



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE DNA PROVIRAL DEL VIRUS DE LA
LEUCEMIA VIRAL FELINA POR MEDIO DE LA REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL
(qPCR) EN TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA DE
LINFOMAS FELINOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

DIANA RIVERA COLÍN



Asesores:

Dra. Laura Patricia Romero Romero

MMVZ Juan Miguel Pérez Enriquez

Ciudad Universitaria, Cd.Mx. 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi familia:

- ♥ Tomás quien ha sido mi más grande inspiración en este camino, mi fuerza y la razón de lo que soy. Gracias por tu amor incondicional, los momentos compartidos y tu compañía durante mis desvelos. Porque los que nos aman jamás nos dejan, siempre estarán en nuestros corazones.
- ♥ A mis padres por todo su esfuerzo, amor, dedicación, apoyo y amistad. Sin ustedes llegar hasta aquí hubiera sido imposible.
- ♥ A mi hermanita la persona con quien siempre puedo contar, por todo tu apoyo para mejorar académica y personalmente. Por ser mí mejor amiga siempre.
- ♥ A Laika por llegar a iluminar nuestro hogar, el final de este bello camino y comienzo de mi vida profesional.
- ♥ Mis abuelitos Nina y Papayo por enseñarme el amor y respeto hacia los animales y al campo.

Agradecimientos

A mis asesores, Doctora Laura Romero Romero y Juan Miguel Pérez Enriquez por todo su apoyo y creer en mí.

Académicos y administrativos del departamento de patología por todas sus enseñanzas, así como el apoyo en mi investigación.

Al laboratorio de genética y unidad de investigación de la FMVZ UNAM por el apoyo en parte del proyecto.

A mi amada Universidad, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM por darme la oportunidad de formarme en tan maravillosa institución con todas las herramientas.

A todos mis profesores y compañeros de licenciatura por todo su conocimiento transmitido.

A todos los animales de centros, comunidades, laboratorios y clínicas que estuvieron durante en mi formación, de quienes aprendí muchísimo y estaré eternamente agradecida.

A MUSE por inspirarme, acompañarme en todo el camino y siempre hacer más ameno mi estudio.

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Histología del sistema linfático.....	3
Linfonodo.....	4
Timo.....	5
Bazo.....	5
Médula ósea.....	6
Neoplasias linfoides	7
Clasificación REAL/OMS.....	11
Neoplasias de células B.....	11
Neoplasias de células T o NK.....	18
Características distintivas del cáncer “Hallmarks”.....	23
Oncovirus.....	31
Leucemia Viral Felina.....	34
Replicación.....	41
Métodos de diagnóstico molecular.....	45
Justificación.....	50
Hipótesis.....	52
Objetivos.....	52
Material y Métodos.....	52

Resultados.....	56
Discusión.....	63
Conclusión.....	69
Referencias.....	70

Resumen

RIVERA COLÍN DIANA. *Detección de DNA proviral del virus de la leucemia viral felina por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) en tejidos incluidos en parafina de linfomas felinos.* Asesores: Dra. Laura Patricia Romero Romero y M en MVZ Juan Miguel Pérez Enriquez. Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de los casos diagnosticados como linfomas felinos de necropsias y biopsias en el departamento de Patología de la FMVZ en el periodo de enero 2006 a diciembre 2018, con un total de 77 casos. Por su localización anatómica, los casos que correspondieron a linfomas alimentarios fueron 40.26 %, multicéntricos 28.57%, tímicos 15.58 %, extranodales 12.99 % y nodales 2.60 %. En cuanto a la edad de presentación 24.68 % se presentó en el grupo de gatos adultos mayores, 23.38 % en joven, 19.48 % en adulto mayor, 16.88 % en adulto joven, 10.39 % en geriátrico, 3.90 % en cachorro, y 1.30 % de los casos no referían edad. Se realizó PCR en tiempo real para la detección del provirus de leucemia viral felina (LeVF), donde 20.77 % de los casos (16/72) fueron positivos. En conclusión, los linfomas tímicos/mediastínicos y multicéntricos son más comunes en gatos jóvenes, y se encontró que hay asociación estadísticamente significativa con la presencia del provirus de LeVF. Por otro lado, el linfoma alimentario es el más común, afectando principalmente a gatos adultos, pero en estos casos no se encontró asociación con el provirus.

Introducción

El linfoma es la neoplasia más comúnmente diagnosticada en gatos y en otras especies (Zachary, 2016). Su clasificación se basa en la revisión europeo-americana (REAL) de neoplasias linfoides, adoptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para uso en animales. La cual considera la morfología (citología e histología), inmunofenotipificación (citometría de flujo o inmunohistoquímica), características moleculares y comportamiento biológico (agresivo, indolente o respuesta a tratamiento). Utilizando el sistema REAL/OMS, el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) es uno de los tipos más comunes reportado en gatos, su localización puede ser mediastínica, en tracto respiratorio alto, en algún segmento de intestino o multicéntricos (Meuten, 2017).

El tracto gastrointestinal es comúnmente el sitio más afectado en gatos mayores a 10 años, mientras que los linfomas multicéntricos y mediastínicos se han visto en gatos jóvenes infectados con el virus de leucemia viral felina (LeVF), este es un retrovirus que ha sido reconocido por mucho tiempo como causa de linfoma en gatos debido a que incrementa el riesgo de la neoplasia en un 60 %. Antes de instaurar la vacunación contra el virus (1985) aproximadamente un 70 % de los gatos, principalmente animales jóvenes, con linfoma eran positivos a LeVF (Zachary, 2016). En un estudio realizado en Alemania de 1980 a 1995, se encontró que 59 % de todos los gatos con linfoma o leucemia fueron positivos al antígeno de LeVF. En contraste, sólo 21 % de gatos con linfoma y leucemia fueron positivos a LeVF en un estudio realizado en la misma región de 1996 al 2008. Una de las principales razones por las que disminuyó la prevalencia de LeVF asociado

con tumores hematopoyéticos, parece ser la disminución en la incidencia del virus. Entre 1988 y 1994, la prevalencia de este virus disminuyó un 50 %, y en un estudio más reciente que examinó la población de gatos del sur de Alemania, se encontró que sólo el 2 % era positivo para LeVF. La disminución en las tasas de infección por este virus se asocia al resultado de una extensa vacunación y pruebas diagnósticas de LeVF, además de otros métodos de prevención asociados al cuidado de los gatos, evitando que estos salgan a las calles donde pueden contagiarse (Stützer et al., 2011).

Histología del sistema linfático

Los linfocitos se encuentran en la sangre y la linfa, además de aislados en el tejido conectivo y en los epitelios, pero también se encuentran densamente empaquetados en el tejido conectivo ordinario laxo denominado tejido linfoide, algunos órganos están compuestos en su mayor parte por tejido linfoide y se denominan órganos linfoides (Geneser and Mikkelsen, 2000).

El tejido linfoide es un tejido conectivo especializado en la hematopoyesis. En éste, los linfocitos representan la mayor parte de las células. Los órganos linfoides principales, primarios o centrales comprenden médula ósea, timo y bolsa cloacal en aves; en estos órganos tiene lugar la maduración de las células madre linfocitarias a linfocitos B (médula ósea) y linfocitos T (timo) (Geneser and Mikkelsen, 2000). En estos es donde los linfocitos expresan por primera vez receptores para el antígeno y consigue la madurez fenotípica y funcional (Abbas et al., 2015). Los órganos linfoides secundarios o periféricos son las partes del sistema inmunológico donde tienen lugar las reacciones inmunes, siendo estos los

linfonodos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (Geneser and Mikkelsen, 2000).

El tejido linfoide puede adoptar distintas conformaciones, el tejido linfoide denso conformado por grandes cantidades de linfocitos; el tejido linfoide laxo se caracteriza por una concentración moderada de linfocitos dispersos sin aparente delimitación; tejido linfoide nodular donde los linfocitos pequeños forman agregados redondos a ovals parcialmente circunscritos y densamente compactos, estos pueden contener un área central pálida, llamada centro germinal. Debido a que la mayoría de las células del centro germinal son linfocitos más grandes con más citoplasma y núcleos ligeramente teñidos (linfoblastos), esta región parece pálida en contraste con la densa corona, zona cortical o zona periférica, de células maduras. El tejido linfoide laxo y los nódulos linfoides son componentes de la mayoría de los órganos linfáticos (Bacha and Bacha, 2015).

Linfonodo

Los linfonodos se componen de una corteza y una médula. La corteza consta de nódulos linfoides rodeados de tejido linfoide laxo. Las extensiones del tejido laxo en la médula se llaman cordones medulares. En estos se pueden encontrar linfocitos y otros leucocitos, macrófagos y células plasmáticas. El tejido linfoide tiene una cápsula de tejido conectivo ordinario denso, con un poco de músculo liso y fibras elásticas. Partes de la cápsula se extienden al centro como trabéculas. Los vasos linfáticos aferentes penetran en la cápsula para desembocar en el seno subcapsular (sinusoide linfático ubicado debajo de la cápsula). Los senos peritrabeculares unen el seno subcapsular a los senos medulares. Estos últimos conducen a vasos linfáticos eferentes en el hilio. Los senos están recubiertos por

endotelio discontinuo y abarcan una red de procesos citoplasmáticos de células reticulares (Bacha and Bacha, 2015).

Timo

El timo está cubierto por una cápsula delgada de tejido conectivo que se proyecta hacia el interior como septos, dividiendo parcialmente el órgano en lóbulos y lobulillos. El parénquima de cada lobulillo se arregla en una zona cortical con linfocitos maduros y densamente compactados; y una zona medular, con menos linfocitos y más inmaduros. El timo carece de nódulos linfoides y se sostiene por un citoretículo de células epiteliales reticulares estrelladas y sólo unas pocas fibras reticulares. Los corpúsculos tímicos (Hassall) se observan en la zona medular de cada lobulillo, estos son espirales concéntricos de células retículo epiteliales con apetencia tintorial acidófila y planas que pueden hincharse, se queratinizan y calcifican centralmente. A medida que un animal envejece, gran parte del timo se atrofia y en su lugar se desarrolla tejido adiposo (Bacha and Bacha, 2015).

Bazo

El bazo tiene una cápsula de colágeno rica en músculo liso y fibras elásticas. En caballos y vacas dos a tres láminas de músculo están orientadas perpendicularmente unas con otras, mientras que, en carnívoros, cerdos, borregos y cabras, las fibras musculares están entretejidas. Desde la cápsula se proyectan numerosas trabéculas de tejido conectivo denso hacia el interior del bazo. El parénquima es denominado pulpa del bazo y está dividido en pulpa blanca y roja. La pulpa roja tiene gran cantidad de eritrocitos, vasos sanguíneos irregulares de paredes delgadas, sinusoides esplénicos separados por cordones tisulares y esplénicos. Dispersas en la pulpa roja se observan acumulaciones de linfocitos

dispuestas alrededor de las arterias centrales, formando las vainas linfáticas periarteriales (PALS) ricas en linfocitos T, que junto con los nódulos linfoides comprenden la pulpa blanca con apetencia tintorial basófila por la alta concentración de linfocitos maduros, macrófagos y células dendríticas. Se les llama elipsoides a las vainas de macrófagos pericapilares y son más abundantes en la zona marginal. La zona marginal es la región de transición entre la pulpa roja y blanca donde las células están menos empaquetadas, tiene abundantes linfocitos B y células dendríticas .(Bacha and Bacha, 2015; Geneser and Mikkelsen, 2000).

Médula ósea

La médula ósea es un tejido conectivo especializado, siendo el principal tejido hematopoyético de la última mitad de la vida fetal y del resto de la vida. Histológicamente se caracteriza por estar dividida en un compartimiento vascular y compartimiento hematopoyético formando columnas irregulares entre los vasos sanguíneos. En la médula roja, el compartimiento hematopoyético está ocupado casi en su totalidad por células hematopoyéticas en escaso tejido conectivo reticular, denominado estroma de la médula ósea. En la médula amarilla la grasa ocupa casi todo el compartimiento hematopoyético, donde sólo se distinguen algunos megacariocitos. Las células del compartimiento hematopoyético sólo pasan a la sangre cuando han alcanzado cierto grado de diferenciación (Geneser and Mikkelsen, 2000). Los eritrocitos, granulocitos, monocitos, células dendríticas, plaquetas y los linfocitos B, T y NK se originan de una célula troncal hematopoyética (HSC) común en la médula ósea pluripotente, que pueden generar todos los diferentes tipos de células sanguíneas maduras, y dan lugar a

dos tipos de células progenitoras pluripotentes; una que genera células linfocíticas y mielocíticas, da lugar a linfocitos T, B y células NK; y otra que produce células mielocíticas, eritrocitos y plaquetas, dando lugar a eritrocitos, plaquetas, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y monocitos. La proliferación y maduración de las células precursoras en la médula ósea está estimulada por citocinas, llamadas factores estimuladores de colonias (Abbas et al., 2015).

Neoplasias linfoides

El término linfoma abarca un grupo diverso de neoplasias malignas que surgen en los tejidos linfoides fuera de la médula ósea (Zachary, 2016). Aunque el término “linfosarcoma” también se ha utilizado en medicina veterinaria y no es incorrecto, este debe evitarse por razones comparativas (Maxie, 2016) debido a que en medicina humana de acuerdo con el instituto nacional del cáncer del instituto nacional de salud (NCI-NIH) también ha quedado en desuso tratando de homogeneizar clasificaciones. Existe una gran variación en las manifestaciones clínicas y las características citopatológicas del linfoma, que tienen gran importancia para predecir el comportamiento clínico. El linfoma puede surgir en cualquier etapa del desarrollo/maduración de un linfocito, desde precursores (linfoblastos B o T) hasta linfocitos maduros B, T y células NK. Para su clasificación se usan las características macroscópicas, histológicas, inmunofenotípicas (linfocitos B o T) y características clínicas. El patrón histológico puede ser nodular o laxo, el tamaño de célula se determina comparando el núcleo de los linfocitos neoplásicos con el diámetro de las células sanguíneas y el grado se determina contando las mitosis en campo de alto poder (Zachary, 2016).

Existen varios métodos para determinar la proliferación celular mediante inmunohistoquímica, se pueden utilizar marcadores como Ki67 o antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), los cuales se pueden interpretar con mayor facilidad a comparación del conteo de mitosis (Meuten, 2017). Para el tamaño de las células se clasifican en células grandes aquellas que su núcleo mide más, o lo mismo, que dos eritrocitos, los núcleos de las células intermedias miden 1.5 diámetros eritrocíticos y los núcleos de las células pequeñas miden de 1-1.25 diámetros eritrocíticos. La cuenta mitótica se determina con el número promedio de figuras mitóticas en 10 campos aleatorios con mayor actividad mitótica usando el objetivo de alto poder (40x). En donde el índice es bajo si se cuentan de 0-5 mitosis por campo de alto poder, medio si son de 6 a 10 mitosis y alto si son más de 10 mitosis (Maxie, 2016).

En gatos el linfoma es una de las neoplasias más diagnosticadas, la presentación mediastínica o multicéntrica es la más frecuente en gatos jóvenes. El tracto digestivo es el sitio más afectado en gatos mayores a 10 años. En estos últimos las células neoplásicas son pequeñas, las figuras mitóticas son poco frecuentes, el epiteliotropismo hacia la mucosa y cripta es común. El diagnóstico de este subtipo de linfoma puede ser difícil (particularmente en biopsias endoscópicas), porque esta enfermedad a menudo es multifocal o simultánea con enfermedad inflamatoria intestinal, ésta es una enteritis linfoplasmocítica diagnosticada microscópicamente mediante biopsia, cuya causa es desconocida, pero por la presencia de numerosos linfocitos y células plasmáticas sugieren un problema inmunológico. Los linfocitos neoplásicos son morfológicamente similares a los inflamatorios y etapas iniciales de linfomas T de células pequeñas en mucosa, a

menudo requieren pruebas de diagnóstico adicionales como inmunohistoquímica y clonalidad molecular para confirmar una neoplasia (Zachary, 2016), por ejemplo, la prueba basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el reordenamiento del receptor de antígeno (PARR), que determina la clonalidad de las células (Meuten, 2017).

Los linfomas se clasifican comúnmente por su ubicación anatómica. Los principales tipos de linfoma incluyen multicéntrico, tímico/mediastínico, gastrointestinal, cutáneo, extranodal, sistema nervioso central, ocular y óseo (Maxie, 2016), autores como Cristo et al y Vail et al, consideran la clasificación nodal para aquellos linfomas en los que solo un linfonodo está afectado. Clínicamente, el diagnóstico de linfoma está basado en el agrandamiento de los linfonodos y otros órganos, por ejemplo, hepatoesplenomegalia o engrosamiento de la pared intestinal en el caso de linfomas alimentarios. Los signos clínicos están relacionados con los órganos afectados, pueden ser anorexia, letargia, pérdida de peso; disnea, tos, síndrome de vena cava craneal con linfoma tímico; vómito y diarrea con linfoma gastrointestinal; nódulos cutáneos y placas con linfoma cutáneo; y parálisis, convulsiones o paresia con linfomas en sistema nervioso central (Maxie, 2016).

Las clasificaciones más utilizadas en medicina veterinaria incluyen la fórmula de trabajo del Instituto Nacional de Cáncer (NCI-WF) y el Sistema de Kiel, en éstas se considera índice mitótico, el tamaño y la forma celular (Trigo et al., 2015).

La clasificación de la OMS en medicina humana proporciona información pronóstica más precisa y orientación terapéutica porque reconoce los linfomas como un grupo heterogéneo de enfermedades distintas que no están relacionadas

entre sí. En medicina veterinaria es de suma importancia que no simplemente se extrapolen estos datos (Maxie, 2016), debido a que no se ha podido comprobar si este sistema de clasificación tiene una utilidad práctica, pues muchas veces no se les da seguimiento a los pacientes o no se realizan necropsias para determinar la recurrencia, metástasis, órganos linfoides involucrados, entre otros datos (Meuten, 2017). Sin embargo, Wolfesberger et al, en un estudio retrospectivo que tuvo como propósito clasificar el subtipo de linfoma de acuerdo con la clasificación de la OMS en un grupo de 30 gatos para investigar su potencial pronóstico, se identificó que los gatos con diagnóstico de linfoma intestinal de células T tienen mayor tiempo medio de supervivencia (1.7 años), que los gatos con linfoma difuso de células B grandes (4.5 meses) o linfoma periférico de células T (6.1 meses). Se determinó que la clasificación de la OMS proporciona información más detallada que la clasificación de bajo, intermedio y alto grado. A pesar de esto, en la mayoría de los casos todavía no cambia el tratamiento. Además, no se encontró correlación entre la clasificación basada en el índice mitótico y su pronóstico (Wolfesberger et al., 2017). La clasificación se basa en el inmunofenotipo de las células neoplásicas, la arquitectura del tejido neoplásico y la morfología de las células que lo componen (Trigo et al., 2015). El inmunofenotipo es una parte esencial de un diagnóstico preciso de linfomas. En medicina veterinaria, CD3 se usa para detectar células T y CD79a para células B, aunque, en perros y gatos, CD20 y Pax-5 se usan frecuentemente en lugar de CD79a, porque este marcador comúnmente causa unión nuclear artificial (Maxie, 2016) (Cuadro 1).

Clasificación REAL/OMS

Neoplasias de células precursoras T o B

Linfoma linfoblástico precursor (LBL)

Las neoplasia de linfoblastos que produce leucemia o linfoma, son poco comunes (Meuten, 2017). Los LBL son linfomas altamente agresivos de células B, T o raramente de células NK que puede ocurrir en linfonodos, bazo y con mayor frecuencia el timo. Las células forman infiltrados difusos de células de tamaño intermedio que se caracterizan por tener núcleo oval con cromatina dispersa y nucléolos poco evidentes. Tienen alta cuanta mitótica, arriba de 10 mitosis por campo de alto poder. El inmunofenotipo puede ser complicado porque CD20 y CD3 pueden ser negativos en células T o B, pero un pequeño grupo será bifenotípico, expresando CD20 y CD3 (Maxie, 2016). Se desarrolla en linfonodos periféricos sin involucrar médula ósea o sangre, o al menos no al inicio, los linfonodos más afectados suelen ser el mandibular accesorio, preescapular o poplíteo. Hay numerosas células apoptóticas en cada campo (Meuten, 2017). Clínicamente los animales con LBL de células T frecuentemente tienen hipercalcemia, mala condición corporal y presentan depresión (Maxie, 2016).

Neoplasias de células B maduras (periféricas)

Leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y linfoma linfocítico de células B pequeñas (B-SLL)

Se caracterizan por la proliferación de células linfoides pequeñas de aspecto maduro, y sólo casos raros ocurren como linfomas, mientras que la mayoría ocurre como leucemias (Maxie, 2016). Las células neoplásicas en B-CLL y B-SLL

parecen linfocitos maduros con núcleo pequeño y se identifican como células B mediante inmunofenotipificación (Meuten, 2017).

La leucemia linfocítica crónica es una neoplasia que se origina en la médula ósea que es caracterizada por una marcada linfocitosis (leucemia) ocasionada por la circulación de linfocitos B neoplásicos maduros pequeños. Los animales presentan pocos o ningún signo clínico, normalmente el bazo e hígado se encuentran agrandados por las células neoplásicas, pero los linfonodos pueden ser de tamaño normal. Los linfonodos en gatos y perros con CLL pueden estar atrofiados o alargados (Meuten, 2017).

Mientras que el linfoma linfocítico de células B pequeñas es una neoplasia de pequeños linfocitos B maduros que involucra linfonodos, bazo y otros órganos parenquimatosos. Éste es un linfoma poco común en perros y tiene un bajo ritmo de progresión. Los animales con B-SLL no son leucémicos o las células neoplásicas que se encuentren en circulación están en un nivel muy bajo debido a que la médula ósea no está involucrada o solamente de manera focal. Todos los órganos y linfonodos pueden estar eventualmente involucrados, ya que hay una progresión lenta y una diseminación gradual de los elementos neoplásicos. Las células neoplásicas tienen poco citoplasma, los núcleos de los linfocitos son pequeños y cromatina nuclear densa (Meuten, 2017). Las formas nodales de B-SLL borran la arquitectura de los linfonodos y se localizan en la zona internodular. La inmunofenotipificación con CD79a identificará el linaje de células B, pero el marcado puede ser débil. Las células pueden no marcar con CD20 y tienen baja actividad de proliferación por lo que el marcador Ki67 tiende a ser bajo (Maxie, 2016).

Linfoma difuso de células B grandes (DLBCLs)

Estas son neoplasias agresivas y de rápido crecimiento que representan el linfoma más frecuente en la mayoría de los animales domésticos, del cual hay múltiples subtipos. Los tipos centrolástico e inmunoblastico representan simples variantes morfológicas que comúnmente ocurren como poblaciones heterogéneas dentro de la misma neoplasia, pero distinguir estos subtipos no se ha asociado con diferencias en el comportamiento clínico o respuesta terapéutica. Por el contrario, otros subtipos como el linfoma de células B rico en células T (TCRBCL), linfomas anaplásicos de células grandes o la granulomatosis linfomatoide pueden representar un desafío diagnóstico importante y tener un comportamiento biológico distinto (Maxie, 2016).

DLBCL se puede encontrar en cualquier órgano, siendo más frecuente en linfonodos. Aunque, puede ocurrir como una neoplasia primaria mediastínica, gástrica u ocular. La mayoría de los casos surgen en la zona oscura del centro germinal de los centrolastos, se expande y destruye la arquitectura del linfonodo, caracterizado por un agrandamiento generalizado. En el bazo se expande dentro de las áreas de la pulpa blanca y comprime la pulpa roja, por lo que se llega a observar como nódulos que con el tiempo pueden unirse. Histológicamente, las células neoplásicas forman grandes láminas que a menudo asemejan a un “cielo estrellado” como resultado de macrófagos fagocitando células neoplásicas. Las células neoplásicas son grandes, y la forma de los núcleos centrolásticos es muy variable, mientras que los inmunoblastos son grandes y redondeados. Los núcleos son eucromáticos con cromatina granular gruesa, nucléolos anfílicos visibles y

pueden observarse figuras mitóticas atípicas. Las células marcan fácilmente con CD79a o CD20, y el índice mitótico con Ki67 es muy alto (Maxie, 2016).

Los linfomas DLBCL anaplásicos son neoplasias poco comunes que se caracterizan por células de núcleos grandes con abundante citoplasma. El TCRBCL es una variante que representa el más común de los linfomas nodales en gatos, están compuestos de láminas de células T pequeñas y reactivas mezcladas con histiocitos, eosinófilos y células B grandes que representan menos del 10 % de la población. Finalmente, la granulomatosis linfoide es un linfoma de poca frecuencia en perros y raramente en gatos, histológicamente se caracterizan por infiltrado mixto de células linfoides compuestas de células T maduras y células B grandes atípicas con histiocitos. Se observan comúnmente como nódulos neoplásicos grandes en los pulmones, pero también se pueden encontrar en piel, riñón o cualquier otra localización (Maxie, 2016).

Linfoma folicular de células B

Es un tumor de linfocitos B que forma nódulos en linfonodos y bazo. Este es uno de los linfomas nodulares indolentes y debe distinguirse de la hiperplasia nodular. En linfonodo el linfoma folicular y la hiperplasia linfoide se ve la presencia de nódulos inconfundibles, ambos pueden tener infiltración en la grasa perinodal por linfocitos y áreas donde los nódulos se están uniendo o están separados por estrechas bandas de tejido conectivo ordinario (Meuten, 2017). Un patrón de nódulos densamente empaquetados en todo el parénquima de un linfonodo es característico de linfoma folicular. Los nódulos son generalmente grandes de tamaño uniforme. Las vénulas paracorticales se comprimen entre los nódulos y no se pueden encontrar dentro de ellos. Otra característica importante es la ausencia

de macrófagos con cuerpos apoptóticos y proporciones uniformes de centrocitos y centroblastos. Tanto los centrocitos como centroblastos son positivos para CD79a y CD20, negativos para CD3 y el índice de Ki67 es bajo (Maxie, 2016).

Linfoma de zona marginal (MZL)

El linfoma de zona marginal MZL se origina en los linfonodos o bazo y es el tipo más común en bazo de perros y humanos. Se considera un linfoma de células B de grado bajo que tiene un curso indolente. Es uno de los linfomas que forman nódulos discretos y se vuelven laxos sólo en etapas tardías. La histología es necesaria para hacer diagnóstico según la disposición arquitectónica en un linfonodo o bazo. MZL tiene un arreglo característico de linfocitos neoplásicos rodeando centros germinales que se desvanecen resultando en un patrón nodular. La arquitectura nodular en la corteza de los linfonodos se debe a un centro germinal central, rico en células B, rodeado por una zona de células del manto compuesta por aproximadamente 90 % de linfocitos B y 10 % de linfocitos T. Cuando un linfonodo se estimula antigénicamente, la capa de zona marginal prolifera y se hace visible, formando un patrón polar en el que la zona marginal es más delgada hacia la paracorteza y más gruesa hacia el seno subcapsular. El polo más claro tiene las células en proliferación (centroblastos). La hiperplasia de la zona marginal (MZH) es un diferencial importante para MZL, ya que ambos se originan en la zona marginal de los nódulos linfoides (Meuten, 2017). También se ha descrito en tejido asociado a mucosas de las vías respiratorias y tracto intestinal (MALT) (Maxie, 2016).

Linfoma de células del manto (MCL)

Es un linfoma poco común e indolente de linfocitos B. Comienza focalmente en la región de las células del manto en el bazo. No es común observar células neoplásicas en sangre o médula ósea en perros. La mayoría de los casos en perros se encuentran primarios en bazo. En estados avanzados las infiltraciones se vuelven contiguas y pueden ser difusas, lo que resulta en una separación y adelgazamiento de las trabéculas de músculo liso esplénico (Meuten, 2017). La neoplasia se desarrolla del manguito interno del manto y es difícil diferenciarlo de la hiperplasia nodular esplénica que consiste en el predominio de las células del manto. Las mitosis son raras y las células B son positivas con CD79a y CD20 (Maxie, 2016).

Linfoma de Burkitt

El linfoma de Burkitt es un linfoma de células B. La enfermedad está bien caracterizada en humanos, pero no en animales. En patología veterinaria no hay un acuerdo uniforme para el diagnóstico. En humanos está asociado con el virus de Epstein –Barr (EBV), considerándose el primer tumor en humanos asociado a una infección viral. Este fue el primer tumor que se curó mediante quimioterapia. El linfoma de Burkitt utiliza algunas de las descripciones clásicas para caracterizar linfomas: hojas de células neoplásicas linfoides con alto recuento mitótico y una apariencia de “cielo estrellado” debido a numerosos macrófagos fagocitando linfocitos apoptóticos (Meuten, 2017).

Categoría provisional: Linfoma de células B de alto grado similar al de Burkitt (BKL)

Ésta es una categoría provisional reconocida en animales como un linfoma de células B de alto grado que se caracteriza por tener numerosos macrófagos con restos de células tumorales apoptóticas en su citoplasma, llamados también “*tingible body macrophages*” (Meuten, 2017). A microscopio en campo de bajo poder se puede observar la apariencia de “cielo estrellado”. Son células intermedias con núcleo redondo, hay leve anisocariosis y la cuenta mitótica es alta (Maxie, 2016).

Plasmocitoma extramedular

Plasmocitoma, linfoma plasmoblástico y linfoma linfoplasmocítico LPL son neoplasias de linfocitos B diferenciados y maduros, y las células neoplásicas se parecen o son células plasmáticas. Los plasmocitomas se producen fuera de los linfonodos. Es muy raro que se genere de los linfonodos o primario de médula ósea, pues tienen origen en tejidos blandos, más comúnmente en piel de orejas y dedos, y mucosa colorrectal. La mayoría de los plasmocitomas son benignos, aquellos que se encuentran en estómago o recto pueden ser agresivos, causar vómito y pérdida de peso. Están compuestos por células plasmáticas derivadas de los linfocitos B. Las características histológicas y citológicas varían desde los bien diferenciados que son fácilmente reconocibles hasta los mal diferenciados. Estas neoplasias requieren inmunohistoquímica (IHQ) para confirmar el diagnóstico. La mayoría tiene características morfológicas de células plasmáticas: células redondas uniformes, con moderada cantidad de citoplasma basofílico, zona de Golgi semiclara perinuclear, núcleos excéntricos, simples o binucleados, la

cromatina forma agregados en el centro del núcleo o a lo largo de la membrana nuclear y bajo conteo mitótico. Algunas células tumorales pueden contener inclusiones intracitoplásmicas que van desde vacuolas semiclaras hasta distintos glóbulos eosinofílicos o paquetes de forma romboidal de inmunoglobulina. Estas se aprecian mejor en citología y se conocen como células de Mott (Meuten, 2017). Raros son los casos que se han reportado en gatos. En general la marcación de Ki67 es baja. La confirmación se puede realizar con inmunohistoquímica con los marcadores Mum-1, inmunoglobulinas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas (Maxie, 2016).

Mieloma múltiple

El mieloma es una proliferación de células plasmáticas malignas que se origina en la médula ósea y se asocia con gammopatías monoclonales y múltiples lesiones óseas osteolíticas. El diagnóstico se establece mediante la visualización de células tumorales en una citología por aspiración o biopsia de médula ósea. Algunos factores asociados a un pobre pronóstico son: hiperalcemia, leucemia, hiperazotemia, citopenias y proteinuria (Meuten, 2017).

Neoplasias de células T y células NK

Neoplasias maduras de células T (periférico)

La clasificación de este subtipo de neoplasias por su localización primaria ha resultado en la identificación de linfoma nodal de células T, linfoma extranodal de células T, enteropatía asociada a linfoma (EATL) y linfomas cutáneos de células T. El linfoma granular linfocítico de células T grandes se han caracterizado como un subtipo específico (Maxie, 2016).

Linfomas periféricos de células T no especificados (PTCL)

Éste se ha reportado en todas las especies, porque es un grupo heterogéneo para todos los linfomas de células T maduros no específicos. En este se incluyen todos los linfomas de células T que no cumplen con los criterios de los otros subtipos. Puede ocurrir en linfonodos, bazo, piel y tejido subcutáneo. PTCL es un linfoma altamente agresivo que responde pobremente a la quimioterapia. La composición celular varía entre cada caso, pueden ser células de tamaño pequeño, intermedio o grande, siendo este último el más común y algunas neoplasias contienen componentes inflamatorios (Maxie, 2016).

Linfoma nodal de células T

Esta clasificación incluye a linfoma de zona T, linfoma anaplásico de células T grandes, y linfoma angioinmunoblástico de células T y las variantes restantes se clasifican actualmente como linfomas de células T periféricos no especificados.

El diagnóstico de linfomas de zona T (TZL) se basa principalmente en su arquitectura característica de la proliferación de células T que provoca reducción y desvanecimiento de los centros germinales. El conteo mitótico es bajo y las células son positivas a CD3. El linfoma anaplásico de células T grandes (ALTCL) es raro y de mal pronóstico, las células neoplásicas tienen abundante citoplasma, con núcleos grandes, irregulares y aberrantes por lo que recibe su nombre. Comúnmente son negativas a CD3 por lo que se pueden usar técnicas moleculares para determinar su clonalidad. El linfoma angioinmunoblástico de células T es otro linfoma nodular raramente reportado positivo a CD3 y entremezclado con células B y eosinófilos (Maxie, 2016).

Linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL)

Estos son tumores intestinales de linfocitos intraepiteliales, que se dividen en EATL tipo 1, el cual es una neoplasia de células grandes que se asocia con necrosis y antecedentes inflamatorios, mientras que EATL tipo 2 es una neoplasia de células pequeñas a intermedias. Las células neoplásicas intraepiteliales son células T positivas para CD3 y negativas para CD20 y CD79a. EATL tipo 1 tiene mayor positividad para Ki67 que el tipo 2. Independientemente del tipo, los animales comúnmente presentan pérdida de peso, anorexia, vómito, diarrea, letargia, polidipsia y poliuria. EATL tipo 1 tiene peor pronóstico y responde poco a la terapia con un tiempo de supervivencia limitado a unas pocas semanas o meses. EATL tipo 1 se ha asociado con infiltración transmural, tiene mayor incidencia en yeyuno. EATL tipo 2 se ha reportado principalmente en gatos geriatras y ocurre con mayor frecuencia como linfoma intestinal en yeyuno. En casos avanzados, los linfocitos neoplásicos destruyen las vellosidades, los cuales son asociados con atrofia y fusión de vellosidades (Maxie, 2016).

Linfoma extranodal de células T

Aunque la mayoría de los linfomas de células T extranodales en la mayoría de las especies animales se clasifican como linfomas de células T periféricos no especificados, los linfomas hepatoesplénicos de células T rara vez se presentan en perros y caballos (Maxie, 2016).

Linfoma cutáneo de células T (CTCL)

Es un grupo heterogéneo de linfomas que incluyen linfomas epiteliotrópicos y no epiteliotrópicos. Los epiteliotrópicos aparecen como micosis fungoides, reticulosis pagetoide o síndrome de Sézary. Los no epiteliotrópicos aparecen como linfoma

de células T subcutáneo “similares a la paniculitis” o linfoma anaplásico de células T grandes; todos los demás CTCL no epiteliotrópicos se clasifican actualmente como linfomas de células T periféricos no específicos (Maxie, 2016).

Cuadro 1. Resumen de algunas características de linfomas de acuerdo con la clasificación de REAL/OMS.

Nombre	Sigla	Sitio anatómico	Marcador IHQ	Comportamiento/pronóstico	Características
Linfomas de células B					
Neoplasias de células precursoras B					
Linfoma linfoblástico	LBL	Linfonodo (mandibular accesorio, preescapular o poplíteo) y Bazo	CD79a CD20 CD3 o Bifenotípico	Altamente agresivos	Células intermedias Alto conteo mitótico >10 mitosis por campo de alto poder Poco común
Neoplasias maduras de células B					
Linfoma linfocítico de células B pequeñas	B-SLL	Linfonodo, bazo y otros órganos parenquimatosos	CD79a (puede ser débil) CD20 Ki67 (bajo)	Indolente Progresión lenta y diseminación gradual	Raro Pocas mitosis Células pequeñas (maduras)
Linfoma difuso de células B grandes	DLBCLs	Linfonodo con mayor frecuencia Cualquier órgano	CD79a o CD20 Ki67 alto	Agresivos de rápido crecimiento Tiempo de supervivencia menor a un año	Más común Células intermedias y grandes Cielo estrellado Centroblástico Inmunoblástico Anaplásico Rico en células T
Linfoma folicular de células B	FL	Linfonodo Bazo Poco común en medicina veterinaria	CD79a y CD20 Ki67 bajo	Indolente Pocos casos se ha dado seguimiento al tiempo de supervivencia	Nódulos densamente empaquetados No hay macrófagos con cuerpos apoptóticos Células grandes e intermedias
Linfoma B de zona marginal	MZL	Más común en bazo Linfonodo	CD79a CD20	Bajo grado Indolente	Linfocitos en zona marginal rodean centros germinales con patrón nodular Células intermedias Nucléolo prominente
Linfoma de células del manto	MCL	Bazo más común Linfonodo	CD79a y CD20	Indolente	Poco común Comienza en células del manto Células intermedias Nucléolos pequeños
Linfoma tipo Burkitt	BKL	Linfonodo, bazo y otros órganos (hígado o riñón)	CD79 a y CD20	Alto grado Cuenta mitótica alta	Numerosos macrófagos con cuerpos apoptóticos “Cielo estrellado” Células intermedias

Plasmocitoma extramedular		Tejidos blandos (piel y mucosa)	Ki67 baja Mum-1 Cadenas ligeras de Ig's	Benignos la mayoría Estómago y recto agresivos	Morfología de células plasmáticas Células Mott Inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas (Cuerpos de Russell)
Mieloma múltiple		Médula ósea y otras localizaciones	CD79a MUM 1 (núcleo)	Sobrevida menor a 2 años	Lesiones osteolíticas Depósitos de amiloide Síndrome de hiperviscosidad sanguínea
Linfoma células T y NK					
Neoplasia células precursoras T					
Linfoma linfoblástico T	TBL	Timo Linfonodos	CD20 o CD3 Bi-fenotípico	Altamente agresivos	Células intermedias Hipercalcemia Alta cuenta mitótica
Neoplasia maduras células T (periférico)					
Linfoma nodal de células T (TZL)					
Linfoma zona T		Linfonodo Arquitectura nodular	CD3	Cuenta mitótica baja Indolente	Abundantes células que desvanecen los centros germinales
Anaplásico de células T grandes			CD30	Mal pronóstico	Poco común Células multinucleadas
Linfoma angioinmunoblástico de células T			CD3	Comportamiento agresivo	Entremezclado con linfocitos B y eosinófilos
Linfomas periféricos de células T no especificados	PTCL	Linfonodo, bazo, piel y tejido subcutáneo	CD3	Altamente agresivo Responde pobremente a quimioterapia	Incluye a todos los linfomas que no cumplen con criterios de otros subtipos Células pequeñas, intermedias o grandes
Linfoma de células T asociado a enteropatía	EATL	Intestino Mayor incidencia en yeyuno	CD3	Depende del tipo	Origen linfocitos intraepiteliales Letargia, pérdida de peso, anorexia, vómito, diarrea, poliuria y polidipsia
Células grandes EATL tipo 1		Más común perros	Ki67 mayor positivada que tipo 2	Mal pronóstico y responde poco a terapia Tiempo de sobrevida semanas a meses	Células grandes asociado a necrosis y antecedentes inflamatorios
Células pequeñas EATL tipo 2		Más común en gatos	Ki67 baja positivada	Indolente Mejor pronóstico	Células pequeñas o intermedias Sin antecedente inflamatorio y necrosis rara
Linfoma extranodal células T					
Linfoma hepatoesplénico		Hígado y bazo	CD3, CD11d Granzima	Poco común Mal pronóstico con rápido	Hepatomegalia y esplenomegalia Linfocitos intermedios a

			b	progreso	grandes
Linfoma hepatocitotrópico		Bazo Pulmón	CD3		Pocos reportes
Linfoma cutáneo de células T	CTCL	Cutáneo	CD3		Epiteliotrópicos y no epiteliotrópicos
Linfoma T cutáneo epiteliotrópico					
Micosis fungoides (MF)		Uniones mucocutáneas y pie	CD8	Rápido progreso Alto potencial de metástasis	Linfocitos pequeños a intermedios infiltrando epidermis
Reticulosis pagetoide		Epidermis	CD3		Linfocitos intermedios
Sézary síndrome		Similar a MF con linfadenopatía o leucemia secundaria			
Linfoma T cutáneo no epiteliotrópico					
Linfoma T subcutáneo parecido a paniculitis		Tejido subcutáneo en tronco y extremidades	CD3 CD8	Indolente	Parecido a paniculitis Células pequeñas a intermedias
Linfoma T anaplásico		Nódulos únicos o múltiples en piel	CD3	Agresivo Pobre pronóstico	Hojas densas desplazando folículos pilosos y fibras de colágena

Hallazgos de laboratorio clínico

Los hallazgos son muy variables. Se observa comúnmente anemia no regenerativa de diversas severidades. Tanto linfopenia como linfocitosis pueden ocurrir con diferentes tipos de linfomas, y la hipercalcemia debida a la secreción de péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o lisis ósea se ha observado comúnmente en algunas entidades de linfoma (Maxie, 2016).

Los mielomas en gatos se han asociado a lesiones osteolíticas. En mielomas múltiples puede observarse hipergammaglobulinemia que causa hiperviscosidad sanguínea y con ello coagulopatías, aunque no es común en plasmocitomas extramedulares (Meuten, 2017).

Las características distintivas del cáncer “Hallmarks”.

Una neoplasia resulta de la expresión clonal de una sola célula que ha cursado con un daño genético, típicamente en uno de los cuatro tipos de reguladores

normales: protooncogenes, son genes celulares que regulan el crecimiento celular y diferenciación; genes supresores de tumores que inhiben el crecimiento; genes que regulan la apoptosis (muerte celular programada); y genes que median la reparación del DNA (Maclachlan and Dubovi, 2011).

Los oncogenes son genes capaces de inducir o mantener la transformación de células neoplásicas; estos se derivan de los protooncogenes. Los antioncogenes (genes supresores) son aquellos que regulan la evolución normal de las células, y en su ausencia no hay forma de controlar el crecimiento de las células neoplásicas. Oncogénesis se refiere a los mecanismos de desarrollo de un tumor, y carcinogénesis es la producción de cáncer que, a criterio de algunos autores, se limita a la inducción experimental (Trigo et al., 2014).

Cuando ocurren alteraciones en los protooncogenes, estos se transforman en oncogenes mediante un proceso denominado activación. Existen aproximadamente cincuenta o sesenta oncogenes descritos en medicina humana y veterinaria, y las proteínas a las cuales codifican se denominan oncoproteínas. Los oncogenes pueden afectar la replicación celular, en la producción o expresión de factores de crecimiento, receptores para los factores de crecimiento, proteínas de transducción de señales (proteína G, receptores sin actividad de tirosina cinasa), y de proteínas nucleares de transcripción (productos de myc, myb, fos, jun) (Trigo et al., 2014).

Los Hallmarks del cáncer.

Las características distintivas del cáncer comprenden diez capacidades biológicas, para entender la complejidad de las enfermedades neoplásicas, que incluyen:

mantener la señalización de proliferación celular, evadir los supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, activar la invasión y metástasis, la inestabilidad del genoma que genera diversidad genética, inflamación, la reprogramación del metabolismo energético, y evasión de la destrucción inmunológica (Douglas and Robert, 2011). A medida que las células evolucionan a un estado neoplásico adquieren estas capacidades. Los tumores son tejidos complejos compuestos de múltiples tipos de células que participan en interacciones entre sí. Por ejemplo, las células que forman el estroma asociado al tumor son participantes activos en la tumorigénesis, que contribuyen al desarrollo y expresión de ciertas capacidades distintivas, por lo que la biología de los tumores ya no se puede entender simplemente enumerando los rasgos de las células cancerosas, sino que debe abarcar las contribuciones del “microambiente tumoral” (Douglas and Robert, 2011).

Mantener la señalización de proliferación celular.

Es la capacidad para mantener la proliferación crónica. Los tejidos normales cuidan la producción y liberación de señales promotoras que instruyen la entrada y progresión a través del ciclo de crecimiento y división celular, asegurando así la homeostasis del número celular, por lo tanto, mantenimiento de la arquitectura y función normal del tejido. Las células cancerosas desregulan estas señales que son transmitidas en gran parte por factores de crecimiento que se unen a los receptores de superficie celular, que típicamente contienen dominios de tirosina quinasa intracelular que proceden a emitir señales a través de vías intracelulares

que regulan la progresión a través del ciclo celular, así como el crecimiento celular, sin embargo, estas señales siguen siendo poco comprendidas. Por otra parte, la señalización mitogénica en las células cancerosas es mejor entendida. Las células cancerígenas pueden adquirir la capacidad de mantener la señalización de proliferación, producir ligandos del factor de crecimiento, a los que pueden responder mediante expresión de receptores afines, lo que resulta en estimulación autocrina, o bien, estas pueden enviar señales para estimular células normales dentro del tumor. También se pueden elevar los niveles de proteínas receptoras en la superficie de las células cancerosas, haciendo que dichas células sean hiperreactivas a cantidades limitadas de factor de crecimiento (Douglas and Robert, 2011).

Evadir supresores de crecimiento.

Las células cancerosas deben tener la habilidad para evadir la señalización inhibitoria de crecimiento. Los principales agentes inhibidores de crecimiento son un grupo de 25 o más genes supresores de tumores, estos genes juegan un papel importante en el control del crecimiento celular normal, sirven como “frenos” de la replicación celular. Cuando ambos alelos de estos genes son dañados o perdidos, las células pierden el control de la proliferación, y la célula afectada tiene alto riesgo de sufrir transformación neoplásica. El primer gen supresor tumoral que se descubrió fue el gen RB o retinoblastoma (asociado con retinoblastoma). Otro gen supresor tumoral es el TP53 (Meuten, 2017), llamado guardián del genoma. Ambos operan como centrales de control que gobiernan las decisiones de las células de proliferar o activar programas apoptóticos. La ausencia de RB permite

la persistencia de proliferación celular, por señalización extracelular principalmente. Mientras que TP53 recibe señales dentro de la célula, si el grado del daño al genoma es excesivo, entre otras señales, puede detener el avance del ciclo celular (Douglas and Robert, 2011).

Resistencia a la muerte celular

La apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer, que se dividen en dos circuitos principales, uno que recibe y procesa señales extracelulares inductoras de muerte (extrínseco), por ejemplo, Fas/Fas ligando, y el otro que detecta e integra gran variedad de señales de origen intracelular (intrínseco). Cada uno culmina en la activación de proteasa latente (caspasas 8 y 9), que procede a iniciar una cascada de proteólisis por parte de caspasas en donde la célula se desarma progresivamente y luego es fagocitada por células vecinas y fagocíticas profesionales. El desencadenante apoptótico está controlado por miembros antiapoptóticos de las proteínas reguladoras de la familia Bcl-2, actuando al unirse y suprimir a dos proteínas desencadenantes proapoptóticas (Bax y Bak) (Douglas and Robert, 2011).

Habilitando la inmortalidad replicativa

Los telómeros protegen los extremos de los cromosomas y están involucrados en una capacidad ilimitada de proliferación. La presencia de la telomerasa, DNA polimerasa especializada en agregar DNA telomérico, se correlaciona con una resistencia a la apoptosis (Douglas and Robert, 2011).

Inducir angiogénesis

Los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono. La neovascularización asociada al tumor resuelve estas necesidades. Para lo cual requiere nuevas células endoteliales y su ensamblaje en tubos (vasculogénesis) y el brote de nuevos vasos sanguíneos de unos existentes (angiogénesis). Durante la tumorigénesis siempre está activa la angiogénesis. Algunos de los reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a la superficie celular en el endotelio vascular como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) (Douglas and Robert, 2011).

Activación de invasión y metástasis

La metástasis es un proceso de varios pasos ineficiente, y solo una pequeña porción de células son capaces de completar el proceso (Meuten, 2017). En el caso de carcinomas que progresan de tejido epitelial a grados patológicos más altos de malignidad, se ven reflejados en una invasión local y metástasis a distancia, las células asociadas al cáncer tienden a desarrollar alteraciones en su forma, así como en su unión a otras células y a la matriz extracelular. La alteración mejor estudiada implica la pérdida de E-cadherina por las células de neoplasias epiteliales, una molécula clave de adhesión entre células. El aumento de la expresión de E-cadherina está bien establecido como antagonista de la invasión y metástasis, mientras que la reducción en su expresión se conocía como potenciador de estos fenómenos (Douglas and Robert, 2011). Eventualmente las células encuentran un vaso linfático o sanguíneo y entran al torrente sanguíneo o

linfático, intravasación, que solo es posible después de la adhesión de las células tumorales a la membrana basal del vaso y la degradación de esta barrera. La extravasación es facilitada por el incremento de los nuevos, pero anormales, vasos sanguíneos formados entre el tumor (Meuten, 2017). Investigaciones recientes han revelado un proceso conocido como “transición epitelial-mesenquimal” (EMT), se ha convertido en un medio importante para adquirir la capacidad de invadir, resistir la apoptosis y diseminar las células epiteliales transformadas (Douglas and Robert, 2011).

Inestabilidad del genoma que genera diversidad genética

Una de las características favorables para el desarrollo de cáncer es la habilidad de las células cancerígenas de incrementar las tasas de mutación. Normalmente la habilidad del genoma para mantener un sistema que detecte y resuelva los defectos en el DNA, asegura que la tasa de mutación espontánea sea muy baja durante cada generación de células. Las mutaciones se logran a través de la sensibilidad a agentes mutagénicos, por el desajuste en uno o varios componentes de la maquinaria que mantiene el genoma, además que puede acelerarse al comprometer a los sistemas de vigilancia que normalmente monitorean la integridad genómica e inducen apoptosis a las células genéticamente dañadas. La maquinaria que mantiene el genoma se ha denominado como cuidadores del genoma: detectan el daño en el DNA y activan mecanismos de reparación, reparan directamente el daño en el DNA o interceptan moléculas mutagénicas antes de que dañen al material genético. En un futuro será posible detectar mediante técnicas moleculares, patrones de mutaciones que

alteran la función, estabilidad del genoma y favorezcan la progresión neoplásica (Douglas and Robert, 2011).

Inflamación

Otra característica favorable para el desarrollo de cáncer es la inflamación. Todas las lesiones neoplásicas contienen células del sistema inmune en diferentes grados, desde leves infiltrados que únicamente son detectables con anticuerpos específicos, hasta infiltrados severos que son evidentes con técnicas de histoquímica. Las células principalmente asociadas son las del sistema inmune innato, la progresión neoplásica básicamente se debe a que la inflamación puede contribuir a esto mediante el suministro de moléculas bioactivas al microambiente tumoral como: factores de crecimiento, factores de supervivencia, factores proangiogénicos, modificación de la matriz extracelular, invasión y metástasis, además, las células inflamatorias liberan productos químicos como especies reactivas de oxígeno, que son altamente mutagénicos (Douglas and Robert, 2011).

Reprogramación del metabolismo energético

La proliferación celular crónica y descontrolada no solo involucra un mal control en la proliferación celular, también corresponde a desajustes en el metabolismo energético para impulsar el crecimiento celular. Una característica anormal fue observada en el metabolismo energético, en el cual las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de glucosa y por lo tanto también su producción de energía, limitándolo principalmente a glucólisis, a lo cual se le ha denominado “glucólisis aeróbica”, ya que deben compensar la baja eficiencia de producción de

ATP. Esto lo hacen, en parte, mediante la regulación positiva de transportadores de glucosa, principalmente GLUT1, los cuales aumentan la importación de glucosa al citoplasma. También se ha demostrado asociación entre la glucólisis con la activación de oncogenes como RAS, que independientemente puede incrementar los niveles de los factores de transcripción HIF1 α y HIF2 α , los cuales regulan positivamente la glucólisis. Algunos tumores contienen dos poblaciones de células que funcionan simbióticamente: una población de células dependientes de glucosa que secretan lactato como desecho, el cual es importado y usado como generador de energía de la otra población celular (Douglas and Robert, 2011).

Evasión de la destrucción inmunológica

El papel del sistema inmune es permanecer alerta como una barrera para la formación y progresión de tumores, al menos en algunas formas de cáncer no inducidas por virus. En estudios con ratones genéticamente modificados, deficientes en varios componentes del sistema inmune, fueron sometidos para desarrollar tumores y se observó que estos son más recurrentes y crecen más rápido en ratones inmunodeficientes comparados con los controles inmunocompetentes. En particular con deficiencia del desarrollo y función de linfocitos T CD8+ citotóxicos, linfocitos T CD4+ Th1 cooperadores o células NK (Douglas and Robert, 2011).

Oncovirus

Son muchos los agentes que producen daño genético y que inducen la transformación neoplásica de las células. Uno de ellos son los microorganismos oncogénicos, principalmente virus. Se ha demostrado que un gran número de

virus DNA y RNA son oncogénicos (Trigo et al., 2014). Sin embargo, en medicina humana solo unos cuantos se han relacionado definitivamente con el cáncer (Maclachlan and Dubovi, 2011). Los virus más frecuentemente implicados en el desarrollo de cáncer en animales son los retrovirus (Trigo et al., 2014). De acuerdo con la clasificación del ICTV, la familia *Retroviridae* se divide en dos subfamilias *Orthoretrovirinae* y *Spumaretrovirinae*, la subfamilia *Orthoretrovirinae* está dividida en 6 géneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Gammaretrovirus* y *Lentivirus*, en total esta subfamilia cuenta con 49 especies. Mientras que la subfamilia *Spumaretrovirinae* cuenta con 5 géneros y 19 especies, las cuales no tiene mucha importancia clínica (ICTV, 2019).

Los retrovirus son una causa importante de neoplasias en muchas especies de animales, incluidos bovinos, gatos, primates no humanos, ratones y pollos, entre otros. Su patogenia está vinculada a su propensión a integrarse aleatoriamente dentro del genoma de las células hospederas, por lo que son mutágenos infecciosos, las consecuencias de dicha integración es en gran medida inocua y clínicamente silenciosa, rara vez resultan en oncogénesis. Los retrovirus pueden ser biológicamente divididos en exógenos (transmitidos horizontalmente) o endógenos. En raras ocasiones, un retrovirus competente en replicación se integrará en el genoma de las células germinales del hospedero y una copia completa de DNA del genoma viral (conocido como provirus) puede transmitirse posteriormente en el DNA de la línea germinal del progenitor a la prole (a través de óvulos o espermatozoides) y, a lo largo de la evolución, puede perpetuarse en los individuos de una especie animal, a estos retrovirus se les llama endógenos. Los provirus endógenos son expresados de diversas formas en

diferentes tejidos, diferentes edades y bajo el control de varios estímulos, incluyendo hormonales y estados inmunológicos. Cuando una célula en división expresa dos o más provirus, los genomas provirales pueden recombinarse para formar nuevas variantes retrovirales con nuevas habilidades para afectar células somáticas (Maclachlan and Dubovi, 2011).

Los retrovirus oncogénicos son clasificados como retrovirus transformadores crónicos o transformadores agudos, estos dos tipos principales de retrovirus transformadores inducen neoplasia de diferentes maneras. Los retrovirus transformadores crónicos inducen neoplasias a través de integraciones aleatorias en el genoma de las células somáticas. Ejercen su efecto como retrovirus “activadores de *cis*” que transforman las células al integrarse en el DNA de la célula hospedera cerca de un gen regulador del crecimiento, y usurpando así la regulación normal de este gen, estos genes de la célula hospedera que regulan el crecimiento celular son denominados “oncogenes” u oncogenes celulares (*c-onc*), los cuales son genes que codifican productos de señalización celular que regulan la proliferación y quiescencia normal de una célula. La presencia de un provirus integrado, con sus fuertes elementos promotores y potenciadores, pueden amplificar la expresión de genes *c-onc*. Mientras que los retrovirus de transformación aguda son oncogénicos directamente por portar un oncogén viral adicional *v-onc*, directamente responsable del rápido cambio de malignidad que ocurre en células afectadas con estos virus (Maclachlan and Dubovi, 2011).

Leucemia viral felina

El virus de la leucemia viral felina es un *Gammaretrovirus* de gatos domésticos, la infección se presenta en todo el mundo y a partir de su descubrimiento fue considerada como la mayor causa de muertes en gatos, así como responsable de diversos síndromes clínicos. Su estructura es RNA de cadena sencilla, la cual es transcrita reversamente a DNA; se integra al genoma de la célula infectada (el DNA integrado es llamado “provirus”) con la ayuda de una integrasa. Después ocurre la síntesis de proteínas virales con el ensamblaje del virión cerca de la membrana celular y su posterior salida de la célula hospedera (Greene and Sykes, 2013). De acuerdo con el comité internacional sobre taxonomía de virus (ICTV) del 2018, el virus de la leucemia viral felina pertenece al orden *Ortervirales*, familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Gammaretrovirus* y especie Virus de leucemia viral felina (ICTV). En la clasificación de Baltimore se encuentra en el grupo VI RNA de cadena sencilla retrovirus retrotranscriptasa para formar DNA intermediario. El virus de la leucemia viral felina (LeVF) fue descrito por primera vez por William Jerret y colaboradores en 1964, cuando se observó la salida de partículas virales de la membrana de linfoblastos malignos de un gato con linfoma natural. Es un agente exógeno que se replica dentro de muchos tejidos, incluso la médula ósea, las glándulas salivales y el epitelio respiratorio. El virus no es citopático y escapa mediante la brotación de la membrana celular. Puede provocar enfermedad clínica relacionada con el sistema inmunológico y hematopoyético, y neoplasias. Después de la infección inicial, si no interviene la respuesta inmunitaria, el LeVF se propaga a la médula ósea e infecta las células

precursoras hematopoyéticas. En las células infectadas, se transcriben las copias de DNA viral que se insertan de forma aleatoria en el DNA del hospedero (Greene and Sykes, 2013).

El virus de la leucemia viral felina causa diversas neoplasias en gatos, tales como linfoma, leucemia, otros tumores hematopoyéticos y sarcomas fusocelulares, siendo el linfoma el más común y agresivo, aunque estas neoplasias también ocurren en ausencia de LeVF. El mecanismo mediante el cual induce al desarrollo de estas neoplasias se explica por la inserción del genoma de LeVF al genoma celular, cerca de un protooncogén de la célula afectada (comúnmente *myc*) resultando en la activación (oncogén) y sobreexpresión de ese gen. Los sitios de interacción más comunes para LeVF asociados a linfoma se han identificado en seis loci: *c-myc*, *flvi-1*, *flvi-2 (bmi-1)*, *fit-1*, *pim-1* y *flit-1* (Greene and Sykes, 2013).

Genoma y proteínas de LeVF

El virus es un típico retrovirus que contiene RNA de cadena simple que se transcribe mediante la enzima transcriptasa reversa (RT) a DNA, denominado provirus, que se integra posteriormente al genoma celular. Desde el extremo 5' al 3' el orden genético viral es LTR-gag-pol-env-LTR. El gen *gag* (antígeno asociado a grupo) codifica las proteínas estructurales internas (Cuadro 2), incluso p15c, p12, p27 y p10. La proteína *gag p27*, se usa para detección clínica de LeVF, se produce en células infectadas por virus en cantidades que exceden las necesarias para la unión de nuevas partículas virales, lo cual la vuelve abundante en el citoplasma de células infectadas, y plasma de gatos infectados, por lo que las pruebas utilizadas son inmunocromatografías, ensayo de inmunoadsorción ligada

a enzima (ELISA) o anticuerpo fluorescente. El gen *pol* (polimerasa) es el responsable de la síntesis de DNA en la plantilla de RNA. El gen *env* (envoltura) codifica los componentes gp70 y p15e de envoltura. La proteína gp70 define el subgrupo viral y es importante en la inducción de inmunidad, por lo cual los anticuerpos anti-gp70 son específicos de subgrupo y dan como resultado neutralización viral e inmunidad. Por lo tanto, esta proteína es importante para la producción de vacunas. Se cree que la proteína p15 de transmembrana interfiere en la respuesta inmunológica celular del individuo afectado, facilitando la persistencia viral (Figura 1). La secuencia genética contiene repeticiones terminales largas (LTR), que son secuencias repetidas que poseen función reguladora y controlan la expresión de los otros genes virales, pero en general no codifican un producto proteico. Dentro de las LTR, las secuencias de aumento recurrentes (UREs) se encuentran con frecuencia en leucemias mieloides en gatos, y se cree que están asociadas con oncogénesis (Greene and Sykes, 2013). Diversos estudios han demostrado la importancia de las LTR en la patogénesis de LeVF, como ya se ha mencionado puede activar proto-oncogenes adyacentes al sitio de inserción, además, mediante el transcrito de RNA generado se ha demostrado transactivación de genes celulares, independientemente del sitio de inserción, donde se incluye la activación del factor de transcripción NFκB. Este factor de transcripción se ha asociado con mecanismos de defensa como activación de citocinas inflamatorias y recientemente se ha descubierto su importante papel en la supervivencia celular y habilidad antiapoptótica por varias vías, como la estimulación de la familia Bcl-2, lo que facilita la tumorigénesis (Abujamra et al., 2006).

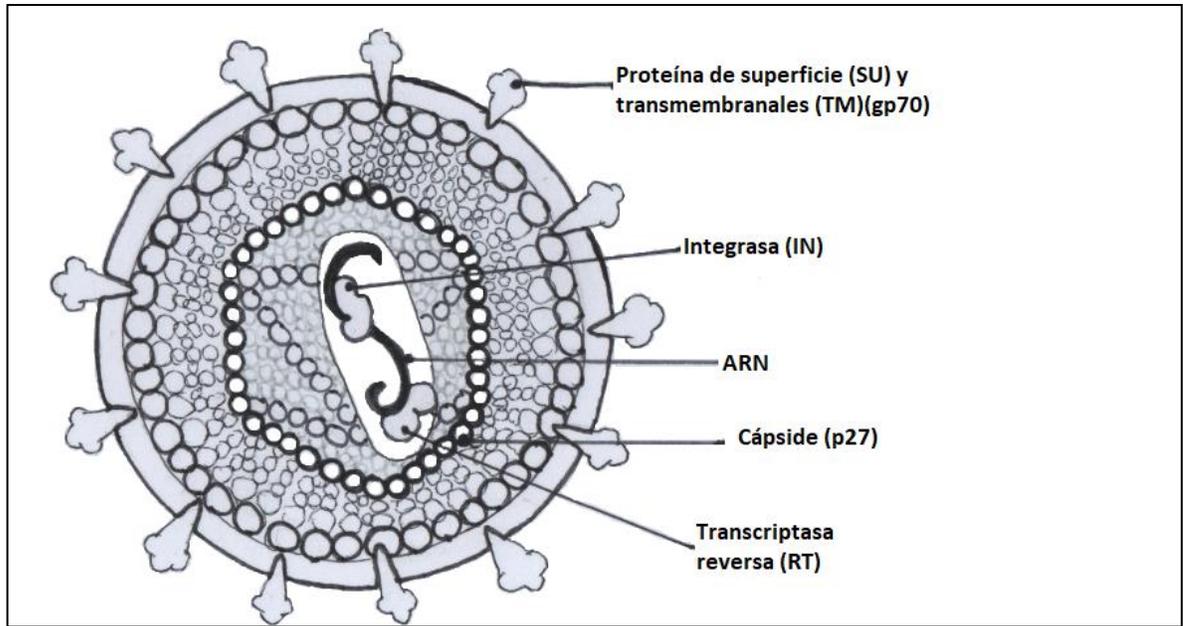


Figura 1. Estructura del virus de leucemia viral felina.

Gen	Ubicación	Tipo	Función	Uso
<i>gag</i>	Centro		Base de pruebas de IF indirecta y ELISA, hipersensibilidad tipo III y efectos citotóxicos	
		P15c	Proteína de matriz	
		P12	Desconocida	
		P27	Proteína de cápside	Detección en plasma, lágrimas y saliva ELISA, IF e IHQ
		P10	Proteína de nucleocápside	
<i>pol</i>	Centro	RT	Copia de proteínas virales en la hebra de DNA complementaria	
<i>env</i>	Envoltura	Gp70	Unidad de superficie externa: antígenos específicos de tipo A, B, C; responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes o protector contra infección viral	IHQ
		P15e	Proteína transmembrana; inmunosupresión viral	

Cuadro 2. Proteínas del virus de la leucemia viral felina y su importancia, modificado de Greene and Sykes, 2013.

Subgrupos de LeVF

En los gatos se hallan tanto retrovirus exógenos (patógenos) como endógenos (no patógenos). Los virus exógenos pueden transmitirse de forma horizontal. El subgrupo LeVF-A es contagioso y puede pasar de forma horizontal entre gatos en la naturaleza. Los subgrupos LeVF-B y LeVF-C evolucionaron de novo en un gato infectado con LeVF-A mediante mutaciones y recombinaciones entre este último y secuencias retrovirales endógenas o celulares contenidas en el DNA felino normal. La patogenicidad de los subgrupos B y C es más alta que la del subgrupo A. El subgrupo B se aísla con mayor frecuencia de los gatos con linfoma, el C es menos frecuente y se asocia principalmente con anemia no regenerativa y eritroleucemia. El subgrupo LeVF-T evolucionó del subgrupo LeVF-A con afinidad a dos proteínas celulares: Pit 1 y FeLIX; resulta altamente citolítico para los linfocitos T y provoca inmunosupresión grave (Greene and Sykes, 2013).

Transmisión

El LeVF se propaga por contacto directo entre gatos que liberan virus y gatos susceptibles. La transmisión ocurre principalmente por medio de la saliva, donde la concentración del virus es más alta que en el plasma. Los gatos virémicos liberan constantemente millones de partículas virales en la saliva. El comportamiento social, como compartir platos de comida y agua, acicalarse mutuamente y utilizar áreas de arena sanitaria comunes, son los medios más eficaces de transmisión. La envoltura viral es soluble en lípidos y susceptible a desinfectantes, jabones, calor y secado. El virus se inactiva fácilmente en el ambiente. Puede ocurrir transmisión vertical de madre a cachorros, pueden ser

infectados de forma transplacentaria o cuando la madre los lame y amamanta. También puede ocurrir transmisión en gatas infectadas de forma latente, porque es posible que una infección latente se reactive durante la preñez. La susceptibilidad a la infección por LeVF es más alta en gatitos jóvenes, posiblemente asociado a la expresión de receptores (Greene and Sykes, 2013).

Patogenia

El resultado de la infección por LeVF es muy diferente en cada gato. A pesar de que depende principalmente del estado inmunológico y edad del gato, también se ve afectado por la patogenicidad del virus, la progresión de la infección y la concentración viral. Después de la infección inicial que ocurre comúnmente por vía oronasal, el virus se replica en el tejido linfático local en la zona orofaríngea. En gatos inmunocompetentes, con una respuesta inmunitaria eficaz mediada por células y humoral detiene la replicación viral. Estos gatos nunca se vuelven virémicos, presentan niveles altos de anticuerpos neutralizantes y se conoce como infección abortiva (Greene and Sykes, 2013).

Después de la infección LeVF se replica y propaga sistémicamente dentro de las células mononucleares (linfocitos y monocitos). Durante este primer episodio virémico, el antígeno libre p27 es detectable, y los gatos resultan positivos en las pruebas que detectan antígenos libres en plasma (ELISA). La viremia inicial puede estar caracterizada por malestar, fiebre o linfadenomegalia como resultado de hiperplasia linfocítica. El virus se propaga a los tejidos blanco, como el timo, bazo, linfonodos y glándulas salivales. La viremia termina dentro de 3 a 6 semanas con un máximo de 16 semanas y se conoce como infección regresiva. Durante este

tiempo los gatos liberan virus y muchos pueden eliminar al virus en etapa temprana antes de que se infecte la médula ósea, además de eliminar el virus del cuerpo por completo, desarrollan una inmunidad muy eficaz. Después de aproximadamente 3 semanas de viremia, se involucran las células de la médula ósea. En este momento, se desarrolla un alto nivel de viremia y es posible detectar el antígeno viral en plaquetas y granulocitos mediante pruebas de anticuerpo fluorescente directo, que detectan antígeno intracelular. Después de que se infectan las células de la médula ósea (después de 3 semanas de viremia), los gatos no pueden eliminar por completo el virus del cuerpo, ni siquiera si ponen fin a la viremia, porque el DNA proviral está presente en las células madre de la médula ósea, anteriormente se conocía como infección latente pero ahora es considerado una etapa de la infección regresiva. A pesar de que permanece el DNA proviral no se produce ningún virus en forma activa, y los gatos arrojan resultados negativos a las pruebas de rutina que detectan antígeno de LeVF. Sólo puede diagnosticarse mediante el cultivo de muestras de médula ósea o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Greene and Sykes, 2013).

La infección regresiva puede reactivarse en forma espontánea o como respuesta a supresión inmunológica, y los gatos pueden volverse virémicos y mostrar nuevamente resultados positivos en pruebas de antígeno. Si la respuesta inmunitaria del gato no es lo suficientemente fuerte y la viremia persiste más de 16 semanas, existen probabilidades muy altas de que el animal permanezca virémico e infeccioso para otros gatos durante el resto de su vida, denominado infección progresiva (Greene and Sykes, 2013).

Replicación viral

Los componentes básicos del ciclo de replicación son adsorción, período de eclipse o ventana (penetración, descapsidación, replicación de partes componentes, maduración) y liberación de partículas virales (Maclachlan and Dubovi, 2011).

La adsorción es la unión de la partícula viral a una célula hospedera, este proceso de unión puede implicar una serie de interacciones que definen el rango de hospederos del virus y su especificidad de tejido/órgano (tropismo). La especificidad define en gran medida el potencial patogénico del virus. Las partículas virales interactúan con las moléculas de superficie celular denominadas factores de unión, factores de entrada, receptores y correceptores. La serie de eventos en la superficie celular puede ser compleja, pero en general el contacto inicial de una partícula viral con la superficie celular puede implicar interacciones electrostáticas de corta distancia con moléculas cargadas como los proteoglicanos de heparán sulfato. La unión de una partícula viral a la célula hospedera es un proceso independiente de la temperatura, pero la penetración depende de la fluidez de los lípidos de membrana que tienen restricciones térmicas. Los receptores/factores de entrada que se han identificado incluyen receptores de unión a ligando (receptores de quimiocinas), moléculas de señalización (CD4), receptores de señalización/adhesión celular (ICAM-1), enzimas e integrinas (Maclachlan and Dubovi, 2011).

Replicación viral de la familia *Retroviridae*

El primer paso crítico en el ciclo de replicación del virus es la unión de la partícula viral a una célula hospedadora. Este proceso de unión puede implicar una serie de interacciones que definen el tropismo del virus. La especificidad de tejidos define en gran medida el potencial patogénico del virus y la naturaleza de la enfermedad que induce. Las partículas virales interactúan con las moléculas de superficie celular denominadas factores de unión, factores de entrada, receptores y correceptores (CANN, 2009). Las áreas especializadas de la membrana pueden seleccionarse a través del movimiento lateral del complejo virus-receptor (Maclachlan and Dubovi, 2011). Los receptores que utiliza el virus de la leucemia viral felina para fusionarse con la membrana celular son los siguientes. El subgrupo A utiliza el transportador feTHTR1 que comparte un 93 % de identidad con la secuencia de aminoácidos con la proteína de transporte de la tiamina humana (THTR1), por lo que es posible que también funcione como transportador de tiamina en las células felinas (Mendoza et al., 2006). En un estudio más reciente determinaron que la infección por LeVF-A puede alterar la absorción de tiamina (vitamina B1) con consecuencias patológicas al ser un nutriente esencial como cofactor de enzimas que los mamíferos no pueden sintetizar de novo y dependen completamente del recurso exógeno (Mendoza et al., 2013). El subgrupo B utiliza el transportador de fosfato dependiente de sodio SLC20A1 (Pit1) y SLC20A2 (Pit2) (Anderson et al., 2001). El subgrupo C utiliza el transportador FLVCR1 (Quigley et al., 2000), es un exportador de hemo en la superficie celular, esencial para la eritropoyesis y homeostasis sistémica del

hierro. La interrupción de la función de FLVCR1 bloquea el desarrollo de progenitores eritroides, probablemente debido a la toxicidad del hemo que en exceso provoca estrés oxidativo y lesiones en la membrana. Los gatos infectados suelen presentar anemia severa, aplasia de eritrocitos caracterizada por ausencia de reticulocitos y progenitores eritroides en médula ósea (Khan and Quigley, 2013). El subgrupo T utiliza el receptor de membrana múltiple FePit1, y un cofactor soluble FeLIX (Cheng et al., 2007).

Posteriormente los reordenamientos estructurales ocurren entre las proteínas de membrana SU: p15e y las proteínas transmembranales TM: gp70 durante el proceso de entrada, se cree que éstas últimas juegan una función más importante en la fusión de la membrana (Maclachlan and Dubovi, 2011).

La penetración a la célula afectada se da bajo condiciones de pH neutro en la membrana plasmática y ocurre en escaso tiempo después de la adsorción en donde el virión ingresa al citoplasma mediante endocitosis con ayuda del mecanismo mediado por clatrina. Una vez en el citoplasma se desplaza sobre las fibras de citoesqueleto hacia sitios de replicación específica. El genoma viral del RNA es transcrito de manera inversa por la transcriptasa reversa (RT) dentro de una partícula subviral. El producto es DNA viral lineal de doble cadena con extremos que se muestran yuxtapuestos en preparación para integración. La molécula de DNA lineal, aún asociada con una estructura de cápside modificada, debe transportarse al núcleo para su integración en el genoma de la célula hospedera. Para muchos retrovirus, este transporte e integración está vinculado a la división celular y el DNA viral no está disponible para integrarse en el DNA de la célula afectada hasta que la membrana nuclear se disocia. La integración del DNA

lineal en el genoma de la célula infectada está dirigida por enzimas virales llamadas integrasas (IN), que da como resultado la inserción específica del sitio de los extremos del DNA viral, que pueden tener lugar en prácticamente cualquier ubicación en el genoma del huésped. Es a partir del DNA integrado (provirus) que se sintetiza el nuevo RNA viral por la DNA polimerasa II. En este el RNA resultante tiene todas las propiedades de RNAm, como una 5' CAP y una cola terminal poli A 3'. Las moléculas de RNA viral se transportan al citoplasma como RNAm celular normal, donde se asocian con los ribosomas para la síntesis de proteínas virales o se incorporan a las estructuras de la nucleocápside. La proteína precursora de *Env* se procesa proteolíticamente durante su síntesis en el retículo endoplásmico y Golgi, y se transporta a la superficie celular como las proteínas de envoltura TM y SU (viriones tipo C). Una característica única de los retrovirus es la manera en que las proteínas precursoras *Gag* y *Gag-Pol-Pol* participan en el proceso de maduración. Para los retrovirus, la proteína *Gag* ingresa al proceso como precursora de la matriz, la cápside y proteínas de nucleocápside. Otra porción de *Gag* interactúa con el RNA del virión y puede ser responsable del empaquetamiento del RNA en el virión en desarrollo. A medida que el precursor de *Gag* se asocia con la superficie interna de la membrana plasmática, se establece un sitio de brote para la producción de partículas víricas inmaduras. La maduración de la mayoría de los retrovirus tiene lugar una vez que la partícula del virus se libera de la membrana plasmática (Figura 2) (Maclachlan and Dubovi, 2011).

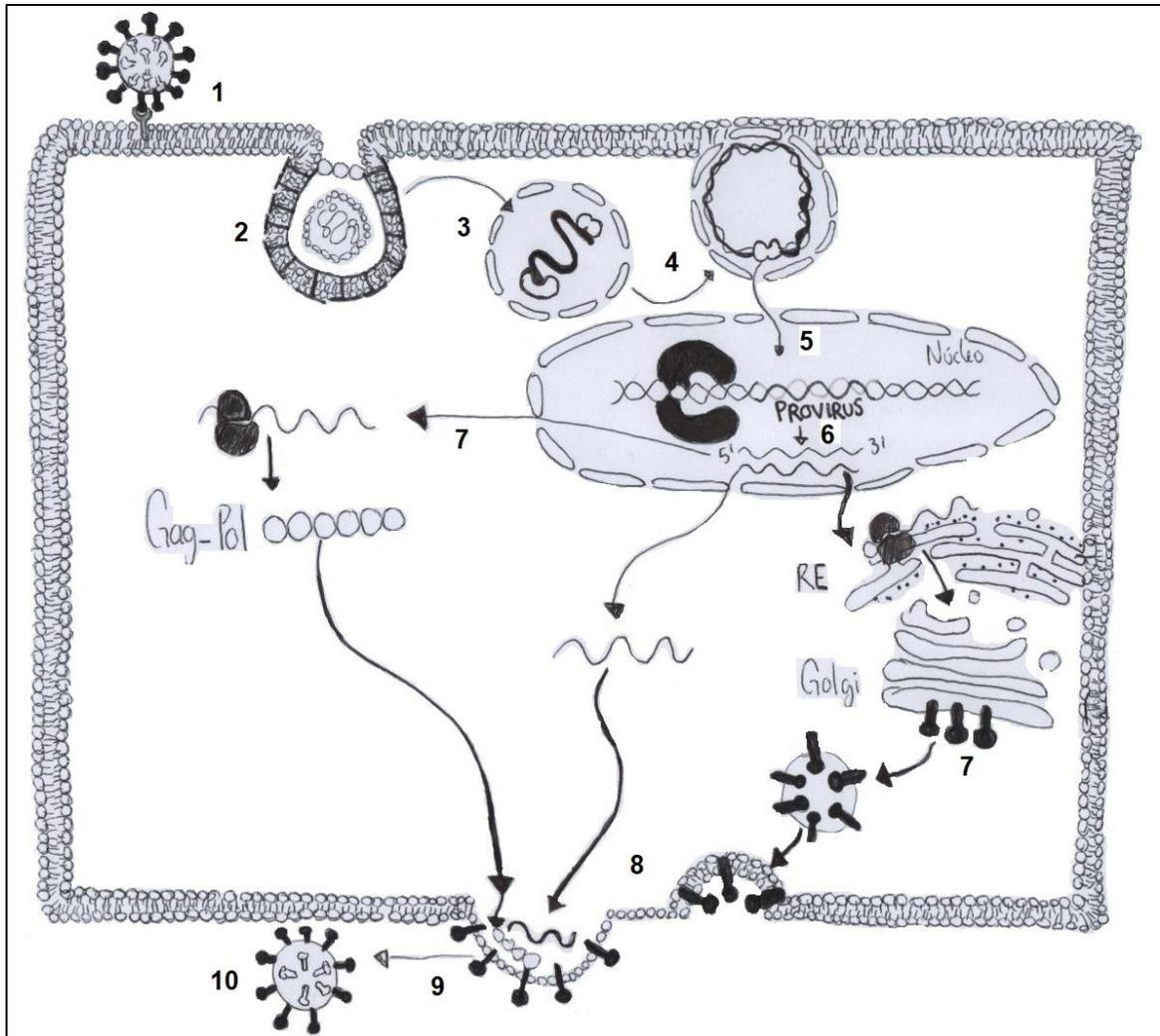


Figura 2. Replicación viral de leucemia viral felina (LeVF). 1) Adsorción, 2) Penetración, 3) Descapsidación, 4) Transcripción inversa del RNA, 5) Integración del provirus, 6) Replicación RNA viral, 7) Síntesis de proteínas virales, 8) Ensamblaje, 9) Liberación de partículas virales inmaduras y 10) Maduración de partículas virales. *Retículo endoplásmico (RE)*.

Métodos de diagnóstico molecular

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR permite que el material genético de una región seleccionada, se amplifique varias miles de millones de veces, por lo que “purifica” este DNA del resto del genoma. Se inicia con un par de oligonucleótidos, elegidos para

flanquear la secuencia de nucleótidos deseados del gen, los cuales son sintetizados por métodos químicos. Estos nucleótidos se usan para cebar la síntesis de DNA en cadenas individuales generadas al calentar el DNA de todo el genoma. El DNA recién sintetizado es producido en una reacción catalizada *in vitro* por una DNA polimerasa purificada, y los cebadores permanecen en los extremos de los fragmentos de DNA finales que se forman (Alberts et al., 2008).

En el primer ciclo de la síntesis de DNA no se produce nada en especial, cada ciclo duplica la cantidad de DNA sintetizado en el ciclo anterior. Debido a que cada ciclo requiere un tratamiento térmico para separar las dos cadenas de la doble hélice del DNA del templado, la técnica requiere el uso de una DNA polimerasa especial, aislada de una bacteria termófila, que es estable a temperaturas mucho más altas de lo normal, de esta manera no se desnaturaliza por los repetidos tratamientos térmicos. Con cada ronda de síntesis de DNA, los fragmentos recién generados sirven como moldes a su vez, y con un poco de ciclos el producto predominante es una especie única de fragmento de DNA cuya longitud corresponde a la distancia entre los dos cebadores originales (Alberts et al., 2008).

En la práctica, la amplificación de DNA efectiva requiere 20-30 ciclos de reacción, con los productos de cada ciclo que sirven como plantillas de DNA para la siguiente, de ahí el término de "reacción en cadena" de la polimerasa. Un solo ciclo requiere unos 5 minutos, y todo el proceso se puede automatizar fácilmente. La técnica de PCR es extremadamente sensible; puede detectar una sola molécula de DNA en una muestra (Alberts et al., 2008).

Los pasos que llevan a la amplificación del DNA pueden resumirse como desnaturalización, alineamiento y extensión. Cada uno consiste en diferentes

condiciones térmicas dadas por un termociclador. Cuando una molécula de DNA bicatenario (dsDNA) se calienta a 94-96°C, las cadenas emparejadas se separan (desnaturalizan). Esto permite que los primers o cebadores accedan a los templados o plantillas de DNA monocatenario (ssDNA). Posteriormente la temperatura de reacción desciende a 50-65°C para permitir que los primers seleccionen y se unan (hibridan) a sus posiciones complementarias en las moléculas de ssDNA (alineamiento). Y finalmente sube la temperatura nuevamente a 72°C en la cual actúa la polimerasa termoestable, en presencia de esta, las moléculas de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), magnesio y agua, comienza el proceso de replicación (extensión) (Viljoen et al., 2005).

PCR en tiempo real (qPCR)

La qPCR sirve para una cuantificación rápida, específica y sensible con muchas ventajas que mide los productos de la PCR a través de una sonda fluorogénica de doble marca, la intensidad de la fluorescencia está directamente relacionada con la cantidad del DNA y puede detectarse con un fluorómetro automático. La cuantificación se realiza mediante la comparación de señales de fluorescencia obtenida de las muestras desconocidas con las diluciones en serie de una muestra estándar conocida (Tandon et al., 2008b).

La qPCR es desarrollada a partir de la PCR punto final, la que previamente se describió, pero muestra mayor sensibilidad. En general, la qPCR se basa en la relación cuantitativa entre la cantidad de secuencia objetivo al inicio y la cantidad de producto de PCR amplificado en cualquier ciclo dado. Dicha correlación sigue una tasa exponencial que da lugar a una duplicación exacta del producto que se

acumula en cada ciclo, esta fase exponencial está limitada a un número corto de ciclos de PCR ya que la reacción ocurre en un sistema cerrado clásico donde hay agotamiento de las concentraciones de los reactivos, actividad enzimática y otros factores, mientras que los productos se acumulan con el tiempo. Esta PCR se caracteriza por cuatro fases de reacción conocidas como: línea de base, fase exponencial, fase lineal y meseta. La línea de base es un paso corto donde la amplificación no es detectable. Durante la fase exponencial la cinética de reacción determina una duplicación favorable de los amplicones. La fase lineal se caracteriza por una tendencia de desaceleración de amplificación y los productos ya no se duplican en cada ciclo. Finalmente, en la meseta, la reacción se termina esencialmente, no se acumulan más amplicones, incluso si se incrementa el número de ciclos y algunos productos pueden comenzar a degradarse. La PCR tradicional detecta los productos de la reacción en esta última fase, por esto se conoce como PCR punto final. Cada reacción puede alcanzar la meseta en un punto diferente, por lo que esta fase no puede ser utilizada para cuantificación. Al contrario, la PCR en tiempo real permite la detección inmediata de productos amplificados en cualquier ciclo, la detección en tiempo real debe realizarse durante la fase exponencial donde la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de DNA. Dos tipos esenciales de sustancias químicas aseguran tal generación de señal de fluorescencia. Uno se intercala en la doble cadena de DNA (SYBR-Green) y el otro puede usar diferentes sistemas de sonda marcados con colorante (Biassoni and Raso, 2014).

Usando cualquier método químico, el incremento de la emisión de la fluorescencia durante la PCR puede ser detectada en tiempo real por un termociclador

modificado. El software de una computadora construye los gráficos de amplificación usando los datos colectados durante la amplificación. El umbral de reacción ó *threshold* es un límite arbitrario elegido por la computadora, se calcula con diez veces la desviación estándar de la señal promedio de fluorescencia entre los ciclos tres a quince. Una señal fluorescente arriba de *threshold* es considerada como una señal real que es usada para definir el ciclo limite (Ct) de una muestra, punto en el que la fluorescencia es mayor que el nivel mínimo de detección (Figura 3) (Arya et al., 2005).

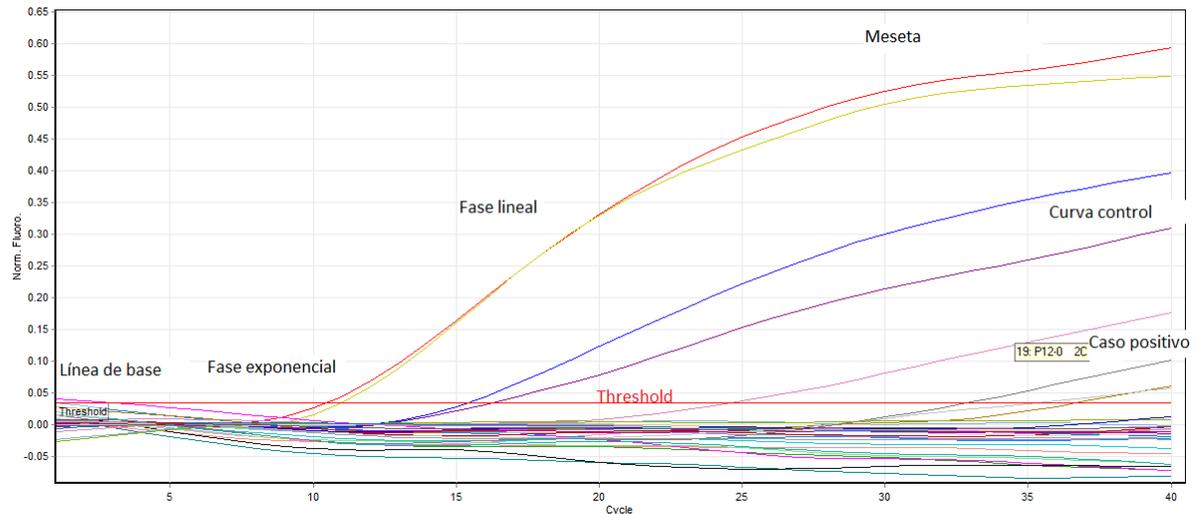


Figura 3. Resultado de qPCR emitidos por el programa Rotor-Gene Q analizada en señal de fluorescencia de SYBR Green, en el cual podemos observar las cuatro fases de la PCR en tiempo real de una de las corridas del presente estudio, los casos que se encuentren por arriba de la *Threshold* serán considerados positivos.

La PCR en tiempo real se usa para cuantificaciones absolutas y relativas de moléculas de DNA o RNA, determina cargas virales, expresión génica, también se ha utilizado para cuantificar amplificaciones de oncogenes o delección de genes supresores de tumores (Wilhelm and Pingoud, 2003).

Justificación

A pesar de que en México la vacuna contra LeVF lleva varios años en el mercado, en la actualidad no hay suficientes estudios epidemiológicos que confirmen una disminución en la incidencia de la infección viral, así como tampoco su posible implicación en los casos de linfoma felino. En el 2006, se llevó a cabo un estudio en el que mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) en tres laboratorios de diagnóstico para pequeños animales de la Ciudad de México, en el que se demostró una prevalencia de 30.1 % de LeVF, con una población total de 831 gatos (Kanafany Guzman et al., 2006). En el 2014 se realizó otro estudio en Mérida, Yucatán, una zona tropical de México, en el que se encontró una prevalencia de 2.5 % (5/227) utilizando ELISA (Ortega-Pacheco et al., 2014). Sin embargo, en ninguno de los estudios se evaluó la relación con el desarrollo de linfoma. En el 2007, se estudió la presencia del virus mediante inmunohistoquímica en casos de procesos linfoproliferativos remitidos al servicio de necropsias de la FMVZ-UNAM en el periodo de 2002 a 2005; se reportó un 71.4 % de inmunopositividad, con una mayor presencia del virus en los casos de linfoma multicéntrico; a pesar de haber trabajado con una población muy pequeña (21 casos totales) es el único estudio realizado en México del que se tenga conocimiento que evalúe la correlación de los casos de linfoma con la presencia del virus de LeVF (Fonseca Aguilar et al., 2007). En el 2014, se estandarizó en la FMVZ-FES-C-UNAM una técnica de PCR con la cual fue posible detectar la presencia de DNA proviral derivado de células mononucleares de sangre periférica de gatos con características heterogéneas, que en el momento del muestreo no

presentaron signos clínicos sugerentes de infección por LeVF; a través de ELISA indirecta se detectó un 82 % de las muestras positivas a LeVF, y mediante Western blot 89 % fueron positivas. Se realizó PCR para amplificar dos regiones genéticas (*pol* y *env*) de LeVF. De las 100 muestras de DNA evaluadas por PCR, en un 83 % se obtuvieron resultados positivos para al menos una de las dos PCR utilizadas, mostrando una sensibilidad del 92 % y una especificidad de 95 % (Autran Martínez and Martínez Rodríguez, 2014).

Para la identificación del LeVF un punto importante a retomar es la importancia de las secuencias LTRs en el genoma viral, en estas regiones se encuentran las secuencias URE, los cuales juegan un papel importante en la oncogénesis como reguladores positivos para ciertos genes, por ejemplo la activación del factor NFκB (Abujamra et al., 2006) y estudios previos han demostrado que los LeVF endógenos no poseen esta actividad de transactivación de las LTR (Ghosh et al., 2000). La detección de esta secuencia en los linfomas felinos nos indica indirectamente asociación del virus con la tumorigénesis.

Con el fin de entender la participación y potencial de malignidad del virus de la leucemia viral felina, se requieren estudios moleculares que determinen la posible implicación del virus en el desarrollo de desórdenes linfoproliferativos en gatos. Este estudio es importante debido a que podemos determinar la presencia del provirus en la población evaluada en este trabajo, que nos puede dar una idea de cómo el virus se comporta en la población de gatos en México, como antes se mencionó no existen estudios previos que asocien la presencia del virus o provirus en los linfomas felinos.

Hipótesis

Si el provirus de la leucemia viral felina estimula cambios genéticos en las células del tejido linfoide para inducir el desarrollo de linfomas, se encontrará una alta frecuencia de DNA proviral en la población evaluada, asociándose con la presentación anatómica y la edad.

Objetivos

Objetivo general:

Determinar la presencia de DNA proviral de LeVF en linfomas felinos mediante la técnica de qPCR y establecer la asociación del provirus con los casos de estudio.

Objetivos específicos

- Clasificar los casos de linfoma felino diagnosticados en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM en los últimos trece años.
- Observar la relación que tiene la edad de presentación, género, localización de linfomas felinos y presencia del provirus de leucemia viral felina.

Material y Métodos

Población muestra

El presente trabajo corresponde a tejido incluido en parafina de linfomas de gatos, pertenecientes al acervo del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). El estudio comprende de 2006 a 2018 con un total de 77 casos diagnosticados como linfomas, 37 linfomas de biopsias de gatos y 35 linfomas en necropsias. Los cuales fueron utilizados para su clasificación anatómica y estudio mediante PCR en tiempo real, para detectar el provirus de la leucemia viral felina.

Edad de presentación

De acuerdo con las pautas de la etapa de vida felina de American Association of Feline Practitioners- American Animal Hospital Association (AAFP-AAHA), las cuales son designaciones de edad que ayudan a centrar la atención en los cambios físicos y de comportamiento que ocurren en las diferentes etapas de vida, se consideraron las etapas Cachorro (kitten) de 0 a 6 meses de vida, Joven (junior) de 7 meses a 2 años, Adulto joven (prime) de 3 a 6 años, Adulto maduro (mature) de 7 a 10 años, Adulto mayor (senior) de 11 a 14 años y Geriátrico (geriatric) mayores de 15 años (Vogt et al., 2010).

Clasificación

Se evaluaron las laminillas de cada caso teñidas con hematoxilina-eosina para su análisis microscópico, con el fin de clasificar los linfomas. De acuerdo con su localización anatómica en mediastínicos o tímicos, alimentarios, multicéntricos, extranodales y nodales. Los mediastínicos se llaman así por involucrar estructuras en el mediastino, alimentarios aquellos que involucran el tracto gastrointestinal, multicéntricos fueron considerados aquellos tumores en los que más de dos órganos a parte de linfonodo fueron afectados, mientras que los felinos con presentación nodal afectando un solo linfonodo y extranodal aquellos que no involucran linfonodos (Cristo et al., 2019; Valli et al., 2000).

Técnica de PCR

Desparafinar

Los linfomas felinos incluidos en parafina se desparafinaron para extraer el DNA y poder usarlos como templado, se realizaron seis cortes de 5 μm en tubos

Eppendorf (Eppendorf®) de 1.5 mL. Para eliminar la parafina, se utilizaron 1200 µL de xilol y se mezcló el tubo en vórtex durante 10 segundos. Se centrifugó durante 5 minutos a 14 000 revoluciones por minuto (rpm), se desechó el sobrenadante. Se agregaron 1200 µL de etanol absoluto y mezcló en vórtex por 10 segundos, se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más. El pellet final se dejó secando en una incubadora a 37°C hasta que se encuentre totalmente seca durante aproximadamente dos horas.

Obtención de material genético

Cuando el pellet estaba seco se resuspendió lentamente en 200 µL de buffer ATL (DNeasy blood & tissue, Qiagen, Germany) para la lisis de los tejidos, previamente sumergido en baño de recirculación a 56°C para eliminar precipitados durante 1 minuto. Se agregaron 20 µL de proteinasa K (DNeasy blood & tissue, Qiagen, Germany) y 20 µL de proteinasa casera. Se mezcló en el vórtex y se introdujo en baño de recirculación a 56°C durante 20 horas.

Las muestras se mezclaron en el vórtex y se agregaron 200 µL de buffer AL (DNeasy blood & tissue, Qiagen, Germany) previamente sumergido en baño de recirculación a 56°C para eliminar precipitados durante 1 minuto, y se mezcló. Se agregaron 200 µL de etanol absoluto y se mezcló. Se transfirió todo el contenido del tubo Eppendorf a una columna de purificación y centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm, se desechó el filtrado y el tubo de colección, y se colocó la columna en un nuevo tubo de colección. Se agregaron 500 µL de buffer AW1 (DNeasy blood & tissue, Qiagen, Germany) y centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm se desechó el

filtrado y el tubo de colección, y se colocó la columna en un nuevo tubo de colección. Se agregaron 500 μL de AW2 (DNeasy blood & tissue, Qiagen, Germany) y centrifugó durante 2 minutos a 14 000 rpm, se desechó el filtrado y centrifugó 1 minuto extra a 14 000 rpm. Finalmente se transfirió la columna de filtración a un tubo Eppendorf previamente identificado de 1.5 μL , se agregaron 60 μL de agua grado biología molecular en el filtro de la columna, se centrifugó durante 1.5 minutos a 14 000 rpm.

Cuantificación de material genético

Se realizó electroforesis para determinar la integridad del material genético en gel de agarosa al 1 % teñido con Sybr [®]Safe DNA gel stain (ThermoFisher) en buffer de corrida TAE a 90 volts durante 50 minutos; se visualizó con un transiluminador UV (UVP UVsolo touch, Thomas Scientific). Posteriormente se cuantificó el material genético con un espectrofotómetro de microplaca (Epoch[®], BioTek) para determinar la absorbancia y pureza de la muestra.

PCR en tiempo real

Se utilizó la técnica de PCR en tiempo real en las muestras con diagnóstico de linfoma de tejido incluido en parafina; para determinar la presencia de DNA proviral se usó el kit para la detección del virus de la leucemia felina por PCR en tiempo real (FIND-IT Leucemia felina SuperMix, Biologías Moleculares[®], BioTecMol, México) para la identificación de la porción U3 de la LTR específicas de los virus adquiridos de forma exógena, debido a que no es endógena en los gatos domésticos y puede usarse para determinar la presencia, número y ubicación de los provirus adquiridos de forma horizontal (Casey et al., 1981;

Torres et al., 2005). Debido a las principales secuencias de genes diferentes entre los virus endógenos a los exógenos, está localizada en la región U3 de la LTR y en partes de *env* (Tandon et al., 2008a)

Condiciones de reacción

Se utilizaron 10 µL de muestra y 10 µL de FIND-IT Leucemia felina SuperMix que contiene oligonucleótidos y sondas TaqMan, DNA Taq polimerasa, amortiguador, dNTP's, MgCl₂, DNA del control interno y H₂O.

Condiciones térmicas de reacción

Se programaron las siguientes condiciones en el termociclador en tiempo real (Rotor-Gene, Qiagen, machine serial No. 0816332) 42°C por 30 segundos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 45 segundos, en los canales 495-520 nm (verde) y 535-556 nm (amarillo). Finalmente, los resultados fueron interpretados mediante Rotor-GeneQ Series Software 2.3.1.

Estadística

El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS, se realizó el análisis de asociación de las diferentes variables con la prueba de Chi cuadrada (χ^2). El nivel de significancia estadística utilizado fue de $P < 0.05$.

Resultados

Edad de presentación de linfoma

El rango de edad de la población estudiada varió de 4 meses a 20 años, con una media de edad de 7.43 años. La edad de presentación de los linfomas fue clasificada de acuerdo con las pautas de la etapa de vida felina de American Association of Feline Practitioners-American Animal Hospital Association (AAFP-

AAHA); adulto maduro 24.68 % (19/77), juvenil 23.38 % (18/77), adulto mayor 19.48 % (15/77), adulto joven 16.88 % (13/77), geriátrico 10.39 % (8/77), cachorro 3.90 % (3/77) y edad no referida 1.30 % (1/77) (Figura 4).

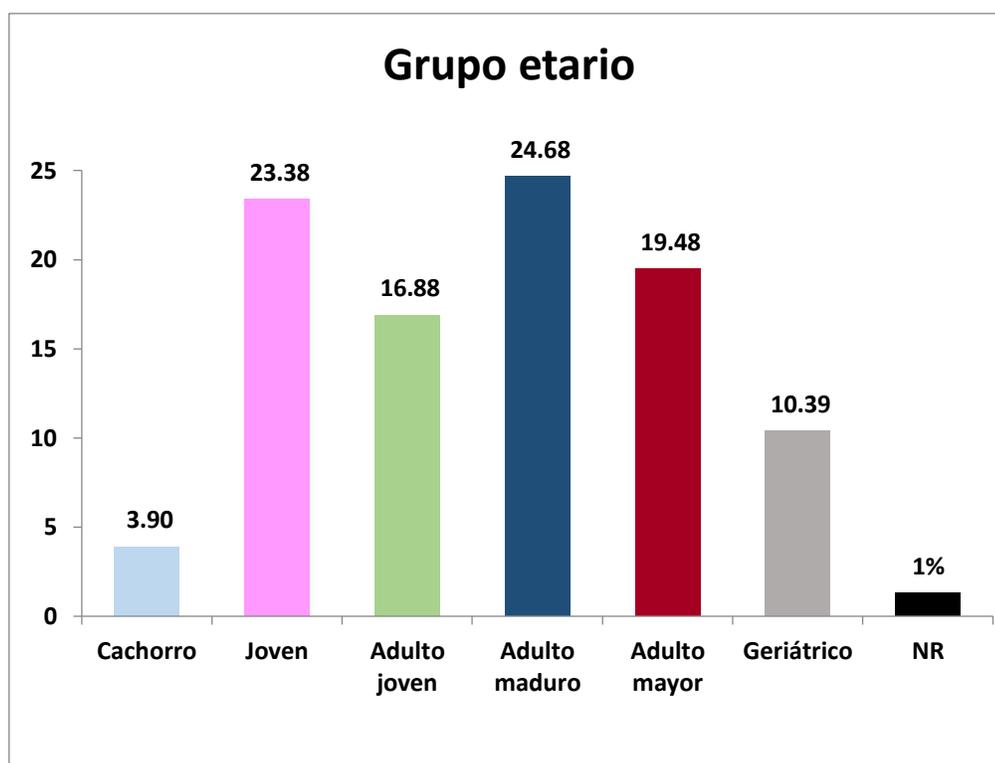


Figura 4. Resultados de la edad de presentación en felinos de linfoma en una población total de 77 muestras. Eje de las X muestra los grupos por rango de edad y en la parte superior el porcentaje de linfomas presentes en cada uno (NR edad no referida)

Clasificación por localización anatómica

De acuerdo con la localización, los alimentarios representaron el 40.26 % (31/77), multicéntricos 28.57 % (21/77), mediastínicos o tímicos 15.58 % (12/77), extranodales 12.99 % (10/77) y los que solo se localizaron en linfonodo (nodal) 2.60 % (2/77) (Figura 5).

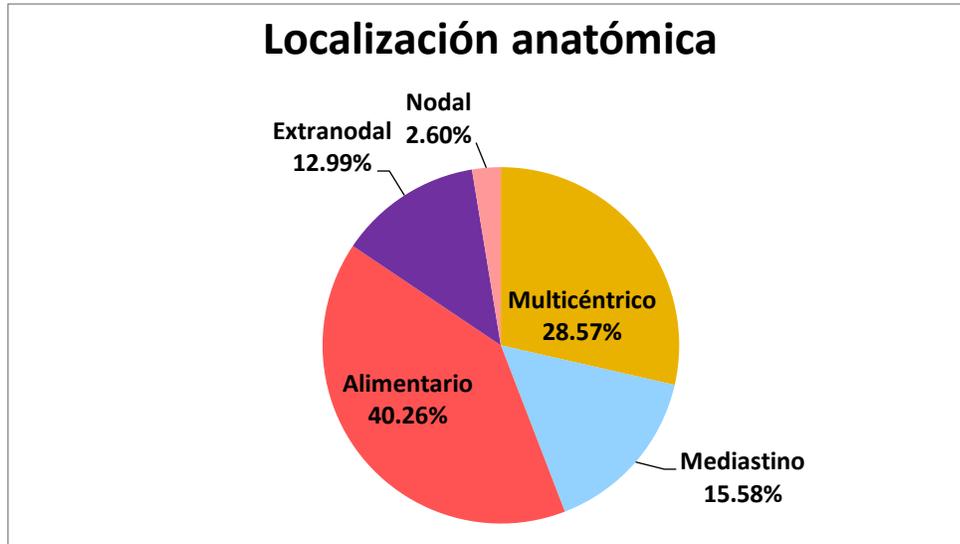


Figura 5. Localización anatómica de los linfomas felinos.

Detección del provirus de leucemia viral felina mediante PCR en tiempo real

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) de los 77 casos de linfomas felinos, 16 fueron positivos al provirus de la leucemia viral felina, lo que corresponde a 20.77 % del total de los casos diagnosticados como linfoma, la distribución de los casos positivos fue mayor en el grupo de gatos jóvenes con un total de 11 casos positivos, 6 con localización mediastínica, 4 multicéntrica y 1 alimentaria (Figura 6).

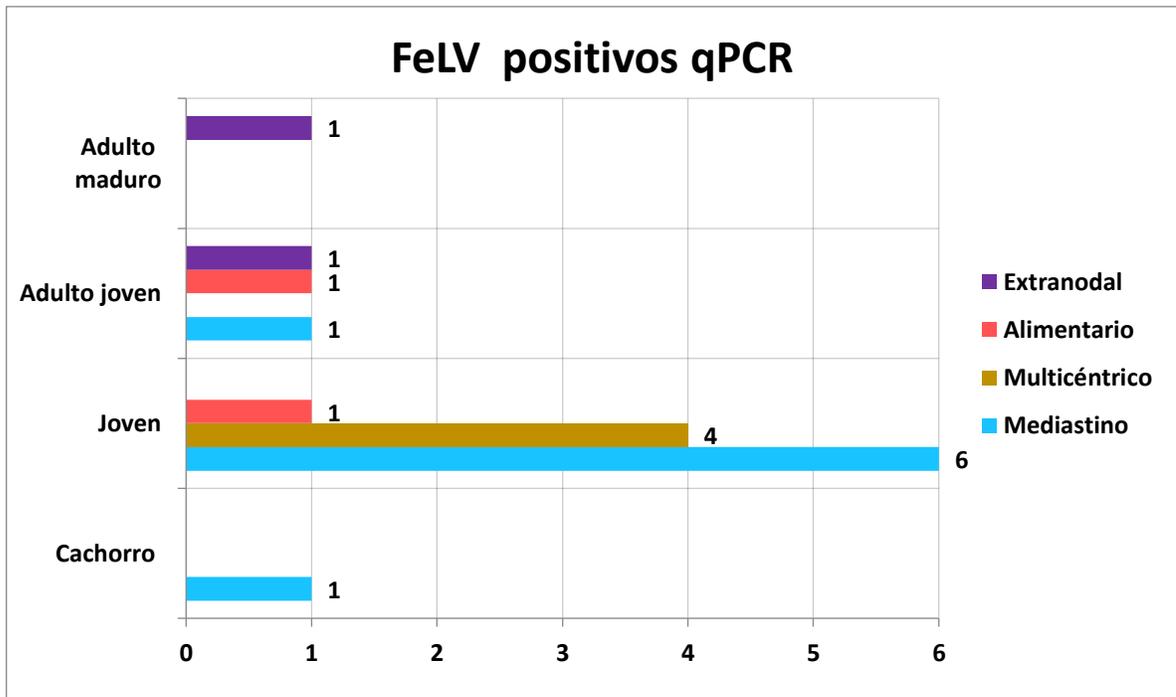


Figura 6. Casos positivos al provirus de leucemia viral felina mediante PCR en tiempo real en 77 muestras evaluadas. Agrupados por edad de presentación y localización anatómica.

Correlación de la localización y presencia del provirus de leucemia viral felina

Se utilizó una prueba de X^2 para comparar la asociación entre las variables de localización del linfoma y presencia de LeVF en donde se obtuvo un valor de $P=0.001$, confirmando que hay asociación estadísticamente significativa entre las variables, la presentación anatómica mediastínica está asociada con la presencia del provirus de leucemia viral felina, dentro de los casos positivos al provirus 50 % corresponden a esta localización y el 25 % a la localización multicéntrica, mientras que los linfomas con presentación alimentaria, el 47.5 % de todos los casos negativos al provirus correspondían a esta clasificación (Figura 7).

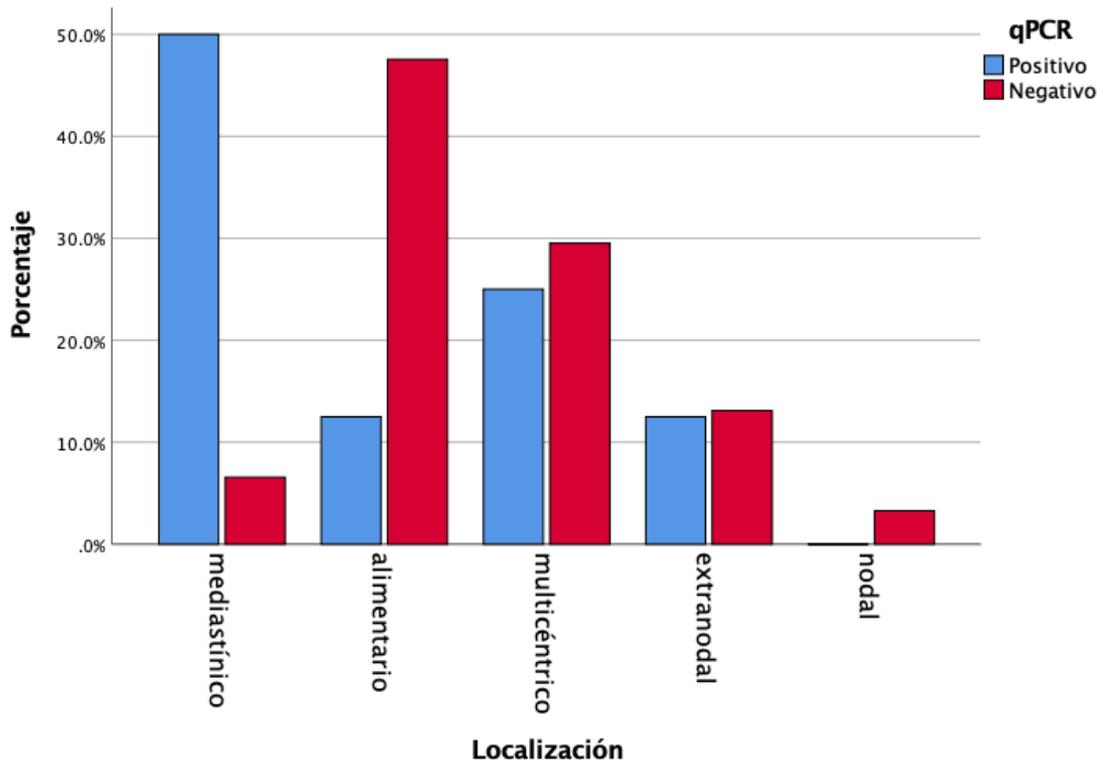


Figura 7. Localización anatómica de linfoma y presencia de provirus (P=0.001).

Correlación de edad de presentación y presencia de provirus

Se realizó una prueba de X^2 comparando la presencia del provirus de leucemia viral felina con la edad de presentación (grupo etario), con un valor de $P=0.000067$, lo cual nos indica que hay asociación estadísticamente significativa entre las proporciones observadas de los grupos etarios cachorro, joven y adulto joven que fueron positivos mediante qPCR para el provirus de LeVF, por ejemplo el grupo de gatos jóvenes con un total de 18 casos 11 fueron positivos, lo que representó un 68.8 % dentro de todos los casos positivos, y todos los casos de grupos etarios adulto mayor y geriátrico fueron negativos al provirus (Figura 8).

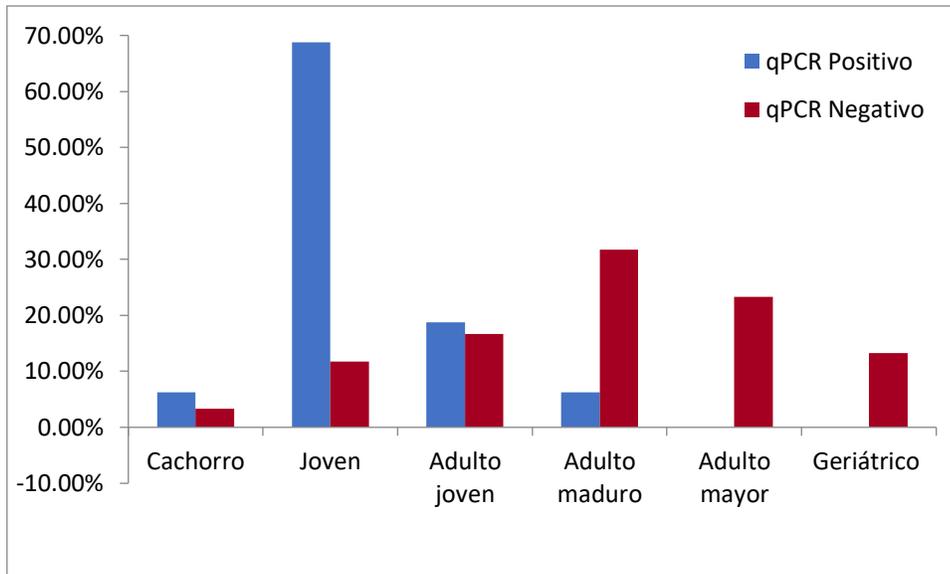


Figura 8. Relación de edad de presentación (grupo etario) de linfoma y presencia del provirus de leucemia viral felina ($P=0.000067$).

Correlación edad de presentación y localización de linfoma

Se realizó la prueba de X^2 para comparar las variables cualitativas localización del linfoma y edad de presentación. Con un valor de $P=0.003$ podemos decir que hay asociación estadísticamente significativa entre estas, aunque la presentación alimentaria se encuentre en todos los grupos etarios, tiene mayor frecuencia en los gatos adultos mayores con un 30 % y adulto maduro con 43.3 % dentro de esta localización. Mientras que la presentación mediastínica se encuentra exclusivamente en grupos etarios más juveniles, con un 66.7 % en gatos jóvenes a comparación del resto los sitios de localización; mientras que la presentación multicéntrica se encuentra en todas las categorías, pero con mayor frecuencia en gatos juveniles con un 40.9 % (Figura 9). (Cuadro 3).

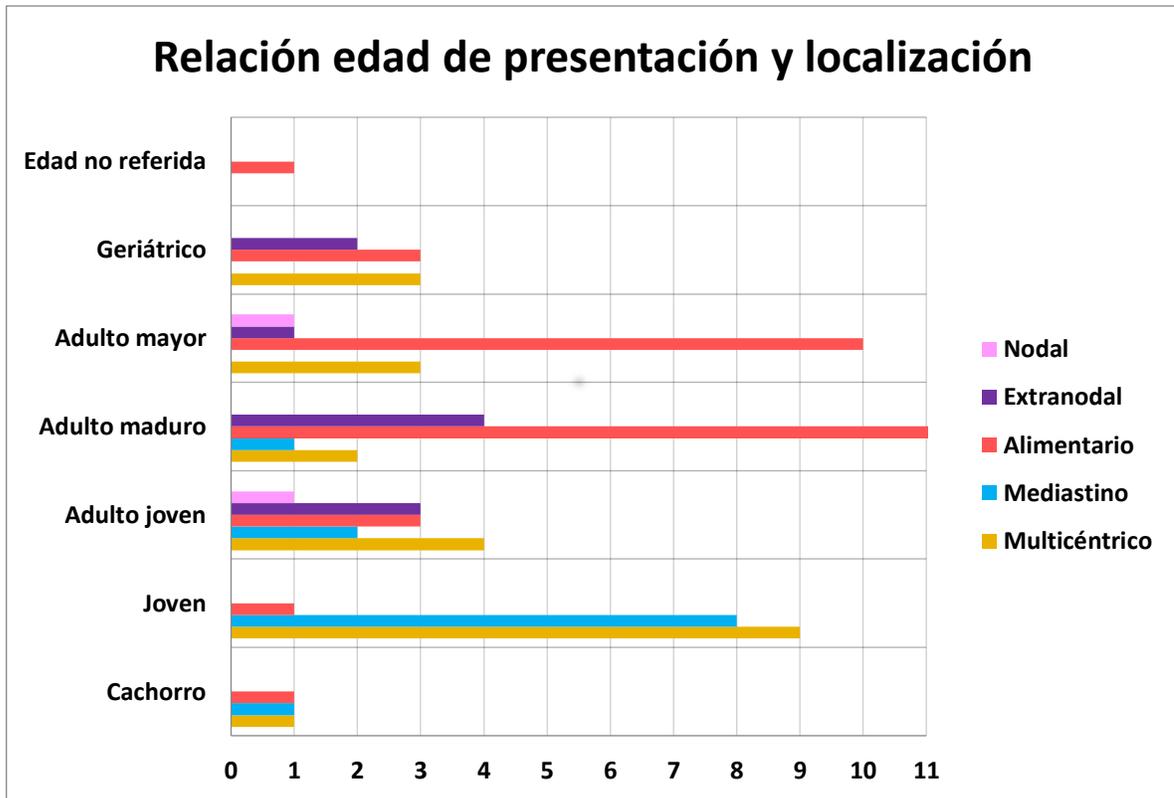


Figura 9. Relación entre el grupo etario (edad de presentación) y localización anatómica de linfoma (P=0.003).

Grupo etario / Localización	Cachorro	Joven	Adulto joven	Adulto maduro	Adulto mayor	Geriátrico
Mediastínico	8.3 %	66.7 %	16.7 %	8.3 %	0 %	0 %
Alimentario	3.3 %	3.3 %	10 %	43.3 %	30 %	10 %
Multicéntrico	4.5 %	40.9 %	18.2 %	9.1 %	13.6 %	13.6 %
Extranodal	0 %	0 %	30 %	40 %	10 %	20 %
Nodal	0 %	0 %	50 %	0 %	50 %	0 %

Cuadro 3. Tabla cruzada localización y grupo etario, frecuencia dentro de la localización.

Género y presencia de provirus

Se realizó prueba de X^2 para comprobar asociación entre la presencia de provirus de leucemia viral felina y el género, con las variables hembra, hembra castrada,

macho, macho castrado. El valor de P de 0.711 indica que no hay asociación estadísticamente significativa, pues todos los géneros tienen una proporción similar entre los casos negativos y positivos (Figura 10).

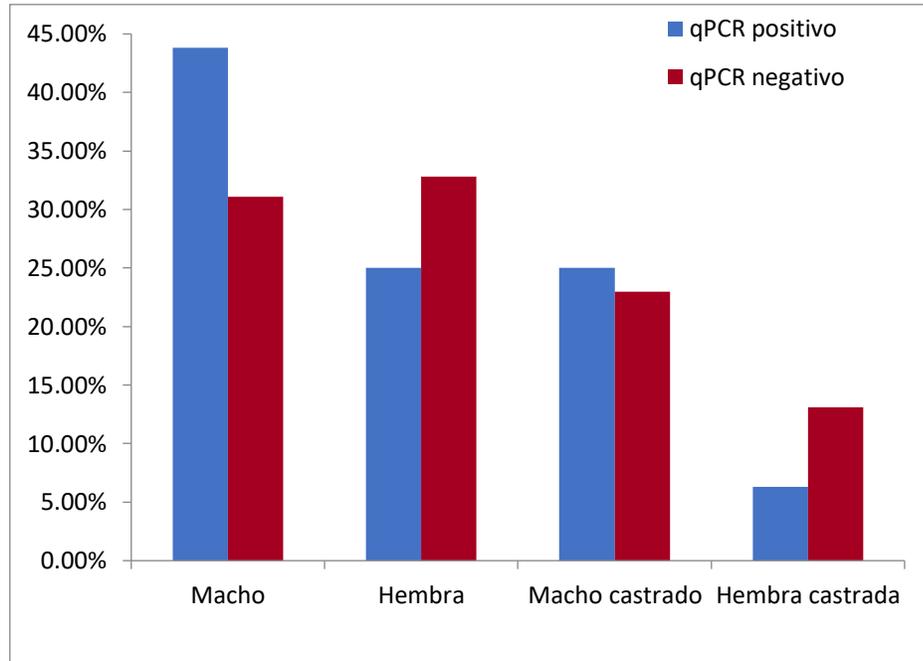


Figura 10. Relación entre el género y resultados de qPCR para el provirus de LeVF (P=0.711).

Discusión

El linfoma es la neoplasia en felinos más frecuentemente diagnosticada, a pesar de que los tumores hematopoyéticos representan una tercera parte de todos los tumores felinos, el 90% de estos son linfomas (Richter, 2003). En el presente estudio el objetivo fue asociar la presencia del provirus en dicha neoplasia, para lo cual se identificó el provirus de LeVF mediante la detección de la porción U3 en la región LTR, específica de los provirus adquiridos de forma horizontal (Casey et al., 1981; Torres et al., 2005). De acuerdo con nuestros resultados, hay evidencia que sustenta la hipótesis de que el provirus de LeVF está asociado con la presentación

anat6mica de los linfomas mediast6nicos y la edad de presentaci6n, lo cual sugiere que el provirus juega un rol importante para estimular cambios g6nicos en las c6lulas linfoides de gatos. En primer lugar, en este estudio el rango de edad de presentaci6n de linfoma fue de 4 meses a 20 a6os, con media de 7.43 a6os (mediana 7 a6os), similar a investigaciones previas, por ejemplo, Louwerens et al, realizaron un estudio retrospectivo de 21 a6os en California con un total de 546 casos, el rango de edad fue de 6 meses a 20 a6os con una mediana de 11 a6os (Louwerens et al., 2005); al igual que Vail et al, con un total de 145 casos reportan un rango de 1 a 20 a6os con una mediana de 9.5 a6os (Vail et al., 1998). Esto nos indica que cualquier edad es susceptible para el desarrollo de linfomas, sin embargo, en la localizaci6n mediast6nica la media de edad es significativamente diferente, siendo esta de 2.2 a6os, coincidiendo con Louwerens et al, quienes reportan una media de 2 a6os para la misma localizaci6n (Louwerens et al., 2005). En cuanto a la localizaci6n anat6mica del linfoma, seg6n Richter el tracto gastrointestinal es considerado el sitio m6s com6n, con frecuencias que van de 32 % a 72 % de los casos (Richter, 2003). En nuestra poblaci6n evaluada podemos confirmar esta tendencia debido a que la localizaci6n anat6mica alimentaria fue la m6s frecuente con un 40.26 %, seguida de la presentaci6n multic6ntrica con 27.27 %, mediast6nica con un 15.58 % y extranodal 12.99 %. Esta distribuci6n es similar a lo reportado por Vail et al, quienes indican que 34.7 % de casos eran alimentarios, 18.8 % multic6ntricos, 11.8 % mediast6nicos, 9.7 % nasal, 6.9 % renal, 5.6 % hep6tico y 13.1 % extranodal (otros) (Vail et al., 1998), al igual que en otro estudio llevado a cabo en la Universidad de Tokio entre los a6os 2000 y 2010, con un total de 163 casos de linfomas felinos, donde la distribuci6n fue:

alimentarios 85 (52 %), nasal 25 (15 %), mediastínico 19 (12 %), multicéntrico 14 (9 %) y extra nodales 20 (12 %) (Sato et al., 2014), en ambos estudios la localización alimentaria predomina de forma importante, como en nuestra población, según Moore et al, desde que la infección por LeVF ha disminuido en Estados Unidos, la incidencia de linfoma felino se ha incrementado principalmente en los linfomas gastrointestinales (Moore et al., 2012). A pesar de que la localización extranodal es la segunda más frecuente en los estudios citados, esta difiere de nuestros resultados, en los cuales la localización multicéntrica es la segunda más frecuente. Por otro lado, la localización mediastínica en todos los estudios es baja, cerca del 10% de la población, es posible que esto también se deba a la disminución de LeVF, lo cual nos introduce a nuestros objetivos principales, determinar si existe asociación entre la edad de presentación de linfoma, la presencia del provirus y localización del tumor.

Con respecto a la edad y presencia del provirus, hubo asociación estadísticamente significativa entre el grupo etario joven (7 meses a 2 años) con el provirus de LeVF, similar a lo reportado por Vail et al, quienes encontraron una edad mucho menor en los casos de linfoma asociados a LeVF (media de 5 años), a comparación de los casos que no presentaron antigenemia (11 años), en un total de 110 casos evaluados. La presencia de LeVF en el total de la población fue similar en ambos estudios, siendo del 20.7 % de presencia del provirus en nuestra población y según Vail et al, 25.5 % de gatos con antigenemia, quienes concluyen que el linfoma afecta a gatos adultos negativos a LeVF con presentación alimentaria (Vail et al., 1998).

En la población felina evaluada se detectó el provirus en linfomas del grupo etario joven en 11 de 16 (68.8 %); coincidiendo con Cristo et al, pues su población también presenta mayor positividad a LeVF en gatos de 2 a 4 años (Cristo et al., 2019). Igualmente Stützer et al, detectaron 43 % del antígeno p27 en gatos menores a 2 años y de 75 % en gatos menores a 4 años (Stützer et al., 2011). Por otro lado, en el grupo adulto mayor y geriátrico del presente estudio no se detectó el provirus, en cambio, Stützer et al, detectaron el antígeno viral en 6.3 % de los gatos mayores a 10 años, sin embargo, su presencia sigue siendo baja para gatos adultos mayores y geriátricos. En cuanto al provirus, en este mismo estudio realizaron PCR para 11 muestras de gatos positivos mediante ELISA, de los cuales en 9 fueron positivos al provirus a través de la detección de la región LTR, sin embargo, a diferencia de nuestro estudio no asociaron el provirus al desarrollo de linfomas (Stützer et al., 2011).

Finalmente, la localización y presencia de provirus de LeVF también están asociadas; dentro de los casos positivos del presente trabajo, 8 de 16 casos (50 %) corresponden a la localización mediastínica y 4 de 16 casos (25 %) a la localización multicéntrica, al igual que Weiss et al, quienes encontraron porcentajes altos del provirus de LeVF mediante PCR en todos los casos mediastínicos y multicéntricos (Weiss et al., 2010). Esta tendencia también se ha observado mediante la detección de antígenos virales, de acuerdo con Vail et al, la media de edad no ha cambiado dentro de los diversos grupos anatómicos, pues, las localizaciones tradicionalmente asociadas a LeVF, tales como mediastínica, siguen ocurriendo en gatos más jóvenes y de forma similar con la presentación alimentaria en animales adultos negativos a LeVF (Vail et al., 1998). Además

Stützer et al, identificaron que la localización de los tumores difiere significativamente entre los grupos LeVF positivos y negativos, reportando 80% de los gatos con linfoma tímico positivos a LeVF; de ahí que lo han asociado a que la infección por LeVF frecuentemente ocurre en etapas tempranas de la vida e inicia su replicación en timo durante las primeras etapas de la infección, y por consiguiente predispone a desarrollo del tumor en este órgano (Stützer et al., 2011).

Aunque 2/16 (12.5 %) de los casos positivos tenían presentación alimentaria, no podemos asegurar que el virus haya participado directamente en la oncogénesis de estos, pues ésta es una enfermedad multifactorial (Douglas and Robert, 2011).

Para los casos negativos a LeVF sería interesante investigar la presencia del virus de inmunodeficiencia viral felina FIV, que también ha sido asociado al desarrollo de linfomas (Greene and Sykes, 2013). A pesar de que el mecanismo por el cual induce neoplasias no se ha determinado por completo (Magden et al., 2011), la asociación entre FIV y linfoma se ha replicado en infección natural así como experimental en tumores extranodales de células B (Beatty, 2014).

Finalmente es recomendable complementar los casos e incentivar a los propietarios a llegar a un diagnóstico final para poder contar con más datos sobre la situación en cuanto a la evolución de los pacientes, y en medida de lo posible, realizar estudio *postmortem*. Se ha determinado en algunos estudios que los gatos que no recibieron vacuna contra LeVF fueron aproximadamente dos veces más susceptibles que los vacunados (Vail et al., 1998), pero en nuestra población no se logró evaluar la eficacia de la vacunación debido a que sólo en tres casos se contaba con esta información, uno de ellos, vacunado, fue positivo al provirus de

LeVF mediante qPCR, y los otros dos casos, un gato vacunado y otro no vacunado, fueron negativos.

Otras pruebas para establecer asociación entre la presencia del virus en los linfomas felinos, sería la identificación del antígeno mediante la detección de proteínas virales por inmunohistoquímica, como la proteína de envoltura gp70, sin embargo, esta prueba puede tener la limitante de existir alteración en los antígenos por la fijación con formalina y disminuir la sensibilidad de detección mediante IHQ (Herring et al., 2001). Otra prueba reportada en la actualidad es la hibridación in situ, esta técnica ha sido utilizada para detectar la replicación activa de LeVF mediante la identificación de RNA mensajero en tejidos incluidos en parafina; en un reporte se detectó RNA mensajero en un gato con diagnóstico de linfoma difuso de células B grandes localizado en los segmentos T7-8 de médula espinal previamente diagnosticado por ELISA positivo a LeVF (Szilasi et al., 2020), debido a que no tenemos datos para evaluar la vacunación, con esto podríamos observar la presencia del antígeno en la población de estudio y la asociación entre el desarrollo del linfoma. En algunos estudios ya se ha evaluado, por ejemplo, Weiss et al, realizaron un estudio retrospectivo de 50 tumores donde se detectó mediante PCR el provirus y mediante inmunohistoquímica la proteína gp70, encontrando al antígeno en 8/50 casos, donde los 8 casos también fueron positivos al provirus. Sus resultados apoyan la teoría de que la integración del provirus a la célula hospedera pueden ser suficientes para inducir la formación de linfomas (Weiss et al., 2010).

Conclusión

De acuerdo con los resultados de este estudio podemos concluir que la presencia del provirus de la leucemia viral felina es poco frecuente en la población evaluada 16/77 casos totales (20.77%), pero esta incrementa en gatos jóvenes, de grupos etarios joven y adulto joven (entre 7 meses a 6 años de edad), y ciertas localizaciones como mediastínicas y multicéntricas, por lo que se debe considerar como un agente importante para la oncogénesis, sin embargo, es importante recordar que la oncogénesis depende de múltiples factores; indirectamente podemos sugerir que el provirus de LeVF estimula cambios genéticos en las células de tejido linfoide para el desarrollo de linfomas en las localizaciones señaladas y edad de presentación. Aunque el provirus también se puede encontrar en otras localizaciones y grupos etarios, este se presenta con menor frecuencia.

El linfoma es una neoplasia común que afecta a todos los grupos etarios con una media de 7.43 años, sin embargo, la localización anatómica más frecuente en nuestra población es alimentaria afectando principalmente a grupos de gatos adultos maduros y adultos mayores, y aparentemente no hay asociación de esta presentación de linfoma con el provirus de LeVF. Tampoco se encontró asociación entre el género de los gatos evaluados con presencia del provirus de LeVF o la localización anatómica de los tumores.

Referencias

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2015. Inmunología celular y molecular, 8th ed. Elsevier/Saunders, Barcelona.
2. Abujamra, A.L., Spanjaard, R.A., Akinsheye, I., Zhao, X., Faller, D.V., Ghosh, S.K., 2006. Leukemia virus long terminal repeat activates NF κ B pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology* 345, 390–403. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.10.003>
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Roberts, K., Raff, M., Walter, P., 2008. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science, New York.
4. Anderson, M.M., Luring, A.S., Robertson, S., Dirks, C., Overbaugh, J., 2001. Feline Pit2 Functions as a Receptor for Subgroup B Feline Leukemia Viruses. *J. Virol.* 75, 10563–10572. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10563-10572.2001>
5. Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R., 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5, 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
6. Autran Martínez, M., Martínez Rodríguez, H.A., 2014. Uso de la técnica de PCR para confirmar el diagnóstico de leucemia viral felina y el análisis filogenético de sus productos amplificados.
7. Bacha, W.J., Bacha, L.M., 2015. *Color atlas of veterinary histology*, 3rd ed. Wiley Blackwell, Philadelphia.

8. Beatty, J., 2014. Viral causes of feline lymphoma: retroviruses and beyond. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 201, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.026>
9. Biassoni, R., Raso, A. (Eds.), 2014. Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0733-5>
10. CANN, A.J., 2009. *Principios de virología molecular*. Editorial Acribia, España.
11. Casey, J.W., Roach, A., Mullins, J.I., Burck, K.B., Nicolson, M.O., Gardner, M.B., Davidson, N., 1981. The U3 portion of feline leukemia virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemic cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7778–7782. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7778>
12. Cheng, H.H., Anderson, M.M., Overbaugh, J., 2007. Feline leukemia virus T entry is dependent on both expression levels and specific interactions between cofactor and receptor. *Virology* 359, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.09.004>
13. Cristo, T.G., Biezus, G., Noronha, L.F., Pereira, L.H.H.S., Withoef, J.A., Furlan, L.V., Costa, L.S., Traverso, S.D., Casagrande, R.A., 2019. Feline Lymphoma and a High Correlation with Feline Leukaemia Virus Infection in Brazil. *J. Comp. Pathol.* 166, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.10.171>
14. Douglas, H., Robert, A.W., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, P646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

15. Fonseca Aguilar, W.F., Cedillo Pelaez, C., Salas Garrido, C.G., 2007. Diagnóstico inmunohistoquímico de leucemia viral felina en tejidos de gatos con enfermedad linfoproliferativa.
16. Geneser, F., Mikkelsen, K., 2000. Histología: sobre bases biomoleculares, 3rd ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires (Argentina).
17. Greene, C.E., Sykes, J., 2013. Infectious Diseases of the Dog and Cat, Fourth. ed. Elsevier Health Sciences, St. Louis.
18. Herring, I.P., Troy, G.C., Toth, T.E., Champagne, E.S., Pickett, J.P., Haines, D.M., 2001. Feline leukemia virus detection in corneal tissues of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Vet. Ophthalmol.* 4, 119–126. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.2001.00187.x>
19. ICVGAN, 2017. Nomina anatómica veterinaria, Sixth. ed. World Association of Veterinary Anatomists, International Committees on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, Germany.
20. ICVHN, 2017. Nomina histológica veterinaria. World Association of Veterinary Anatomists, International Committees on Veterinary Histological Nomenclature, Germany.
21. Kanafany Guzman, R., Lima Melo, A., Ramirez Diaz, M. de G., 2006. Frecuencia del virus de leucemia viral felina en tres laboratorios de la Ciudad de Mexico del año 2002 al 2005.
22. Khan, A.A., Quigley, J.G., 2013. Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49. *Mol. Aspects Med.* 34, 669–682. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.013>

23. Louwerens, M., London, C.A., Pedersen, N.C., Lyons, L.A., 2005. Feline Lymphoma in the Post—Feline Leukemia Virus Era. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 329–335. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02703.x>
24. Maclachlan, N.J., Dubovi, E.J., 2011. *Fenner's Veterinary Virology*, 4th ed. Academic Press, London.
25. Magden, E., Quackenbush, S.L., VandeWoude, S., 2011. FIV associated neoplasms--a mini-review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.016>
26. Maxie, G.M., 2016. *JUBB, KENNEDY, AND PALMER'S PATHOLOGY OF DOMESTIC ANIMALS, SIXTH EDITION*, sixth. ed. Elsevier, Missouri.
27. Mendoza, R., Anderson, M.M., Overbaug, J., 2006. A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *J. Virol.* 80, 3378–3385. [https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3378–3385.2006](https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3378-3385.2006)
28. Mendoza, R., Miller, A.D., Overbaugh, J., 2013. Disruption of Thiamine Uptake and Growth of Cells by Feline Leukemia Virus Subgroup A. *J. Virol.* 87, 2412–2419. <https://doi.org/10.1128/JVI.03203-12>
29. Meuten, D.J. (Ed.), 2017. *Tumors in domestic animals*, Fifth edition. ed. Wiley/Blackwell, Ames, Iowa.
30. Moore, P.F., Rodriguez-Bertos, A., Kass, P.H., 2012. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Vet. Pathol.* 49, 658–668. <https://doi.org/10.1177/0300985811404712>
31. Ortega-Pacheco, A., Aguilar-Caballero, A.J., Colin-Flores, R.F., Acosta-Viana, K.Y., Guzman-Marin, E., Jimenez-Coello, M., 2014. Seroprevalence

- of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico. *J. Feline Med. Surg.* 16, 460–464. <https://doi.org/10.1177/1098612X13509995>
32. Quigley, J.G., Burns, C.C., Anderson, M.M., Lynch, E.D., Sabo, K.M., Overbaugh, J., Abkowitz, J.L., 2000. Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood* 95, 1093–1099. https://doi.org/10.1182/blood.V95.3.1093.003k01_1093_1099
33. Richter, K.P., 2003. Feline gastrointestinal lymphoma. *Vet. Clin. Small Anim. Pract.* 33, 1083–1098. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00054-8](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00054-8)
34. Sato, H., Fujino, Y., Chino, J., Takahashi, M., FUKUSHIMA, K., GOTO-KOSHINO, Y., UCHIDA, K., OHNO, K., TSUJIMOTO, H., 2014. Prognostic Analyses on Anatomical and Morphological Classification of Feline Lymphoma. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 807–811. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0260>
35. Stützer, B., Simon, K., Lutz, H., Majzoub, M., Hermanns, W., Hirschberger, J., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., 2011. Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. *J. Feline Med. Surg.* 13, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.09.015>
36. Sykes, J.E., Hartmann, K., 2014. Feline Leukemia Virus Infection. *Canine Feline Infect. Dis.* 224–238. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00022-3>
37. Szilasi, A., Dénes, L., Jakab, C., Erdélyi, I., Resende, T., Vannucci, F., Csomor, J., Mándoki, M., Balka, G., 2020. In situ hybridization of feline

- leukemia virus in a primary neural B-cell lymphoma. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32, 454–457. <https://doi.org/10.1177/1040638720915449>
38. Tandon, R., Cattori, Pepin, A., Riond, B., Meli, M., McDonald, M., Doherr, M., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2008a. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Res.* 135, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.02.016>
39. Tandon, R., Cattori, V., Willi, B., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2008b. Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123, 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.027>
40. Torres, A.N., Mathiason, C.K., Hoover, E.A., 2005. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology* 332, 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.050>
41. Trigo, F.J.T., Elizondo, G.V., Garrido, G.S., Racine, I.M., Mayagoita, A.L., Romero, L.R., Chavarría, L.C.M., Cantón, B.V., 2014. *Patología general veterinaria*, 5th ed. UNAM, Secretaría de Desarrollo Institucional, México.
42. Trigo, F.J.T., Romero, L.R., Candanosa, E.I.A., García, L.E.O., Juárez, M.R., Martínez, I.R., Méndez, A.B., Morales, E.S., Salas, G.G., Cantón, B.V., Yáñez, E.I.M., Ramírez, J.L., Romero, S.S., 2015. *Patología sistémica*, 6th ed. UNAM, Secretaría de Desarrollo Institucional, México.
43. Vail, D.M., Moore, A.S., Ogilvie, G.K., Volk, L.M., 1998. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J. Vet.*

- Intern. Med. 12, 349–354. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1998.tb02134.x>
44. Valli, V.E., Jacobs, R.M., Norris, A., Couto, C.G., Morrison, W.B., McCaw, D., Cotter, S., Ogilvie, G., Moore, A., 2000. The Histologic Classification of 602 Cases of Feline Lymphoproliferative Disease using the National Cancer Institute Working Formulation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 295–306. <https://doi.org/10.1177/104063870001200401>
45. Viljoen, G.J., Nel, L.H., Crowther, J.R. (Eds.), 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3404-0>
46. Vogt, A., Rodan Ganetzky, I., Brown, M., Brown, S., Buffington, C., Forman, M., Neilson, J., Sparkes, A., 2010. AAFP-AAHA: feline life stage guidelines. *J. Feline Med. Surg.* 12, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.12.006>
47. Weiss, A.T.A., Klopfleisch, R., Gruber, A.D., 2010. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *J. Feline Med. Surg.* 12, 929–935. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.07.006>
48. Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003. Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 4, 1120–1128. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300662>
49. Wolfesberger, B., Skor, O., Hammer, S.E., Flickinger, I., Kleiter, M., Rütgen, B.C., Schwendenwein, I., Tichy, A., Hittmair, K.M., Degasperi, B., Fuchs-Baumgartinger, A., 2017. Does categorisation of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats? *J. Feline Med. Surg.* 19, 897–906. <https://doi.org/10.1177/1098612X16666119>

50. Zachary, J., 2016. Pathologic Basis of Veterinary Disease, 6th ed. Mosby, St. Louis.