular and Cellular Probes* XX. 2006;1-10.
13. - Ogilvie GK, Tompkins MB, Tompkins WA. Clinical and immunologic Aspects of FeLV- Induced Immunosuppression. *Veterinary Microbiology* 1998;17:287-296.
- 14.-Kipar A, Kremendahl J, Jackson ML, Reinacher M. Comparative Examination of cats with Feline Leukemia Virus Associated Enteritis and Other Relevant forms of Feline Enteritis. *Vet Pathol* 2001;38:359-371.
- 15.- Peyreira RC, Rosadio RA. Evidencia de infecciones coronavirales y retrovirales en felinos de Lima Metropolitana. *Revista de Investigaciones Pecuarias* 1997;8(1):71-72.
16. - Bienzli D. Hematopoietic Neoplasia. In: Latimer KS, Mahaffey AE, Prasse WK. *Clinical Pathology. Veterinary Laboratory Medicine.* 4th USA: Iowa State Press Duncan and Prasse's, 2002:80-95.
17. - Multon J, Harvey W J. Tumors of the Lymphoid and Hematopoietic Tissues. In: Multon J. *Tumors in Domestic Animals.* 3rd. USA: University of California Press, 1990: 231-292.
- 18.- Álvarez BF. Linfoma canino y felino. Memorias del Curso de oncología en pequeñas especies. AMMVEPE. México. 2001. Disponible en <http://www.ammvepe.com/ammvepe.html>
19. - Jackson LM, Wood SL, Misra V, Haines MD. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: relation to feline leukaemia virus status, tumor site, and patient age. *Can J Vet Res* 1996;60:199-204.

20. - Maldonado HG. Linfonodo. En: De Buen Nuria. Citología Diagnóstica Veterinaria. México: Manual Moderno, 2001: 82-90.
21. - Hawkins EC. Saliva and tear tests for feline leukemia virus. Colloquium of FeLV/FIV: Test and Vaccination. J Am Vet Met Assoc 1991; 199:1382-1385.
22. - Jarrett O, Paccitti AM, Hosei MJ, Reid G. Comparison of diagnostic methods for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. Colloquium of FeLV/FIV: Test and Vaccination. J Am Vet Met Assoc 1991; 199:1362-1364.
23. - William DH, Zuckerman EE. Development of the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. Colloquium of FeLV/FIV: Test and Vaccination. J Am Vet Met Assoc 1991; 199:1327-1342.
24. -William DH, Zuckerman EE. Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assay with the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. Colloquium of FeLV/FIV: Test and Vaccination. J Am Vet Met Assoc 1991;199:1365-1372.
- 25.- Keller-Gomes MA, Gonczi E, Tandon R, Riandato F, Hofmann-Lehmann R, Meli ML, et al. Detection of Feline Leukemia Virus RNA in Saliva from Naturally Infected Cats and Correlation of PCR Results with Those of Current Diagnostic Methods. J Clin Microbiol 2006;44:916-922.
26. - Ellis AJ, Jackson LM, Bartsch CR, McGill GL, Martin MK, Trask RB, *et al.* Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. J Am Vet Met Assoc 1996;209:767-771.
27. - Jackson LM, Haines MD, Meric MS, Misra V. Feline Leukemia Virus Detection by Immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction in Formalin-fixed, Paraffin-

embedded Tumor Tissue from Cats with Lymphosarcoma. *Can J Vet Res* 1993;57:269-276.

28. - Wang J, Kyat-Tanner M, Lee C, Robinson WF. Characterization of lymphosarcomas in Australian cats using polymerase chain reaction and immunohistochemical examination. *Aust Vet J* 2001;79:41-46.

29. - Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3:101-112.

30. - Ramos-Vara JA. Technical Aspects of immunohistochemistry *Vet Pathol* 2005; 42:405-426.

31.- Gimeno EJ, Massone AR, Portiansky EL. Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica y aplicaciones en patología veterinaria. Memorias del 17º Curso internacional de posgrado en técnicas de inmunohistoquímica, lectinohistoquímica y microscopía electrónica. Argentina 2005:24-52.

32. - August JR. Husbandry practices for cats infected with feline leukemia virus or feline immunodeficiency virus. Colloquium of FeLV/FIV: Test and Vaccination. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199:1474-1476.

33. – Weiss RC, Cummins JM, Richards BA. Low-dose orally administered alpha interferon treatment for Feline Leukemia Virus infection. Colloquium of FeLV/FIV: Test and Vaccination. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199:1477-1481.

34. - Hanlon L, Argyle D, Bain D, Nicolson L, Dunham S, Golder CM, *et al.* Feline Leukemia Virus DNA Vaccine Efficacy Is Enhanced by coadministration with Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 Expression Vectors. *JVI*. 2001;75:8424-8433.

35.- Marín HJ, Mckee W, Montes de Oca A, Núñez OL. Determinación de la seroprevalencia de la Leucemia Viral Felina y el Síndrome de Inmunodeficiencia

Adquirida Felina en Gatos de la República Mexicana. Memorias del 30 Congreso Mundial de la WASAVA, 2 congreso iberoamericano de la FIAVAC, 26 Congreso Nacional de la AMMVEPE. Ciudad de México 2005. p. 725-734.

36. - Kanafany G.R. Frecuencia del Virus de Leucemia Viral Felina en tres laboratorios de la Ciudad de México del año 2002 al 2005. (Tesis de licenciatura). México, D.F. FMVZ-UNAM. 2006. Pág.9-15.

37. - O' Connor TP, Tonelli QJ, Scarlett MJ. Report of the National FeLV/ FIV Awareness Project. J Am Vet Met Assoc 1991;199:1348-1352.

38.-Bedolla A.M. Diagnóstico inmunohistoquímico de Dermatitis Inmunomediadas en perros domésticos. (Tesis de Licenciatura). FMVZ-UNAM. México D.F. 2006. Pág.16-20,46-50.

Figuras

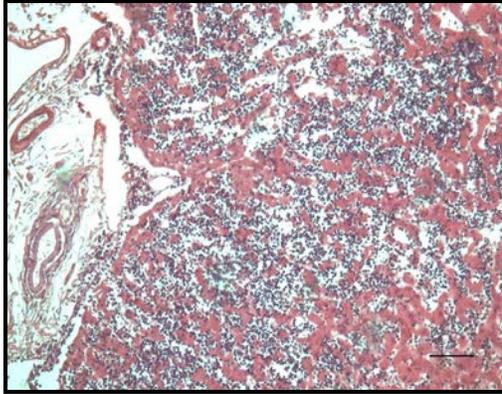


Figura 2. Sección histológica de Linfoma Hepático. H&E. Barra = 100um.

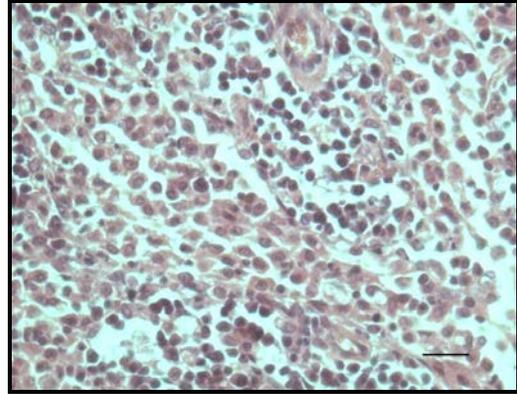


Figura 3. Sección histológica de linfonodo con linfoma multicéntrico. Barra = 25um.

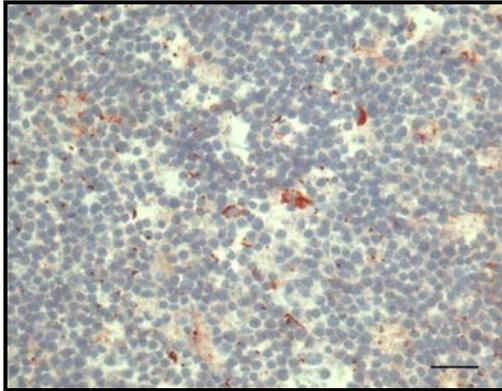


Figura 4. Testigo positivo: sección histológica de linfonodo con linfoma multicéntrico con inmunopositividad intracitoplasmática e intranuclear. IHQ (ABC): Barra = 25um.

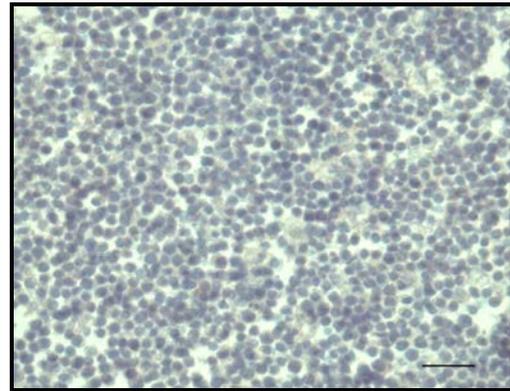


Figura 5. Testigo negativo. IHQ (ABC): Barra = 25um

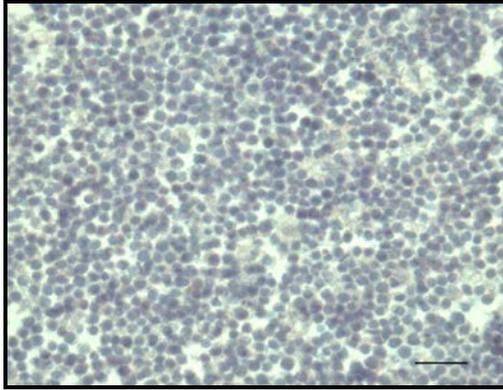


Figura 6. Sección histológica de linfoma multicéntrico (linfonodo) inmunonegativo. IHQ (ABC) Barra = 25um.

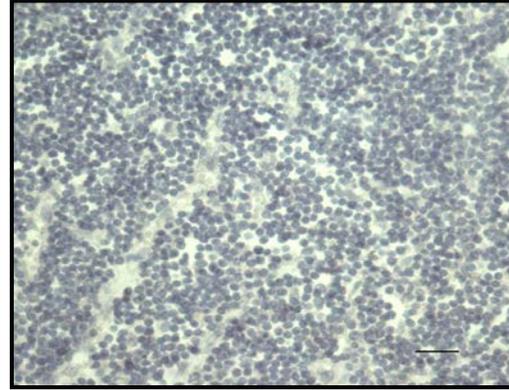


Figura 7. Sección histológica de linfoma mediastínico inmunonegativo. IHQ (ABC) Barra = 25um.

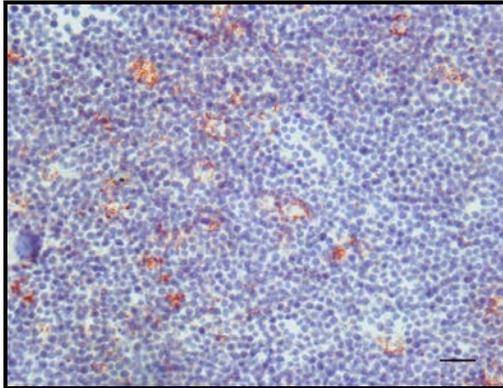


Figura 8. Sección histológica de linfoma multicéntrico (linfonodo) con inmunopositividad intranuclear e intracitoplasmática. IHQ (ABC) Barra= 25um.

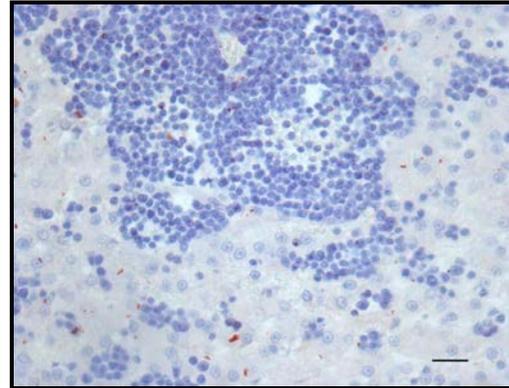


Figura 9. Sección histológica de linfoma hepático con inmunopositividad intranuclear e intracitoplasmática. IHQ (ABC) Barra = 25 um.

CUADROS

Cuadro 1. Características de los gatos con enfermedad linfoproliferativa utilizados

# caso	Edad años	Clasificación anatómica EL	Invasión a MO
1	3	Multicéntrico	-
2	11	Extranodal	-
3	1.5	Extranodal	-
4	3	Multicéntrico	-
5	3	Multicéntrico	-
6	9	Mediastínico	-
7	0.5	Multicéntrico	+
8	1.5	Mediastínico	-
9	10	Multicéntrico	+
10	2	Multicéntrico	-
11	3	Gastrointestinal	-
12	7	Multicéntrico	-
13	7	Multicéntrico	+
14	7	Multicéntrico	-
15	2	Multicéntrico	-
16	12	Multicéntrico	+
17	NR	Multicéntrico	-
18	10	Gastrointestinal	-
19	13	Multicéntrico	+
20	5	Extranodal	+
21	1	Multicéntrico	-

EL = Enfermedad linfoproliferativa

MO = Médula ósea

NR = No referido

+ = Con invasión - = Sin invasión

Cuadro 2. Frecuencia de localización anatómica de la enfermedad linfoproliferativa en gatos.

Localización anatómica	# casos	% de casos	#casos Invasión MO	% casos Invasión MO
Multicéntrico	13	61%	5	83.3%
Extranodal	4	19%	1	16.7%
Mediastínico	2	9.5%	0	0%
Gastrointestinal	2	9.5%	0	0%
Cutáneo	0	0%	0	0%
SNC	0	0%	0	0%

MO= Médula ósea

Cuadro 3.- Frecuencia de casos inmunopositivos por localización anatómica de EL en gatos.

Localización anatómica	# casos IHQ +	% casos IHQ +	# casos IHQ -	% casos IHQ -
Multicéntrico	10	77%	3	23%
Extranodal	3	75%	1	25%
Mediastínico	1	50%	1	50%
Gastrointestinal	1	50%	1	50%
Casos con invasión MO	4	67%	2	33%

Cuadro 4.- Frecuencia de casos de gatos con EL por edades y casos inmunopositivos por edades.

Edad años	# casos	% casos	#casos IHQ +	% casos IHQ +	# casos IHQ -	% casos IHQ -
0 – 3	9	42.9%	8	88.9%	1	11.1%
3 – 7	4	19%	3	75%	1	25%
>7	7	33.4%	3	42.8%	4	57.2%
NR	1	4.7%	1	100%	0	0%

APÉNDICE

1.- Fórmula para la preparación de PBS

1.1.- PBS 10X

A) Cloruro de Sodio ^p	40g
B) Cloruro de Potasio ^q	1g
C) Fosfato de Sodio dibásico ^r	5.75g
D) Fosfato de Potasio dibásico ^s	1g

1.2.- PBS 1X

A) Cloruro de Sodio.....	8g
B) Cloruro de Potasio.....	0.2g
C) Fosfato de Sodio dibásico.....	1.15g
D) Fosfato de Potasio dibásico.....	0.2g

Se colocan las cantidades exactas de cada uno de los reactivos en un matraz, según la concentración deseada, se agrega 1L de agua destilada, con un agitador magnético y una bala magnética se mezclan las sustancias. Finalmente se ajusta la solución a un pH de 7.2.

^p Merk-México, S.A. Catálogo 21578 Naucalpan de Juárez, México

^q Merk-México, S.A. Catálogo 3040 Naucalpan de Juárez, México

^r J.T Baker catalogo 3828-01 México, Xalostoc, Edo de México

^s J.T Baker catalogo 3828-01 México, Xalostoc, Edo de México

2.- Fórmula para la preparación de solución TRIS

- A) Tris hidrocloreuro^t.....6.06 g
B) Tris Base^u..... 1.38 g

Se vierten las cantidades exactas de cada uno de los reactivos en un matraz, se agrega 1L de agua destilada, se mezcla (agitador magnético^φ) y posteriormente se ajusta el pH a 7.2.

^t Sigma-Aldrich Co. Catálogo T-6791 St. Louis, MO 63178 USA

^u Sigma-Aldrich Co. Catálogo T3253-250G St. Louis, MO 63178 USA

^φ Thermolyne Modelo SPA1025B Dubuque, Iowa 52001 USA

3.- Fórmula para preparar soluciones amortiguadoras para ajuste de pH

A) Hidróxido de sodio 1M

2 g de NaOH + c.b.p. 50 ml de agua destilada

B) Ácido clorhídrico 1M

4.13 ml de HCL + c.b.p. 50 ml de agua destilada

Estas soluciones se agregan en pequeñas cantidades con pipetas pasteur a las soluciones que se desean amortiguar, mientras se va midiendo el pH con un potenciómetro, es recomendable que las soluciones estén continuamente mezclándose, por lo que se introduce una bala magnética y se colocan en agitadores magnéticos, mientras se agregan las soluciones amortiguadoras, según sea el pH deseado.