



## **Universidad Nacional Autónoma de México**

**Programa de maestría y doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal**

**“Caracterización de subpoblaciones de linfocitos en perros con Linfoma”**

**Tesis para optar por el grado de maestra en ciencias de la producción y de la salud animal**

**Presenta:**

**MVZ Jacqueline Vinagre Ruiz**

**Tutora principal: Dra. Laura Cobos Marín (Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)**

**Comité tutor:**

**Dr. Octavio Rodríguez Cortés (Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional)**

**M en C Guadalupe Ramírez Díaz (Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)**

**Ciudad universitaria, Ciudad de México, junio 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo gracias al financiamiento del programa de apoyo a proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) en el proyecto “Efecto Antineoplásico de Gk-1 Y Transferon® en el tratamiento de Carcinoma Mamario y Linfoma Multicéntrico en Perros” con clave IN230320 y a la colaboración de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en conjunto con el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

## **Dedicatoria**

**A mi mamá:** porque siempre has estado aquí a pesar de todo, este es un logro que tengo que compartir contigo. Gracias, Nani.

**A mi papá:** me duele no poder compartir esta alegría contigo, no sé si de alguna manera pueda transmitirme lo que siento, no sé si hay algo más allá y a veces me cuesta creerlo, pero independientemente de eso te dedico esta gran victoria, esperando que te llene de alegría donde quiera que estés.

**A las doctoras Laura Cobos e Isabel Muñoz:** porque fueron mis guías en este camino, siempre teniendo paciencia y siendo comprensivas ante mi condición de neurodivergencia, aquí está el fruto de nuestro esfuerzo, gracias.

**A mis amigos:** Daniel, Melissa, Héctor, Himmler, Tuti, Carmelita, Alejandra, Aarón, a l@s chic@s de ExpoToys, etc. (no quiero olvidar mencionar a nadie, ustedes saben bien quienes son), porque a pesar de trabajar en ámbitos diferentes y en algunos casos la distancia nos separa, ustedes han sido como una red bajo la cuerda floja, quienes me han escuchado y me han ayudado a salir adelante en diferentes momentos, incluyendo este camino. Por ello, comparto esta alegría con ustedes. ¡Gracias!

**A mí:** jamás vuelvas a permitir que una persona de ideas cortas que desconoce tu capacidad te diga lo que puedes o no puedes hacer.

## **Agradecimientos**

Agradezco a las doctoras Isabel Muñoz y Laura Cobos por haber confiado en mí y brindarme la oportunidad de trabajar en el presente proyecto.

Gracias al equipo del laboratorio nacional de citometría de flujo del instituto de ciencias biomédicas: a la Dra. Gloria Soldevila por permitirnos trabajar en el LabNaCit; a la Dra. Roxana Olguín por su asesoría referente a la citometría de flujo; pero principalmente al próximo MVZ, Efraín López por acompañarme en el proceso experimental, la paciencia y la dedicación.

Agradezco al Dr. Octavio Rodríguez por haber formado parte de mi comité tutor y siempre estar ahí apoyándome en la resolución de dudas, con las asesorías y el seguimiento con todo lo relacionado con citometría de flujo y células NK.

Agradezco a la M en C Guadalupe Ramírez, por haber formado parte de mi comité tutor, además de ayudarme a conocer e incorporarme en este maravilloso equipo de trabajo.

Gracias al equipo del área de virología del departamento de microbiología de la FMVZ-UNAM: por su apoyo para mejorar cada vez más mi trabajo, por ayudarme a resolver dudas y por sus valiosas aportaciones en los seminarios.

Gracias al programa de apoyo a proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) en el proyecto “Efecto Antineoplásico de Gk-1 Y Transferon® en el tratamiento de Carcinoma Mamario y Linfoma Multicéntrico en Perros” con clave IN230320 por brindarnos los recursos para la realización de este proyecto.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Cáncer</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Cáncer a nivel mundial</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Cáncer en la población mexicana</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Cáncer en perros</b>	<b>3</b>
<b>1.4.1 La importancia del perro como modelo para el cáncer del ser humano</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Linfoma no Hodgkin (LNH) en el ser humano</b>	<b>4</b>
<b>1.6 Linfoma canino</b>	<b>4</b>
<b>1.7 Clasificación, diagnóstico y estadificación de Linfoma canino y humano</b>	<b>5</b>
<b>1.8 Semiología</b>	<b>5</b>
<b>1.9 Tratamiento</b>	<b>7</b>
1.9.1 Alternativas terapéuticas	8
<b>1.10 Respuesta inmune y cáncer</b>	<b>8</b>
1.10.1 Fase de eliminación	9
1.10.2 Fase de equilibrio	9
1.10.3 Fase de escape	9
1.10.4 Respuesta inmune en Linfoma	10
<b>1.11 Biomarcadores en Linfoma Canino</b>	<b>11</b>
1.11.1 Citocinas	11
1.11.2 Células T Reguladoras	12
1.11.3 Células Natural Killer	12
1.11.4 Linfocitos T Citotóxicos (CD8+)	13
<b>2. Justificación</b>	<b>13</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>14</b>
<b>4. Objetivo general</b>	<b>14</b>
<b>5. Objetivos específicos</b>	<b>14</b>
<b>6. Material y métodos</b>	<b>14</b>
<b>6.1 Criterios de inclusión y exclusión para individuos de prueba</b>	<b>14</b>
<b>6.2 Grupo control para la estandarización del panel de anticuerpos</b>	<b>15</b>
6.2.1 Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica	15

6.2.2 Panel de anticuerpos	15
6.2.3 Titulación de anticuerpos	16
6.2.4 Inducción de células T reguladoras.	16
<b>6.3 Pacientes</b>	<b>17</b>
<b>6.4 Obtención de muestras sanguíneas</b>	<b>17</b>
<b>6.5 Procesamiento de muestras</b>	<b>17</b>
<b>6.6 Obtención y análisis de datos</b>	<b>18</b>
<b>6.7 Análisis estadístico</b>	<b>18</b>
<b>7. Resultados</b>	<b>19</b>
7.1 Titulación de anticuerpos	19
7.2 Estrategia de análisis	19
7.3 Distribución de subpoblaciones de linfocitos de interés en grupo control	20
7.4 Distribución de subpoblaciones de linfocitos de interés en perros con linfoma	21
7.5 Análisis estadístico	22
<b>8. Discusión</b>	<b>24</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>27</b>
<b>10. Prospectivas</b>	<b>27</b>
<b>11. Bibliografía</b>	<b>27</b>

## **Índice de Abreviaturas**

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARG1:** arginasa 1

**CCL2:** proteína quimioatrayente de monocitos 1 o MCP-1

**DC:** célula dendrítica

**MDSC:** células supresoras derivadas de mieloides

**CTLA-4:** proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos

**FasL:** ligando Fas

**FGF-2:** factor de crecimiento de fibroblastos

**G-CSF:** factor estimulante de colonias granulocíticas

**GM-CSF:** factor estimulante de colonias granulocíticas monocíticas

**IFN- $\gamma$ :** interferón gamma

**IL-10,** interleucina 10

**IL-12,** interleucina-12

**IL-13,** interleucina 13

**IL-1 $\beta$ :** interleucina-1beta

**IL-2,** interleucina-2

**IL23,** interleucina

**IL-6:** interleucina-6

**IL-8:** interleucina-8

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible

**MHC:** complejo mayor principal de histocompatibilidad

**M $\phi$ ,** macrófagos

**NK:** célula Natural Killer

**PD-1:** proteína de muerte celular programada 1

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PD-L1:** ligando 1 de muerte celular programada

**PGE2:** prostaglandina-E2

**SFC:** factor de células madre

**Teff:** células T efectoras

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta

**Th:** subpoblaciones de células T cooperadoras

**TIM-3:** dominio inmunoglobulina y mucina de células T-3

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**Treg:** célula T reguladora

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular.

**$\beta$ 2M:** beta 2 microglobulina

## Resumen

El Linfoma no Hodgkin (LNH) es el séptimo tipo de cáncer más común en humanos, representando el 4.3% de todas las neoplasias malignas, mientras el linfoma canino representa el 6% de todas las neoplasias en esta especie a su vez representando entre el 80 y el 90% de las neoplasias de origen hematopoyético. Tanto en seres humanos como en perros el inmunofenotipo de células B es el más frecuente, seguido por el linfoma de células T y NK, así mismo puede observarse mayor predisposición en hombres y machos enteros que en mujeres y hembras. Su desarrollo se relaciona a la exposición a pesticidas, presencia de inflamación crónica, enfermedades autoinmunes y algunas enfermedades infecciosas.

Los cambios en la respuesta inmune son cruciales en el desarrollo del cáncer debido a que puede evitar o propiciar un proceso neoplásico. Una parte importante para poder comprender el comportamiento de la respuesta inmune es la distribución de las subpoblaciones de linfocitos (T CD4, Treg, T CD8, NK y B).

En el presente trabajo se evaluaron las subpoblaciones de linfocitos tanto en perros sanos como en perros con linfoma multicéntrico recién diagnosticados y sin tratamiento con el objetivo de observar el comportamiento en la distribución de células T reguladoras, linfocitos B, TCD4+, TCD8+ y células NK like en sangre periférica para comparar los cambios entre ambos grupos y determinar el estado inmunológico de los pacientes con linfoma.

En las muestras control los porcentajes obtenidos fueron los siguientes: linfocitos T  $61.52 \pm 11.9\%$ , linfocitos T cooperadores  $32.62 \pm 8.3\%$ , linfocitos T citotóxicos  $20.87 \pm 7.1\%$ , linfocitos T reguladores  $0.90 \pm 0.2\%$ , células NK like  $14.11 \pm 8.2\%$ , linfocitos B  $25.33 \pm 7.1$  y un ratio CD4/CD8 de 1.5, en contraste con los perros con linfoma, cuyos porcentajes fueron: linfocitos T  $30.83 \pm 28.63\%$ , linfocitos T cooperadores  $51.80 \pm 17.09\%$ , linfocitos T citotóxicos  $26.72 \pm 20.57\%$ , linfocitos T reguladores  $8.5 \pm 8.5\%$ , células NK like  $6.0 \pm 2.2\%$  y linfocitos B  $46.8 \pm 45.1\%$  y un ratio CD4/CD8 de 1.9.

Se concluyó que el panel de anticuerpos utilizado para el presente proyecto, muestra resultados consistentes con estudios realizados anteriormente para ambos grupos de estudio; además los cambios mostrados en subpoblaciones como las células T reguladoras y NK like, en los pacientes con linfoma en comparación con los controles sanos podrían tener relevancia clínica.

Los perros con linfoma presentan un incremento en el porcentaje de células T reguladoras de sangre periférica, así como un decremento en el porcentaje de células efectoras en comparación con perros sanos.

## Palabras clave

Linfoma canino, subpoblaciones, linfocitos, T reguladoras, células NK

# 1. Introducción

## 1.1 Cáncer

Las teorías actuales sobre el cáncer sostienen que es una proliferación celular somática incontrolada causada por la acumulación progresiva de mutaciones aleatorias en genes críticos que controlan el crecimiento y la diferenciación celular (1), estas mutaciones se incrementan por factores de riesgo intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos no son modificables y surgen de una tasa de mutación basal que opera en todas las células en división (errores al azar de la replicación del ADN); los factores extrínsecos pueden ser en algunos casos modificables y generalmente incrementan el riesgo de adquirir mutaciones intrínsecas (edad, reparación tisular, hormonas, factores de crecimiento, inflamación, radiación, químicos, tabaco, falta de ejercicio y mala nutrición). La fijación de mutaciones adquiridas al azar (errores, eliminaciones e inserciones de un solo nucleótido) en un tejido depende de la supervivencia y división de la célula mutada (2,3).

Los errores anteriormente mencionados pueden producir "mutaciones pasajeras" que no afectan la formación del cáncer y "mutaciones impulsoras" necesarias para el desarrollo de un proceso neoplásico. La adquisición de mutaciones relacionadas con genes supresores y genes impulsores principalmente están asociadas con la pérdida de su función y/o cambios epigenéticos que a menudo incrementan las tasas de mutación debido a que propician mayor sensibilidad a los agentes mutagénicos mediante la ruptura de componentes de la maquinaria de mantenimiento genómico que de manera normal detectarían daños y realizarían la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) o forzarían a las células dañadas genéticamente a la senescencia o la apoptosis (3,4).

La acumulación de defectos genéticos confiere una gran heterogeneidad y plasticidad entre poblaciones celulares lo que da como resultado al desarrollo de capacidades funcionales que permiten que las células neoplásicas sobrevivan, proliferen y se diseminen; estas funciones se adquieren en diferentes tipos de tumores a través de distintos mecanismos y en varios momentos del curso de la formación del proceso neoplásico. Entre estas se encuentran la producción de factores de crecimiento o una reacción exagerada a estos, evadir mecanismos que llevan a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y la capacidad de hacer metástasis (4,5).

La obtención de los principales rasgos del cáncer es posible por la adquisición de características habilitadoras, como la inestabilidad genómica que genera mutaciones aleatorias que pueden orquestar capacidades funcionales; la segunda característica habilitadora implica el estado inflamatorio de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas, lo que sirve para promover la progresión tumoral a través de la secreción de diversos factores al microambiente tumoral, incluidos factores de crecimiento, factores proangiogénicos, enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis; por otra parte se lleva a cabo la

reprogramación del metabolismo energético celular para apoyar el crecimiento además de la proliferación celular continuos y por último se encuentra la evasión por parte de las células cancerosas de las células del sistema inmunológico ya que adquieren la capacidad de utilizar a su favor un sistema inmunológico que podría antagonizar pero a la vez potenciar el desarrollo y la progresión del tumor (4).

Recientemente se incorporaron cuatro nuevas características del proceso neoplásico; comenzando por el desbloqueo de la plasticidad fenotípica que es considerada como una característica funcional, normalmente el resultado final de la diferenciación celular es en la mayoría de los casos una condición antiproliferativa, sin embargo, cada vez hay más evidencia de que las células neoplásicas que están destinadas a seguir una vía que conduce a la diferenciación hasta una etapa final pueden manipular el proceso, manteniéndose así en un estado similar al de una célula parcialmente diferenciada o pueden adquirir así rasgos específicos de tejido que no estaban predeterminados por sus células de origen normales. Posteriormente están las nuevas características habilitadoras como lo son regulación epigenética no mutacional de la expresión génica que puede contribuir a la adquisición de capacidades distintivas durante el desarrollo del tumor al estar involucrada integralmente con la plasticidad fenotípica (6)

En tercer lugar, se encuentra la microbiota que normalmente se asocia simbióticamente con los tejidos de barrera del cuerpo expuestos al entorno externo (la epidermis y las mucosas el tracto gastrointestinal, pulmón, y el sistema urogenital) y pueden tener efectos protectores o perjudiciales sobre el desarrollo del cáncer, la progresión tumoral y la respuesta a la terapia. Hay indicios de que determinadas especies bacterianas pueden estimular directamente la señalización proliferativa, por ejemplo, en el epitelio del colon puede causar inestabilidad y mutación del genoma además de generar inflamación. Por último, la senescencia celular que puede funcionar como un mecanismo protector al limitar la progresión del tumor, sin embargo, evidencia de los últimos años revela todo lo contrario: en ciertos contextos, las células senescentes estimulan la progresión tumoral mediante la transmisión paracrina a las células neoplásicas vecinas, así como a otras células en el microambiente tumoral, moléculas de señalización para transmitir capacidades distintivas. Por lo tanto, en diferentes sistemas experimentales, se ha demostrado que las células cancerosas senescentes contribuyen de diversas formas a la señalización proliferativa, evitando la apoptosis, induciendo la angiogénesis, estimulando la invasión, la metástasis y suprimiendo la inmunidad tumoral (6).

Todos los cambios que sufre una célula para transformarse en una célula neoplásica son los que confieren una gran complejidad al tratar de encontrar alternativas terapéuticas contra un proceso neoplásico.

## **1.2 Cáncer a nivel mundial**

El cáncer es una causa importante de morbilidad y mortalidad en la población humana alrededor del mundo, según GLOBOCAN en el año 2020 se estima que el número de nuevos casos y muertes ascendió a 19.3 y 10 millones, respectivamente; además, se estima que a nivel mundial se producirán aproximadamente 28.4 millones de casos nuevos de cáncer en 2040 (aumento del

47% con respecto a 2020), principalmente en los países desarrollados (64% a 95%) frente a los países en vías de desarrollo (32% a 56%) debido al aumento de los factores de riesgo asociados con la globalización y una economía en crecimiento (7,8).

### **1.3 Cáncer en la población mexicana**

En México, para el año 2013, el cáncer se posicionó entre el segundo y el tercer puesto como una de las principales causas de muerte, el país presentaba una tasa de mortalidad de 66.37 por 100,000 habitantes. En los estados de Chihuahua, Sonora, Nuevo León, Ciudad de México y Veracruz se mantuvo una mayor mortalidad causada por neoplasias (entre 76.04 y 77.16 por 100,000 habitantes)(9). En 2019 se registraron 88 683 defunciones por tumores malignos, que representan el 12% de las defunciones totales, entre enero y agosto de 2020 se registraron 683 823 defunciones, de las cuales 9% se deben a tumores malignos (60 421 muertes) (10).

### **1.4 Cáncer en perros**

El cáncer es la principal causa de muerte en perros mayores de 10 años (aproximadamente > 50%). A nivel mundial se estima que el cáncer afecta a cuatro millones de perros. La frecuencia de las neoplasias caninas pueden ser resultado de la crianza selectiva, ya que la búsqueda de características “deseables” en perros de diferentes razas conlleva a la adquisición de alelos capaces de causar enfermedades específicas de cada raza; además, del riesgo de aumentar la frecuencia o incluso la fijación de estos alelos en el acervo genético. Algunas razas de perros de pedigrí, particularmente las de ascendencia europea, tienen una diversidad genética reducida (hasta el 90% de pérdida), a diferencia de; por ejemplo, las razas del este de Asia. Dicha pérdida en la variación genética es resultado de un incremento de la endogamia a lo largo del tiempo (11–13).

Además de las características genéticas de los perros, es importante considerar el ambiente que los rodea, debido a su cercanía con el ser humano, muchos de estos factores ambientales pueden ser influenciados por hábitos y cuestiones laborales de las personas. Por ejemplo, el tabaquismo, la utilización de insecticidas y/o herbicidas, la exposición a solventes, malos hábitos alimenticios impuestos por los tutores, hidrocarburos aromáticos, etcétera; pueden propiciar el desarrollo de diferentes tipos de cáncer canino (14).

#### **1.4.1 La importancia del perro como modelo para el cáncer del ser humano**

Se ha propuesto al perro como modelo para el cáncer del ser humano ya que puede proporcionar una perspectiva distinta a la de otros modelos animales debido a que los perros desarrollan espontáneamente neoplasias que comparten muchas características con sus contrapartes humanas, incluidas las interacciones inmunológicas, la heterogeneidad, el desarrollo de resistencia a la quimioterapia y la metástasis; además la esperanza de vida corta de los perros en comparación con las personas, da como resultado que los cánceres que tardan entre 15 y 20 años en presentarse en los seres humanos se pueden estudiar en el perro en 2 o 3 años (11,12).

### **1.5 Linfoma no Hodgkin (LNH) en el ser humano**

El Linfoma no Hodgkin (LNH) es el séptimo tipo de cáncer más común en humanos, representando el 4.3% de todas las neoplasias malignas, con una mayor predisposición en hombres que en mujeres; siendo el inmunofenotipo de células B el más común (85 y 90% de todos los linfomas), mientras que el resto son linfomas de células T y NK (15–17).

El desarrollo de esta neoplasia hematopoyética se atribuye a ciertas mutaciones, dependiendo del inmunofenotipo. En el caso de linfoma de células T, se presentan en el receptor de células T (TCR) y los reguladores PI3K o NF-κB que normalmente rigen la activación fisiológica de las células T; en el caso de linfoma de células B, puede haber mutaciones secundarias a la estimulación constante de las células B efectoras por antígenos o autoantígenos, dando paso a errores en procesos de remodelación del gen de inmunoglobulina (IG), la recombinación VDJ, y en la hipermutación somática (18,19).

El linfoma de células Natural Killer (LNK) se caracteriza por la eliminación de la región cromosómica 6q21, lo que conduce al silenciamiento de genes supresores de tumores como PRDM1, ATG5, AIM1, FOXO3 y HACE1. También la desregulación del gen supresor de tumores TP53, así como la activación de PD-L1 y MYC, están involucradas en la patogénesis de LNK y se teoriza que estos cambios a nivel génico son secundarios a la infección del virus Epstein-Barr (20).

Entre los principales factores que conllevan a la presentación de esta neoplasia son la exposición a químicos, enfermedades autoinmunes, inflamación crónica, inmunosupresión, enfermedades virales y bacterianas. Se ha relacionado la presencia de linfoma en pacientes con artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, Lupus eritematoso sistémico, pacientes sometidos a trasplantes de órganos, Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), *Helicobacter Pylory*, virus Epstein-Barr, virus de la hepatitis C, *Borrelia burgdorferi* y *Chlamydia psitacosis*, *Coxiella burnetiise*, enfermedad celíaca, eccema, psoriasis, un historial de tabaquismo extenso y el trabajo con textiles o productos eléctricos (21).

### **1.6 Linfoma canino**

El linfoma canino posee características similares a las encontradas en el LNH del ser humano, entre todas las neoplasias caninas, el linfoma representa entre el 80 y el 90% de las neoplasias de origen hematopoyético y el 6% de todas las neoplasias malignas. Al igual que en seres humanos el inmunofenotipo de células B es el más frecuente en perros; así mismo puede observarse mayor predisposición en hombres y machos enteros que en mujeres y hembras (15,17,22).

En perros se atribuyen como indicadores de riesgo la influencia de factores genéticos, hormonales y ambientales como la exposición a pesticidas, contaminación (cercanía a desechos radiactivos, e incineradores de desechos) y diversos productos químicos; además, la edad parece ser otro factor importante, ya que afecta principalmente a perros mayores de 4 años (16,17).

Es complicado establecer las razas mayormente afectadas por esta neoplasia ya que pueden variar y verse sobrerrepresentadas de acuerdo a la zona donde se realice el estudio; sin embargo, se destacan el Cobrador Dorado, Pastor Alemán, Cobrador de Labrador, Cocker Spaniel, Rottweiler, Pastor de Shetland y Bóxer (16,21).

### **1.7 Clasificación, diagnóstico y estadificación de Linfoma canino y humano**

La clasificación de los linfomas busca diferenciar subtipos de enfermedades de acuerdo con pautas reproducibles y clínicamente relevantes que faciliten la comunicación, el tratamiento y la investigación. Según la organización mundial de la salud (OMS), los subtipos de linfoma se definen de acuerdo con su citomorfología, inmunofenotipo, características genéticas, moleculares, y clínicas. Aunque su alcance estaba limitado por la falta de información genética y/o inmunofenotípica específica de la especie, trabajos recientes han confirmado la aplicabilidad de las directrices de la OMS de 2008 al linfoma canino (15). En el Cuadro 1 se describen los linfomas encontrados en perros y en seres humanos.

El diagnóstico debe realizarse, preferiblemente mediante una biopsia de un linfonodo u órgano afectado, la obtención de una cantidad suficiente de tejido para permitir estudios complementarios aumentará las posibilidades de que el patólogo obtenga un diagnóstico certero (21,23).

Una vez obtenido el diagnóstico definitivo, es importante llevar a cabo el proceso de estadificación para determinar la diseminación del proceso neoplásico, así como poder brindar un pronóstico más certero. La estadificación debe incluir una historia clínica, examen físico general, estudios de laboratorio (para evaluar la función de la médula ósea y otros órganos que podrían estar involucrados), medición de las concentraciones séricas de lactato deshidrogenasa y estudios de imagen avanzada (21). Los estadios clínicos utilizados en medicina humana y perros están descritos en el Cuadro 2.

### **1.8 Semiología**

Aunque la mayoría de los pacientes tanto humanos como caninos presentan linfadenomegalia indolora, los signos clínicos en perros y los síntomas en humanos tienden a ser inespecíficos, entre estos se encuentran: fiebre, pérdida de peso, prurito, fatiga, poliuria, polidipsia, etc. Además, es importante mencionar que esta neoplasia puede afectar a cualquier órgano, por lo que la presentación puede variar considerablemente dependiendo del órgano involucrado (21,23).

**Cuadro 1: Linfomas no Hodgkin caninos y humanos según las guías de la OMS de 2008 (modificado de Seelig 2016)**

Linfoma de Células B	Linfoma de Células T
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia prolinfocítica de células B</li> <li>• Leucemia de células pilosas</li> <li>• Linfoma / leucemia esplénica, inclasificable</li> <li>• Enfermedades de cadena pesada</li> <li>• Linfoma MALT</li> <li>• Linfoma cutáneo primario del centro del folículo</li> <li>• Linfoma de células B grandes mediastínico primario</li> <li>• Linfoma intravascular de células B grandes</li> <li>• Linfoma de células B grandes ALK-positivo</li> <li>• Linfoma plasmablástico</li> <li>• Linfoma de células B grandes en la enfermedad de Castleman</li> <li>• Linfoma de derrame primario</li> <li>• Linfoma de células B, inclasificable</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia prolinfocítica de células T</li> <li>• Trastorno linfoproliferativo crónico de células NK</li> <li>• Leucemia agresiva de células NK</li> <li>• Enfermedad de células T positivas para EBV de la infancia</li> <li>• Linfoma similar a hidroa vaciniforme</li> <li>• Leucemia / linfoma de células T adultas</li> <li>• Linfoma extraganglionar de células NK / T, tipo nasal</li> <li>• Linfoma subcutáneo de células T similar a paniculitis</li> <li>• Trastornos cutáneos de células T CD30+</li> <li>• Linfoma angioinmunoblástico de células T</li> <li>• Linfoma anaplásico de células grandes, ALK positivo</li> <li>• Linfoma anaplásico de células grandes, ALK negativo</li> </ul> 
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia/ Linfoma linfoblástico B</li> <li>• Leucemia linfocítica crónica / linfoma de linfocitos pequeños</li> <li>• Linfoma esplénico de la zona marginal</li> <li>• Linfoma linfoplasmocítico</li> <li>• Mieloma de células plasmáticas</li> <li>• Plasmocitoma solitario de hueso</li> <li>• Plasmocitoma extraóseo</li> <li>• Linfoma ganglionar de la zona marginal</li> <li>• Linfoma folicular</li> <li>• Linfoma de células del manto</li> <li>• Linfoma difuso de células B grandes</li> <li>• Granulomatosis linfomatoide</li> <li>• Linfoma de Burkitt</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia / linfoma linfoblástico T</li> <li>• Leucemia linfocítica granular de células T</li> <li>• Linfoma de células T asociado a enteropatía</li> <li>• Linfoma hepatoesplénico de células T</li> <li>• Micosis fungoide</li> <li>• Síndrome de Sézary</li> <li>• Linfoma periférico de células T, NEOM</li> <li>• Linfoma de la zona T</li> </ul> 
 Linfomas reportados en humanos	 Linfomas reportados en perros

**Cuadro 2: Estadios clínicos de Ann Arbor modificados para su aplicación en animales domésticos**

<p><b>Estadios</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I. Involucramiento limitado a un solo linfonodo o tejido linfoide en un solo órgano</li> <li>II. Involucramiento de dos o más linfonodos del mismo lado del diafragma</li> <li>III. Involucramiento generalizado de linfonodos</li> <li>IV. Afectación del hígado y / o el bazo (± Estadio III)</li> <li>V. Manifestación en sangre y afectación de la médula ósea y / u otros sistemas de órganos (± estadios I-IV)</li> </ul>
<p><b>Cada estadio se subclasifica en:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Sin signos sistémicos</li> <li>b) Con signos sistémicos</li> </ul>

## 1.9 Tratamiento

Generalmente en las personas con linfoma de células B, el tratamiento se basa en el protocolo quimioterapéutico con ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (denominado como CHOP) durante 3 o 4 ciclos, en algunos casos, dependiendo del estadio y la clasificación del linfoma esto tiende a cambiar; como por ejemplo en el linfoma difuso de células B grandes (principalmente en casos avanzados) se recomienda la adición de rituximab (R-CHOP) o en casos de linfoma folicular en estadios I o II, el tratamiento puede manejarse mediante radioterapia, mientras en linfoma de células del manto es posible alternar dos protocolos: R-CHOP y R-DHAP (rituximab, dexametasona, citarabina y cisplatino) y en el linfoma MALT (tejido linfoide asociado a mucosas o mucosa associated lymphoid tissue, en inglés) se recomienda antibioterapia para eliminar a *H. pylori* (24).

En el LNH de células T, el tratamiento preferencial se realiza con protocolos CHOP, DHAP y COPBLAM (ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, doxorubicina y procarbazona) (25), en estadios pobremente avanzados, incluso se recomienda la radioterapia en la zona afectada en combinación con la quimioterapia, mientras que en estadios avanzados se recomienda la utilización de antraciclinas y la adición de agentes como la L-asparaginasa o el metotrexano como terapia de mantenimiento (26).

En perros, los agentes quimioterapéuticos disponibles más efectivos para el linfoma incluyen: doxorubicina, L-asparaginasa, vincristina, ciclofosfamida y prednisona, los cuales son parte del protocolo CHOP que, al igual que en el ser humano es utilizado como primera línea de tratamiento debido a sus altos porcentajes de remisión (80 al 95%) que además pueden durar en su mayoría de 10 a 12 meses. Otros medicamentos que tienen actividad documentada a menudo son utilizados como fármacos solitarios y se consideran como una segunda línea de tratamiento, entre estos se encuentran: rabacfosadina, lomustina, vinblastina, actinomicina-D, mitoxantrona, mustargen, clorambucilo, metotrexato, dacarbazina, 9-aminocamptotecina, ifosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina y gemcitabina. Con la excepción de la doxorubicina, la terapia de inducción con un solo fármaco generalmente no resulta en una remisión duradera en comparación con el clásico protocolo CHOP (23).

A pesar de la efectividad de los protocolos quimioterapéuticos derivados CHOP, es importante siempre considerar a los pacientes con insuficiencia renal severa o cardiopatas. Además, de los posibles efectos adversos que pueden sufrir algunos individuos ante ciertos fármacos, como lo son la mielosupresión, náusea, vómito, cambios en piel y uñas, mucositis, cistitis hemorrágica, cardiotoxicidad, neurotoxicidad, complicaciones hemostáticas, pancreatitis e hipersensibilidad (25,26); por lo que es imprescindible siempre incluir tratamiento de soporte dependiendo de los signos o síntomas derivados de la quimioterapia, además de considerar alternativas terapéuticas que puedan reducir estos riesgos.

### **1.9.1 Alternativas terapéuticas**

Con el paso de los años en humanos se han desarrollado alternativas terapéuticas contra las neoplasias hematopoyéticas como el LNH, algunos ejemplos son: el bloqueo de moléculas inmunosupresoras (PD-1/PDL1, CTLA-4, TIGIT, TIM-3 y LAG-3) a través de anticuerpos, trasplantes autólogos de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T), células CIK (células mononucleares de sangre periférica estimuladas con interferón (IFN)- $\gamma$ , interleucina (IL)-2 y anticuerpo monoclonal anti-CD3) y terapia con células NK. Estas alternativas han tenido resultados mixtos con respecto a su eficacia; además se han reportado algunos efectos adversos como por ejemplo fiebre y neurotoxicidad; se creó que estas alternativas podrían ser prometedoras más aún requieren más pruebas (27).

En perros se están desarrollando alternativas prometedoras para el tratamiento de linfoma, como la vacuna contra telomerasa canina Tel-eVax. La actividad de la telomerasa se ha observado en los tumores caninos, lo que contribuye al mantenimiento de la longitud de los telómeros en las células cancerosas, los telómeros son fundamentales para la proliferación celular y la supervivencia de las células neoplásicas. Esta vacuna se probó en 17 perros afectados por linfoma de células B en estadio III-IV y tratados al mismo tiempo con un protocolo CHOP Madison Wisconsin de 27 semanas, en este estudio no se observaron efectos adversos significativos y la supervivencia de los animales vacunados/CHOP fue de 64,5 semanas (28).

Tanto en perros como en humanos estas nuevas terapias son bastante prometedoras en cuanto a resultados, pero es necesario considerar la poca disponibilidad, los costos y en algunos casos la necesidad de un equipo especializado, por lo que es importante buscar alternativas más accesibles, por ejemplo, existen inmunomoduladores como el péptido GK1 y el extracto dializable de leucocitos humanos (Transferon®) que pueden ser alternativas terapéuticas capaces de disminuir los costos y efectos secundarios. Estos compuestos han sido probados en modelos murinos de melanoma, carcinoma en glándula mamaria y próstata, y han demostrado tener un efecto positivo en la respuesta inmune anti-tumoral y disminuir la capacidad metastásica de dichos tumores (29–31). Sin embargo, antes de poder trasladar estos compuestos a los protocolos terapéuticos de perros y humanos, es necesario comprender de una manera más profunda el comportamiento del sistema inmunológico de estos pacientes.

### **1.10 Respuesta inmune y cáncer**

La respuesta inmune es una parte importante en el desarrollo del cáncer debido a que puede llevar tanto a la eliminación del proceso neoplásico, como a crear un microambiente óptimo que facilite su progresión. El conjunto de cambios que pueden llevar al desarrollo tumoral se da mediante tres pasos importantes: eliminación, equilibrio y escape (32–39). Las características de estas etapas se encuentran resumidas en el Cuadro 3 y serán descritas a continuación.

### **1.10.1 Fase de eliminación**

En esta primera fase del ciclo, tanto la inmunidad innata como la adaptativa, trabajan de manera conjunta para destruir el proceso neoplásico. Los tumores altamente inmunogénicos liberan patrones moleculares asociados a daño (DAMP's), moléculas de células normales expresadas de manera aberrante debido a las alteraciones genéticas, productos de la muerte celular por necrosis o presentes en cuerpos apoptóticos. Estos antígenos son captados y procesados por células dendríticas y/o macrófagos, que, a su vez, liberan citocinas y presentan los antígenos tumorales a las células T. Una vez activadas las células TCD4+ y los linfocitos TCD8+ citotóxicos se infiltran al tumor, estas últimas reconocen péptidos en las moléculas de clase I (MHC I) de las células aberrantes, induciendo su destrucción mediante la liberación de sus gránulos e induciendo la apoptosis celular, mientras que los LCD4+ (Th1) fortalecen los mecanismos innatos mediante la producción de citocinas como el IFN  $\gamma$  (32–35)

### **1.10.2 Fase de equilibrio**

La fase de equilibrio se conoce como la más duradera debido a que el proceso neoplásico puede quedarse estancado en este punto durante la vida entera del individuo sin que este llegue a tener manifestaciones clínicas (33). Esta comienza después de un proceso de selección en el que el sistema inmunológico comienza a ser deficiente en la eliminación de las células neoplásicas, por lo que sólo quedan las células pobremente inmunogénicas (34).

Los componentes de la respuesta antitumoral empiezan a beneficiar a las células tumorales, en este caso el interferón- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) que de manera normal debería potenciar la presentación de antígenos, además de la respuesta Th1 regulando la diferenciación, activación y homeostasis de las células T efectoras y activar macrófagos; pasa a estimular la producción de IL-23 por parte de los macrófagos mediante la señalización positiva del factor de transcripción Stat3, lo que conlleva a la inhibición de la IL-12 (una parte importante para estimular las respuestas Th1) y a una regulación positiva del factor de transcripción Foxp3 e IL-10 en las células T que expresan receptores para IL-23 (40,41) pasando de manera paulatina a un microambiente inmunosupresor.

### **1.10.3 Fase de escape**

En la fase de escape los tumores comienzan a crecer progresivamente, sin inhibición del sistema inmunológico ya que existe un menor reconocimiento de las células transformadas debido a la pérdida de expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I o a una pobre capacidad de procesar y cargar péptidos en ellas, esto es consecuencia del silenciamiento epigenético del locus del MHC dando como resultado final una deficiente presentación de antígenos (34).

En los tumores en fase de escape la respuesta Th1 se ve afectada debido a la secreción de TGF- $\beta$ , que induce el agotamiento de las células CD8+ a través de la regulación positiva del factor de transcripción Maf, además de aumentar la acumulación de células supresoras en el microambiente tumoral como células supresoras derivadas de mieloides (CSDM), macrófagos M2 y células T reguladoras (Tregs) que, a su vez, pueden secretar interleucinas capaces de estimular un microambiente inmunosupresor. Además, las células tumorales pueden expresar ligandos que

interactúan con receptores inhibidores en las células inmunes (PD-1, CTLA-4, TIM-3 o LAG-3) lo que conlleva a una pobre proliferación de las células TCD8 y una deficiente capacidad citotóxica (33–38).

Aunque la mayoría de los mecanismos están relacionados con la inmunidad celular, también los anticuerpos secretados por las células plasmáticas pueden ser beneficiosos para los tumores debido a que los anticuerpos producidos por estas forman complejos inmunes que se unen a los receptores de activación de Fc-gamma en el tejido neoplásico, dando como resultado el reclutamiento y la preparación de CSDM (39).

**Cuadro 3. Etapas de la respuesta inmune en cáncer.**

Fase	Eventos	Referencias
<b>Eliminación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Destrucción de células neoplásicas (Células NK y células CD8+) y liberación de antígenos tumorales.</li> <li>• Captación y presentación de antígenos por M<math>\theta</math> y células dendríticas mediante MHC.</li> <li>• Activación de células T.</li> <li>• Secreción de citocinas.</li> <li>• Potenciación de mecanismos innatos.</li> <li>• Proliferación e infiltración de células TCD4+ y CD8+.</li> <li>• Formación de anticuerpos y promoción de la secreción de IFN-<math>\gamma</math> por linfocitos B.</li> </ul>	(32–35)
<b>Equilibrio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-12, IL-23 e IFN-<math>\gamma</math> mantienen a las células tumorales ocultas en equilibrio.</li> </ul>	(33–36)
<b>Escape</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulación negativa de MHC clase I.</li> <li>• Expresión de moléculas inhibitoras que actúan directamente en las células T citotóxicas (PD-L1, FasL, CTLA-4).</li> <li>• Las células tumorales secretan factores que inhiben las funciones de las células Teff (TGF-<math>\beta</math>, IL-10, VEGF) o reclutan células reguladoras (Treg, M<math>\theta</math> M2, CSDM) mediante la secreción de citocinas (IL-4, IL-13, GM-CSF, IL-1<math>\beta</math>, VEGF PGE2) para generar un microambiente inmunosupresor</li> <li>• M<math>\theta</math> M2 que secretan TGF-<math>\beta</math>, IL-10 y PDGF.</li> <li>• La acumulación de CSDM en el MAT da como resultado el bloqueo de la función de las células T al expresar TGF-<math>\beta</math>, ARG1 e iNOS.</li> <li>• Las células Treg inhiben a las células Teff a través de la expresión de moléculas inhibitoras como CTLA-4, que bloquean las señales coestimuladoras CD80-CD28, secreción de IL-10 y al consumo de IL-2.</li> <li>• Los anticuerpos secretados por las células B propician el reclutamiento y la preparación de CSDM al MAT.</li> </ul>	(33–39)
<p><b>Abreviaturas:</b> M<math>\theta</math>, macrófagos; CD, célula dendrítica; IL-12, interleucina-12; IL-13, interleucina 13; IL-10, interleucina 10; IL-2, interleucina-2; IL23, interleucina 23; ARG1, arginasa 1; CTLA-4, proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos; FasL, ligando Fas; GM-CSF, factor estimulante de colonias granulocíticas monocíticas; MAT, microambiente tumoral; IFN-<math>\gamma</math>, interferón gamma; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; CSDM, células supresoras derivadas de mieloides; Teff, Células T efectoras; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; PD-L1, ligando 1 de muerte celular programada; PGE2, prostaglandina-E2; TGF-<math>\beta</math>, factor de crecimiento transformante-<math>\beta</math>; Treg, célula T reguladora; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular.</p>		

#### 1.10.4 Respuesta inmune en Linfoma

Se ha documentado que el linfoma comparte la mayor parte de los mecanismos de evasión a la respuesta inmune antitumoral con las neoplasias sólidas, como lo es una presentación de antígeno deficiente. Esto se debe a una regulación negativa de las MHC I asociada a mutaciones en la Beta 2 Microglobulina ( $\beta$ 2M), que es parte de su estructura; mientras que las MHC II se ven afectadas

por mutaciones y silenciamiento epigenético de factores de transcripción necesarios para su expresión, dos ejemplos importantes son las modificaciones en el cromosoma 6 y la regulación positiva del factor de transcripción FOXP1 (42).

Al igual que con las neoplasias sólidas, en el linfoma se denota un microambiente inmunosupresor, en donde las células Treg inhiben la actividad de las células efectoras a través de la expresión de CTLA-4 y la secreción de TGF- $\beta$  e IL-10. El TGF- $\beta$  presente en el microambiente tumoral da como resultado una mayor expresión de TIM-3 en las células NK, lo que inhibe su capacidad citotóxica, mientras las células mesenquimatosas del estroma del tumor se encargan de secretar citocinas tanto inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2, IL-8) como antiinflamatorias (TGF- $\beta$ ) que además de promover el crecimiento tumoral se encargan de reclutar macrófagos y neutrófilos (43).

Las CSDM reclutan mediante la secreción de factores como G-CSF, SFC e IFN- $\gamma$ . Además, llevan a las células NK y TCD8 a un estado de anergia a través del contacto celular directo (expresión de PD-L1), lo cual da como resultado el agotamiento y por tanto una citotoxicidad ineficaz (43). Por su parte, los macrófagos cumplen diferentes funciones dependiendo del estado en el que se encuentre el proceso neoplásico: en etapas tempranas del desarrollo del linfoma, estimulan la diferenciación y el reclutamiento de más células del sistema inmune mediante la secreción de múltiples quimiocinas y citocinas; mientras que en estadios avanzados los macrófagos M2 inhiben la respuesta antitumoral mediante la secreción de TGF- $\beta$  e IL-10, además estimulan la expresión de B7-H4 (molécula inhibidora) en el microambiente tumoral mediante la secreción de IL-6 e IL-10 (43–45).

Otras células con una función importante en la progresión de linfoma son las células dendríticas, ya que protegen de la apoptosis a las células transformadas, debido a la regulación positiva del micro ARN-181a, que disminuye los niveles de proteína 11 proapoptótica (similar a Bcl-2) (43), los mastocitos producen factores angiogénicos y citocinas que estimulan la progresión tumoral: FGF-2, VEGF, IL-8, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  (46).

Finalmente, las células neoplásicas también pueden influenciar cambios en el microambiente, por ejemplo, las células de linfoma con inmunofenotipo B tienen la capacidad de polarizar células T cooperadoras CD4+CD25- a Treg CD4+ CD25+ además de expresar la molécula CD47 que evita la fagocitosis y tanto linfoma de células B y T tiene la capacidad de inhibir mecanismos citotóxicos mediante la expresión de PD-L1 (42,43,45,47).

## **1.11 Biomarcadores en Linfoma Canino**

### **1.11.1 Citocinas**

Las citocinas pueden ser producidas por células tumorales y células del sistema inmune asociadas al tumor por lo que sirven para la identificación de factores etiológicos. Además, estas tienen potencial para funcionar como blancos terapéuticos. En seres humanos, se ha asociado el incremento de IL-6 y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a la formación de linfoma; y el

incremento de IL-10 y la disminución de la IL-2 a una disminución de la respuesta Th1, por ello, la desregulación de estas citocinas es considerada como factores de riesgo para el desarrollo de LNH (48,49). El incremento de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  y del receptor soluble de IL-2 (srIL2) están asociados a un pronóstico desfavorable y un menor tiempo de vida en pacientes con LNH (50).

En perros, las citocinas parecen tener un comportamiento similar a las del ser humano, en general IL-6, IL-10 y la proteína quimioatrayente de monocitos- 1 (MCP-1) o CCL2 se encuentran en concentraciones considerablemente mayores en sangre periférica de perros con linfoma multicéntrico que en los controles sanos (51,52). Sin embargo, a diferencia del humano, el TNF- $\alpha$  no es relevante (53).

Hay evidencia que indica que el incremento o disminución de citocinas depende del fenotipo; por ejemplo: el incremento de IL-10 y CCL2 (MCP-1) es mayor en linfoma de células B y el incremento de IL-6 y VEGF en linfoma de células T. Como marcadores de respuesta al tratamiento pueden encontrarse el VEGF ya que puede verse disminuido después del protocolo quimioterapéutico y MCP-1 debido a que los valores basales altos de esta citocina están relacionados con una pobre respuesta al tratamiento (52,53).

#### **1.11.2 Células T Reguladoras**

Las Tregs tienen un papel central en la supresión de células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> y NK lo cual puede comprometer la proliferación, la producción de citocinas y los mecanismos de citotoxicidad como la producción de gránulos e IFN- $\gamma$  (19,37,54,55). Como biomarcador de sangre periférica, las células Treg son un hallazgo importante, ya que, tanto en perros como en seres humanos el incremento de estas células está asociado a un pronóstico negativo. Las Treg pueden ser un marcador de respuesta al tratamiento, ya que está reportada su disminución después de la quimioterapia, y con ello un mayor tiempo de remisión (56–58).

#### **1.11.3 Células Natural Killer**

Las células Natural Killer (NK) son uno de los mediadores celulares de la inmunidad innata de origen linfocítico que sin necesidad de inmunización o preactivación pueden reconocer y destruir células aberrantes además de producir rápidamente citocinas. Su función está regulada por un equilibrio entre las señales transmitidas mediante la activación de receptores que reconocen ligandos en células tumorales o células infectadas por virus y receptores inhibidores específicos para moléculas de clase I del MHC (59).

En algunos estudios realizados en seres humanos con LNH, las células NK han demostrado ser un buen biomarcador pronóstico, ya que un conteo bajo de estas al momento del diagnóstico predice una menor supervivencia después del tratamiento quimioterapéutico (60–62). Por otra parte, estas células también pueden ser un blanco terapéutico para pacientes con cáncer.

En perros la inmunofenotipificación de esta estirpe celular es difícil debido a que no se ha definido una molécula específica expresada en todas las células NK caninas que pueda utilizarse como un marcador para esta estirpe celular (63); por ejemplo, las células NK humanas se clasifican como

CD3-CD56+ y se pueden dividir en dos subconjuntos funcionales: CD56<sup>bright</sup> que son principalmente productoras de citocinas y las otras son las células CD56<sup>dim</sup> que tienen una mayor actividad citotóxica (64), mientras en el perro se ha sugerido probar con marcadores como NCR1, sin embargo los resultados en el perro han demostrado inconsistencia con respecto a este marcador debido a que hay subconjuntos que pueden variar de CD3 - NCR1+ a CD3 + NCR1 +, las células CD3 - NCR1 + circulantes se caracterizaron además como CD56 - Granzima B + CD8 -, mientras CD3 + NCR1- expresan CD56 + (65).

En otro informe las células NK caninas se definen como linfocitos no B, no T (CD3-CD21-), sin embargo, se ha demostrado que las células NK putativas caninas comparten características fenotípicas y funcionales con los linfocitos T, ya que estos expresan tanto CD3 como CD5 dim. Además, las células NK CD3 - CD5 - CD21 - se expandieron a partir de células CD3 + CD5 dim CD21 -. Por lo que se asume que la relación entre estas dos poblaciones celulares se da al producirse una modulación fenotípica entre las dos poblaciones durante el cultivo en respuesta a la estimulación con citocinas o dependiente del grado de maduración (63).

#### **1.11.4 Linfocitos T Citotóxicos (CD8+)**

Se ha documentado que, en el cáncer, los linfocitos T citotóxicos llegan a un estado de agotamiento constante, aunque aún existe potencial proliferativo, la progenie de estas células tiene una producción deficiente de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF. A pesar de conservar la capacidad de degranular (medida a través de la expresión del marcador CD107a), la capacidad citotóxica como tal se ve afectada (37). Por otra parte, un estudio realizado en un modelo humano de LNH de células B, sugiere que en el microambiente hay una relación inversa de la cantidad de células Treg con respecto a los linfocitos T citotóxicos, dando como resultado la inhibición de la proliferación y la producción de gránulos citotóxicos (54).

En general el sistema inmunológico juega un papel crucial para el desarrollo o la destrucción de un proceso neoplásico. A través de los años se han desarrollado herramientas como la citometría de flujo para poder observar los cambios en la distribución de las subpoblaciones de linfocitos, para medir la producción de citocinas, incluso la determinación de marcadores que indiquen la capacidad citotóxica de las células efectoras. En el ratón y en el ser humano existen más estudios, sin embargo, otras especies que podrían ser relevantes en el estudio de la inmunología del cáncer como es el perro, aún se encuentran rezagadas, por lo que aún existen carencias de reactivos y marcadores específicos que puedan facilitar esta tarea además de pocos estudios del comportamiento de las subpoblaciones de linfocitos en perros con cáncer; debido a esto en el presente estudio se implementó un panel para la identificación y la observación de las subpoblaciones de linfocitos más importantes en el perro.

## **2. Justificación**

El presente estudio contribuirá a una mejor comprensión del comportamiento de las subpoblaciones de linfocitos y por tanto tener un conocimiento más acertado del estado

inmunológico de perros con linfoma multicéntrico, generando antecedentes que permitan identificar marcadores de pronóstico o de respuesta al tratamiento, así como encontrar posibles blancos terapéuticos.

### **3. Hipótesis**

Si en humanos con linfoma existen cambios en las poblaciones de linfocitos en sangre periférica, como el incremento en células T reguladoras y la disminución de linfocitos T CD8+, T CD4+ y NK, entonces los perros con linfoma presentarán un incremento en el porcentaje de células T reguladoras, así como un decremento en el porcentaje de células B, TCD4+, TCD8+ y células NK like de sangre periférica, en comparación con los perros sanos.

### **4. Objetivo general**

Evaluar el comportamiento en la distribución de células T reguladoras, linfocitos B, TCD4+, TCD8+ y células NK like en sangre periférica de perros con linfoma mediante la técnica de citometría de flujo para comparar los cambios con respecto a las muestras control y así determinar el estado inmunológico de estos pacientes.

### **5. Objetivos específicos**

1. Estandarizar la técnica de citometría de flujo para la evaluación de subpoblaciones de linfocitos tanto en perros clínicamente sanos como en perros con linfoma para la obtención de resultados confiables.
2. Realizar un perfil de poblaciones de linfocitos B, T CD4+, T CD8+, NK like y Treg en sangre periférica de perros clínicamente sanos mediante citometría de flujo multiparamétrica.
3. Realizar un perfil de poblaciones de linfocitos B, T CD4+, T CD8+ NK like y Treg en sangre periférica en perros con linfoma multicéntrico, mediante citometría de flujo multiparamétrica.
4. Comparar a los 2 grupos de estudio en busca de cambios de la distribución de las subpoblaciones de linfocitos que puedan tener relevancia clínica.

### **6. Material y métodos**

#### **6.1 Criterios de inclusión y exclusión para individuos de prueba**

Para la realización del presente estudio se tomaron en cuenta algunos criterios previos al muestreo: en los individuos sanos, solo se incluyeron animales adultos (mayores de 1 año) clínicamente sanos, con cuadro de vacunación y desparasitación completos, sin historia de enfermedades concomitantes; en los pacientes con linfoma de igual forma se incluyeron animales adultos, con cuadro de vacunación y desparasitación vigentes con diagnóstico citológico o histopatológico de linfoma, sin historia de enfermedades concomitantes, ya sea metabólicas o neoplásicas.

No se admitieron perros con otro tipo de neoplasia ni animales que por su condición requiriesen quimioterapia de inmediato.

## 6.2 Grupo control para la estandarización del panel de anticuerpos

Para llevar a cabo la estandarización del panel de anticuerpos para la determinación de las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica por citometría de flujo se reclutaron tres perros de entre 2 y 5 años, de raza Chihuahueño, Bulldog Francés y Pitbull; los tres machos y uno de ellos era castrado, los perros se encontraban clínicamente sanos, sin historia de enfermedades concomitantes y con cuadro de vacunación y desparasitación completo y vigente.

### 6.2.1 Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica

El aislamiento se realizó mediante centrifugación en gradiente de densidad, con el reactivo Lymphoprep® (1.077 g/ml, Axis Shield, Oslo, Noruega). La sangre se diluyó en un volumen igual con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y suero fetal bovino (SFB) al 2%. Posteriormente, se colocó en un volumen igual de Lymphoprep®, antes de centrifugar a 400 g durante 30 minutos a temperatura ambiente con aceleración y desaceleración suave. Las células mononucleares de sangre periférica purificadas se lavaron dos veces en PBS con SFB al 10% v/v mediante centrifugación a 600 g durante cinco minutos. Después del lavado, las células se suspendieron en 1 mL de PBS con FBS al 10% v/v, para su posterior conteo y ajuste, de acuerdo con las concentraciones requeridas para cada experimento (66). Ver figura 1

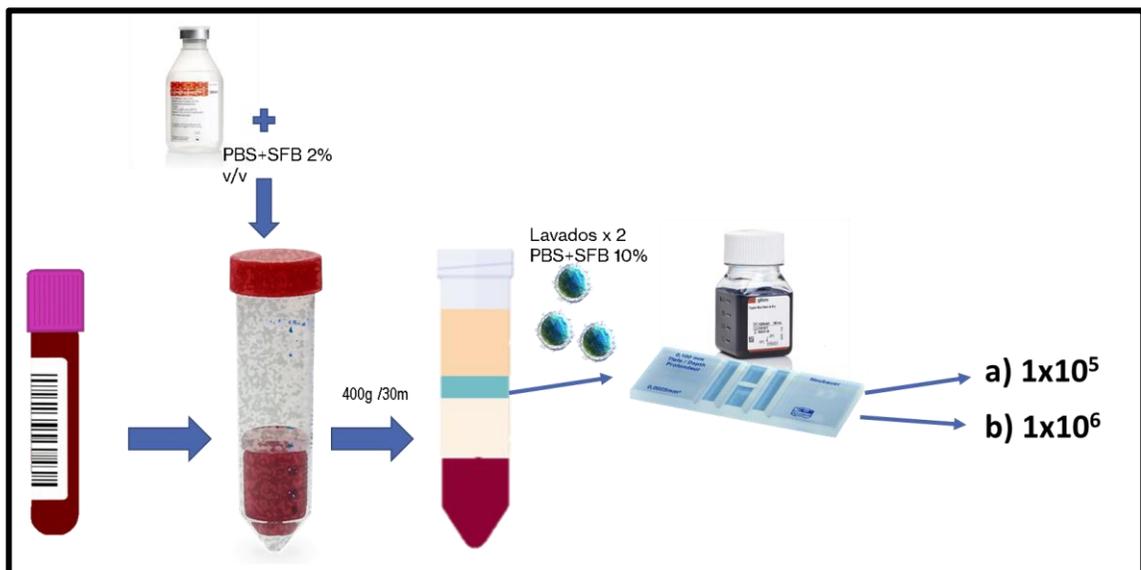


Figura 1. Proceso de aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica canina; a) cantidad de células utilizada para la titulación de cada anticuerpo, b) cantidad de células requerida para llevar a cabo el análisis del panel completo.

### 6.2.2 Panel de anticuerpos

En el cuadro 4 se observan los anticuerpos utilizados en el panel para el reconocimiento de las diferentes subpoblaciones de linfocitos. Debido a las interacciones reportadas por el fabricante,

los anticuerpos anti-CD3 clona CA17.2A12, (Bio-Rad; Hercules, CA, EUA) y anti-CD21 clona CA2.1D6 (Bio-Rad; CA, EUA) no pueden utilizarse de manera conjunta, por lo que cada muestra fue dividida en dos tubos. El tubo 1 contuvo los anticuerpos Anti-CD3 (CA17.2A12), Anti CD4 clona YKIX302.9 (Bio-Rad; CA, EUA), Anti-CD5 (YKIX322.3), Anti-CD8 clona YCATE55.9 (Bio-Rad; CA, EUA), Anti-CD25 clona P4A10 (eBioscience, San Diego, CA, EUA) y anti-Foxp3 clona FJK-16s (eBioscience, CA, EUA), con la finalidad de identificar las subpoblaciones de linfocitos T y células NK like. En el tubo 2 sólo se utilizaron dos anticuerpos para poder identificar a los linfocitos B: Anti-CD21 (CA2.1D6) y anti-CD5 (YKIX322.3). Para observar la viabilidad de las células mononucleares se utilizó la tinción de viabilidad LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain (Carlsbad, CA, EUA).

Anticuerpo/ tinción	Fluorocromo	Clona	Catálogo	Referencia
Anti-CD3 *	FITC	CA17.2A12	MA5-16605	(67)
Anti -CD4*	PE-Cy7	YKIX302.9	25-5040-42	(68)
Anti-CD8*	eFluor 450	YCATE55.9	48-5080-42	(67)
Anti-CD25*	eFluor 660	P4A10	50-0250-42	(69)
Anti-Foxp3*	eFluor 506	FJK-16s	12-5773-82	(70)
Anti-CD21**	PE	CA2.1D6	MA5-16609	(67)
Anti-CD5**	PerCP-eFluor 710	YKIX322.3	46-5050-42	(64)
LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain	-	-	L23105	-

Cuadro 4: anticuerpos y tinción de viabilidad utilizados en esta prueba. \*=tubo 1; \*\*=tubo2

### 6.2.3 Titulación de anticuerpos

La titulación de anticuerpos se realizó para obtener la concentración mínima necesaria, capaz de discriminar la señal de fluorescencia que emiten las células que expresan un antígeno, de aquellas que no lo expresan, lo que permitió determinar la razón entre la intensidad de fluorescencia de la tinción y las uniones inespecíficas (71). Para ello se realizó el siguiente procedimiento: primero se realizó una dilución doble seriada de cada anticuerpo (a partir de una dilución inicial 1:10) para obtener 5 tubos con las diluciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 en un volumen de 20 µL. Posteriormente se agregó la suspensión celular con un volumen de 20 µL y una concentración de  $4 \times 10^5$  células (Figura 2).

### 6.2.4 Inducción de células T reguladoras.

Debido a la baja expresión de las células T reguladoras para realizar la titulación de CD25 y Foxp3 se cultivaron las células mononucleares aisladas de sangre periférica en placas de fondo redondo de 96 pocillos en medio completo que contenía 5 µg / ml de concanavalina A (Con A; Sigma Aldrich). Las placas se incubaron en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5% con una temperatura de 37 °C. A las 72 horas, las células se lavaron y se tiñeron para el análisis de citometría de flujo (72).

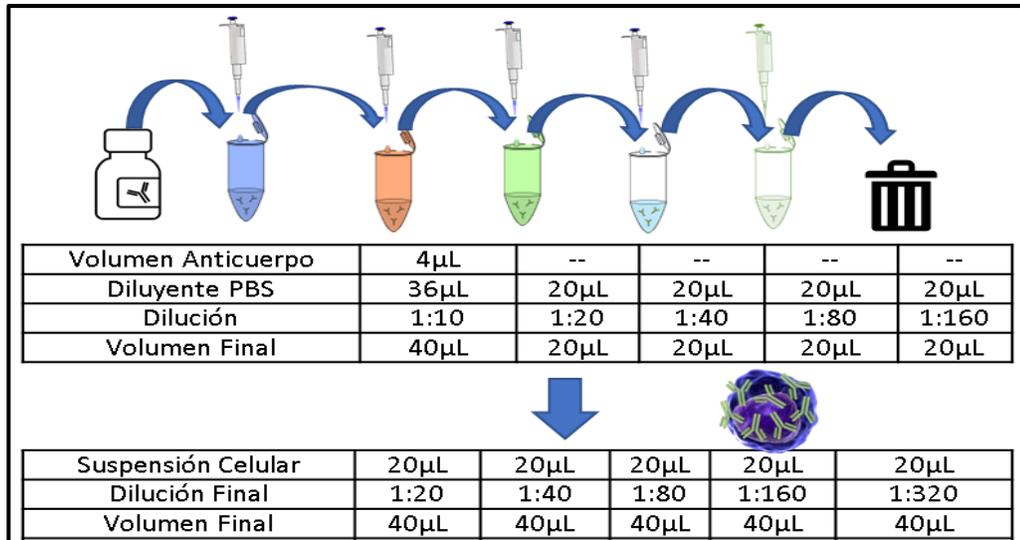


Figura 2: ejemplo del proceso realizado para la titulación realizada en las tinciones del presente trabajo

### 6.3 Pacientes

Después de la estandarización del panel, se reclutaron pacientes clínicamente sanos y perros diagnosticados con linfoma. El grupo control estuvo compuesto por 10 perros de razas mixtas, ambos sexos, clínicamente sanos de 2 a 6 años ( $4.2 \pm 1.1$ ), sin historia de enfermedades concomitantes y cuadro de vacunación y desparasitación completo y vigente. Para las muestras problema, se reclutaron tres perros: dos hembras y un macho, de razas Schnauzer, Corgi y Lhasa Apso de 11, 10 y 12.5 años respectivamente ( $11.2 \pm 1.3$ ), los tres con diagnóstico citológico de linfoma, sin historia de enfermedades concomitantes ya sea metabólicas, neoplásicas o infecciosas. Ninguno de los tres perros había comenzado con el tratamiento quimioterapéutico. Los datos de todos los pacientes se encuentran en el Cuadro 5.

### 6.4 Obtención de muestras sanguíneas

Para la realización de las pruebas en ambos grupos se extrajeron de 2 a 5 mL de sangre de la vena yugular en tubos con anticoagulante EDTA. Este muestreo se realizó con la aprobación del comité interno para el cuidado y uso de los animales de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia (CICUA-FMVZ).

### 6.5 Procesamiento de muestras

Las CMSP se separaron con gradiente de densidad lymphoprep de la misma manera como se describió anteriormente en el apartado 5.1.1, se revisó la viabilidad de las células con azul de tripano y la concentración celular se ajustó a  $1 \times 10^6$  de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Las células se prepararon en dos tubos y cada uno se ajustó a una concentración celular de  $1 \times 10^6$ . A ambos se les agregó la tinción de viabilidad LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain. Con la finalidad de conseguir homogeneidad en el tratamiento de la muestra las células de ambos tubos

fueron sometidas a permeabilización durante 16 horas (Permeabilization Buffer 10X eBioscience™), aun cuando el tubo 2 no contenía el anticuerpo Fcγ3.

### 6.6 Obtención y análisis de datos

Los datos fueron obtenidos mediante el equipo Cytoflex-S N2-V3-B5-R3 (Beckman Coulter, CA, EUA), tomando 10,000 eventos de cada muestra; el análisis de los datos de citometría de flujo se realizó con el software Flowjo (Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA).

### 6.7 Análisis estadístico

Mediante el software estadístico Prism GraphPad 8 se analizó la distribución de los porcentajes de cada subconjunto de linfocitos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se compararon las diferencias entre los grupos de estudio mediante la prueba T de student, se consideraron estadísticamente significativos los resultados de  $p < 0.05$ .

**Cuadro 5:** datos de cada paciente, en la presente lista se encuentran tanto el grupo control (perros sanos) como los perros diagnosticados con linfoma.

Pacientes							
Grupo control				Perros con Linfoma			
ID	Raza	Edad	Sexo	ID	Raza	Edad	Sexo
IS1	Mestizo	4 a	He	L1	Schnauzer	11a	H
IS2	Mestizo	4 a	Mc	L2	Corgi	10a	H
IS3	Mestizo	5 a	Mc	L3	Lhasa Apso	12.5a	M
IS4	Pitbull	5a	Mc				
IS5	Cobrador de Labrador	4a	M				
IS6	Pastor Alemán	5a	H				
IS7	Pitbull	6a	M				
IS8	Mestizo	3a	Mc				
IS9	Mestizo	4a	Mc				
IS10	Mestizo	2a	He				

**Abreviaturas:** IS, individuo sano; L, linfoma; H, hembra; M, macho; He, esterilizada; Mc, macho castrado; a, años

## 7. Resultados

### 7.1 Titulación de anticuerpos

De las diluciones anteriormente descritas (sección 6.4) se obtuvieron las concentraciones adecuadas de anticuerpos y tinción de viabilidad para llevar a cabo la inmunofenotipificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos caninos. Los resultados con la dilución utilizada, la cantidad de reactivo y concentración de anticuerpo/tinción se muestran en el Cuadro 5.

**Cuadro 6.** Diluciones y concentraciones finales utilizadas para la tinción del panel

Anticuerpo/ tinción	Fluorocromo	Dilución	µL de Ac	Concentración final
Anti-CD3 *	FITC	1:20	5	0.05µg
Anti -CD4*	PE-Cy7	1:160	0.63	0.01µg
Anti-CD8*	eFluor 450	1:160	0.63	0.06µg
Anti-CD25*	eFluor 660	1:20	5	0.125µg
Anti-Foxp3*	eFluor 506	1:40	2.5	0.05 µg
Anti-CD21**	PE	1:20	5	0.05µg
Anti-CD5*/**	PerCP-eFluor 710	1:160	0.63	0.01µg
LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain	-	1:1000	0.1	-

### 7.2 Estrategia de análisis

La estrategia de análisis comenzó de la misma manera en ambos tubos, buscando que las células que se tomaran en un correcto flujo y además tuvieran las características de complejidad y tamaño típicas de los linfocitos, posteriormente el análisis se realizó de acuerdo con las subpoblaciones que se buscaban en cada tubo. En el tubo 1 se realizó una estrategia basada en las subpoblaciones de linfocitos T y NK like basada en el anticuerpo anti-CD3: de los linfocitos T CD3+, se buscaron cuatro subpoblaciones, células que coexpresaban la molécula CD5<sup>dim</sup> (células NK like), CD8 (linfocitos T citotóxicos) y CD4 (linfocitos T cooperadores); de los linfocitos T CD3+/CD4+ se obtuvo una subpoblación más CD3+/CD4+/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>high</sup> (linfocitos T reguladores). El tubo 2 solo contenía dos anticuerpos para poder identificar a linfocitos B (CD21+CD5-). La estrategia de análisis se encuentra resumida en la Figura 3.

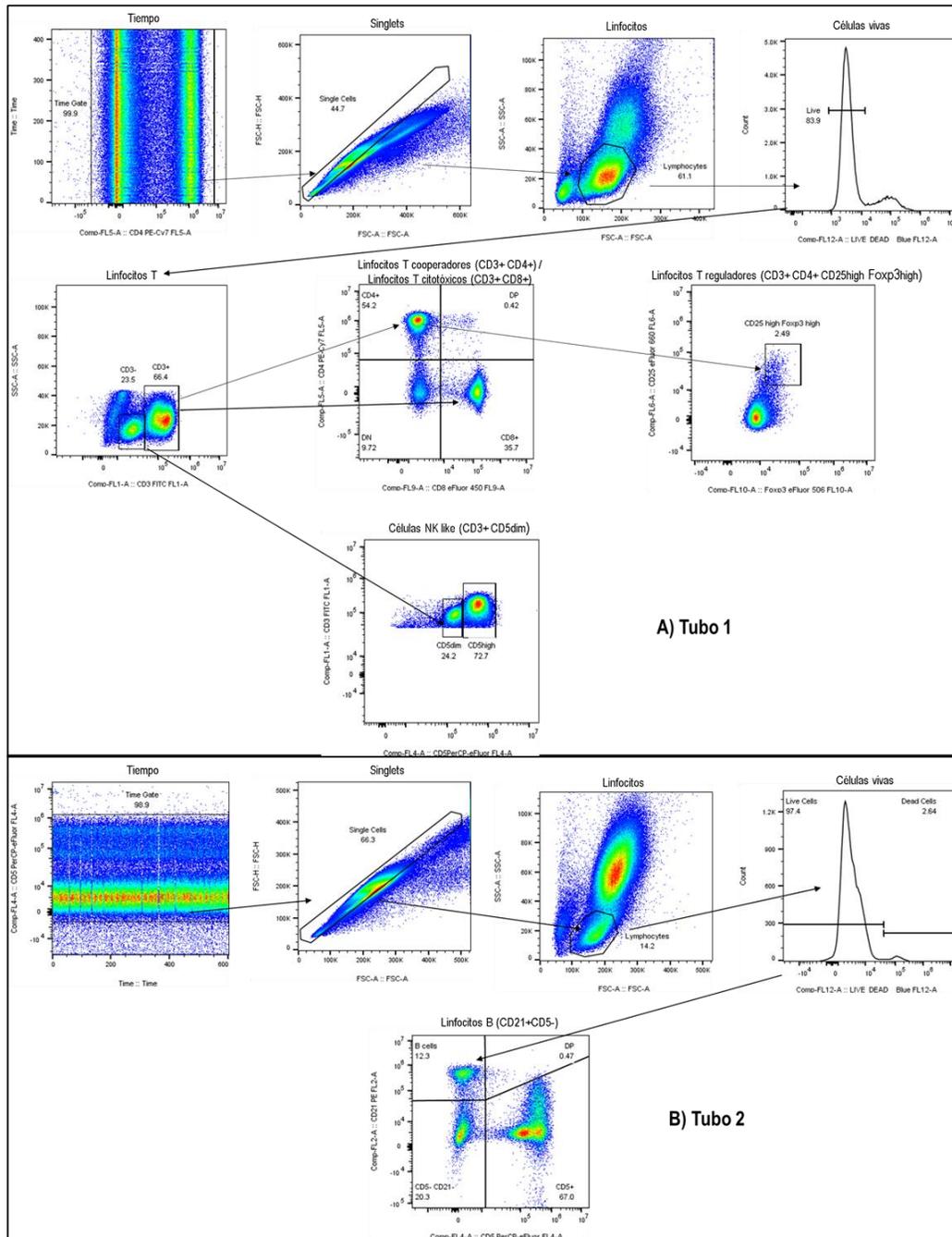


Figura 3. Estrategia de análisis para la identificación de subconjuntos de linfocitos T (cooperadores, T citotóxicos, T reguladores) y células NK like (A) y linfocitos B (B).

### 7.3 Distribución de subpoblaciones de linfocitos de interés en grupo control

Los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos en las muestras control fueron los siguientes: linfocitos T  $61.52 \pm 11.9\%$  (CD3+), linfocitos T cooperadores  $32.62 \pm 8.3\%$  (CD3+ CD4+), linfocitos

T citotóxicos  $20.87 \pm 7.1\%$  (CD3+CD8+), linfocitos T reguladores  $0.90 \pm 0.2\%$  (CD3+CD4+CD25highFoxp3high), células NK like  $14.11 \pm 8.2\%$  (CD3+CD5dim), linfocitos B  $25.33 \pm 7.1\%$  (CD21+CD5-) y un radio CD4/CD8 de 1.5. Figura 4

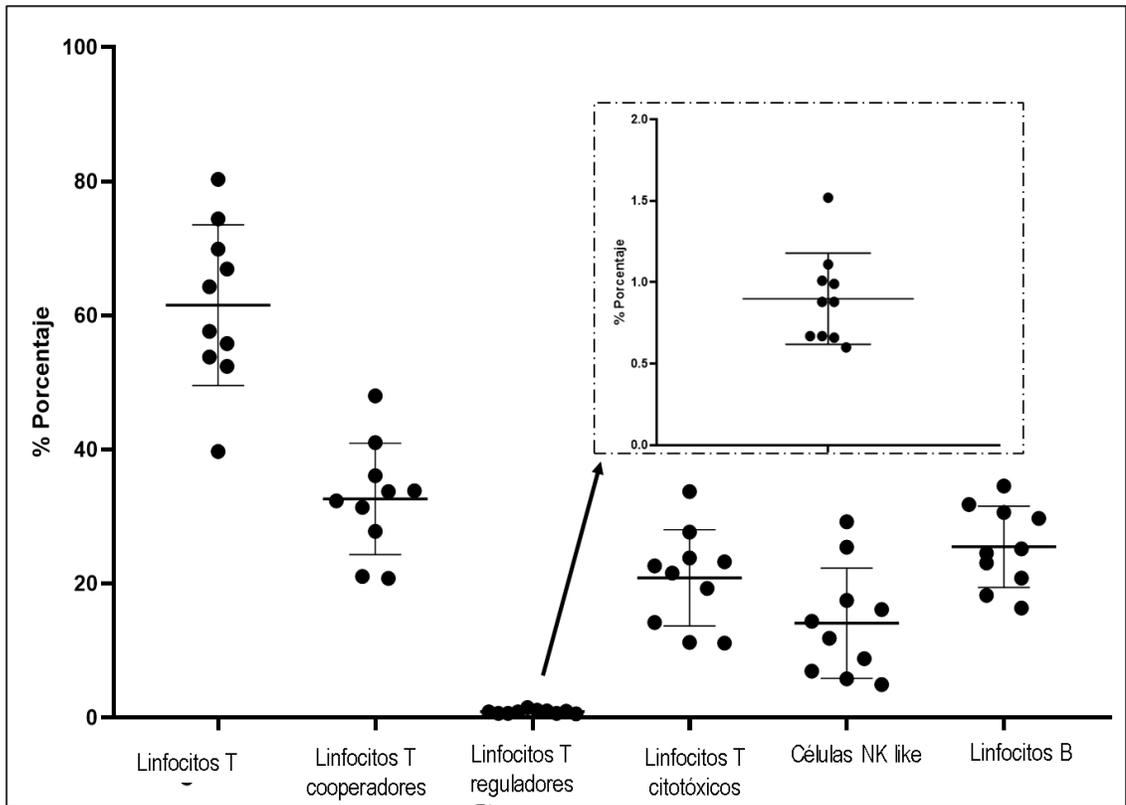


Figura 4: porcentajes obtenidos de las subpoblaciones de linfocitos T, NK like y B en el grupo control.

#### 7.4 Distribución de subpoblaciones de linfocitos de interés en perros con linfoma

En los perros con linfoma, los porcentajes fueron los siguientes: linfocitos T  $30.83 \pm 28.63\%$  (CD3+), linfocitos T cooperadores  $51.80 \pm 17.09\%$  (CD3+ CD4+), linfocitos T citotóxicos  $26.72 \pm 20.57\%$  (CD3+CD8+), linfocitos T reguladores  $8.5 \pm 8.5\%$  (CD3+CD4+CD25highFoxp3high), células NK like  $6.0 \pm 2.2\%$  (CD3+CD5dim) y linfocitos B  $46.8 \pm 45.1\%$  (CD21+CD5-) y un radio CD4/CD8 de 1.9. Figura 5

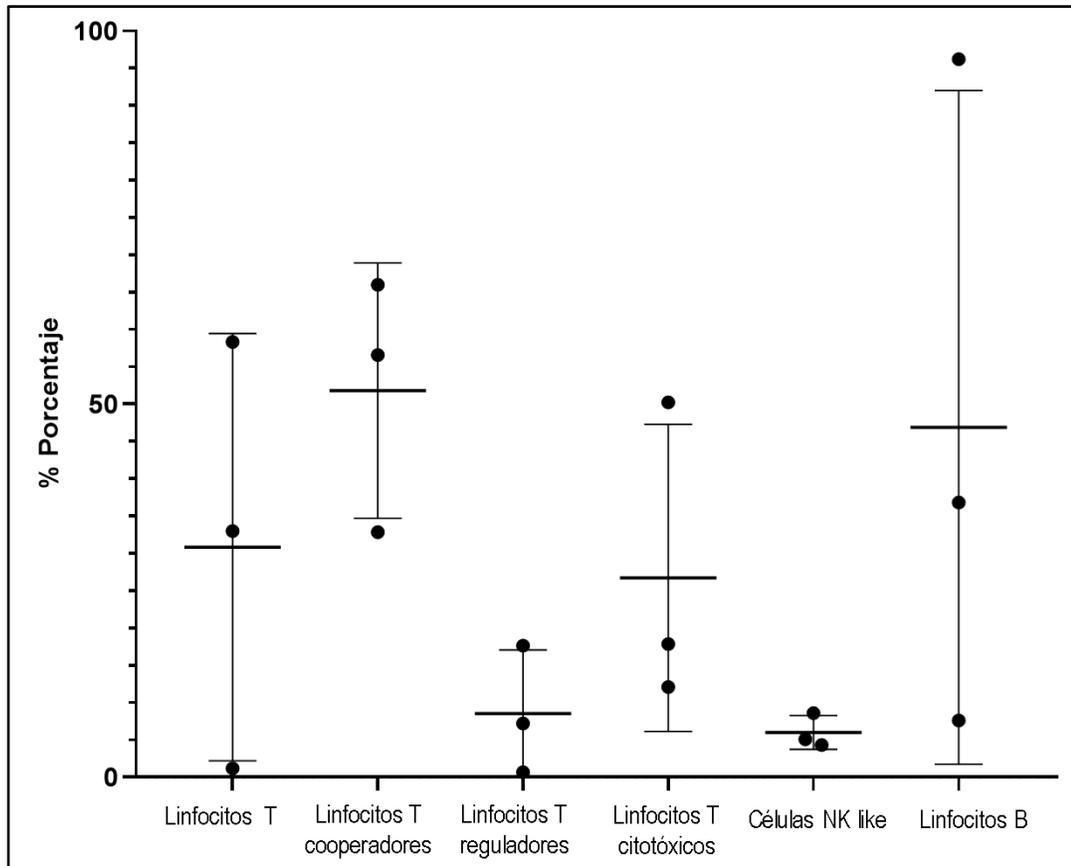


Figura 5: porcentajes obtenidos de las subpoblaciones de linfocitos T, NK like y B en los perros con linfoma.

### 7.5 Análisis estadístico

En la comparación de los porcentajes de células CD3+ entre el grupo control  $61.52 \pm 11.9\%$  vs. los perros con linfoma  $30.83 \pm 28.63\%$  no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.1$ ), al igual que en las células CD3+CD4+ ( $P = 0.1$ ), sin embargo se observa una tendencia al incremento de esta subpoblación teniendo en cuenta los perros saludables  $32.62 \pm 8.3\%$  contra los perros con linfoma  $51.80 \pm 17.09\%$ , dicha tendencia al incremento también se observa en los linfocitos T reguladores de los perros con linfoma ( $0.90 \pm 0.2\%$  vs.  $8.5 \pm 8.5\%$ ) aunque tampoco fueron significativos ( $P = 0.2$ ).

En las poblaciones de células efectoras, se observó una tendencia al aumento de porcentaje de linfocitos T citotóxicos  $26.72 \pm 20.57\%$  de perros con linfoma contra los controles sanos  $20.87 \pm 7.1\%$  sin diferencias estadísticas significativas ( $P = 0.6$ ), por otra parte las células NK like obtuvieron diferencias significativas ( $P = 0.01$ ) donde se encontró una disminución de esta subpoblación  $6.0 \pm 2.2\%$  en perros con linfoma en comparación con los perros sanos  $14.11 \pm 8.2\%$ .

En cuanto al ratio CD4/CD8 se observa un incremento (1.9) en perros con linfoma vs perros sanos (1.5). Finalmente, los linfocitos B tienden a incrementar en perros con linfoma  $46.8 \pm 45.1\%$  en

comparación con los perros sanos ( $25.33 \pm 7.1$ ), sin diferencias estadísticas significativas ( $P=0.4$ ); En la figura 6 se muestran los resultados del análisis estadístico. Es importante considerar que es posible que las diferencias estadísticas significativas en la mayoría de las subpoblaciones no se encuentren presentes debido a la n reducida.

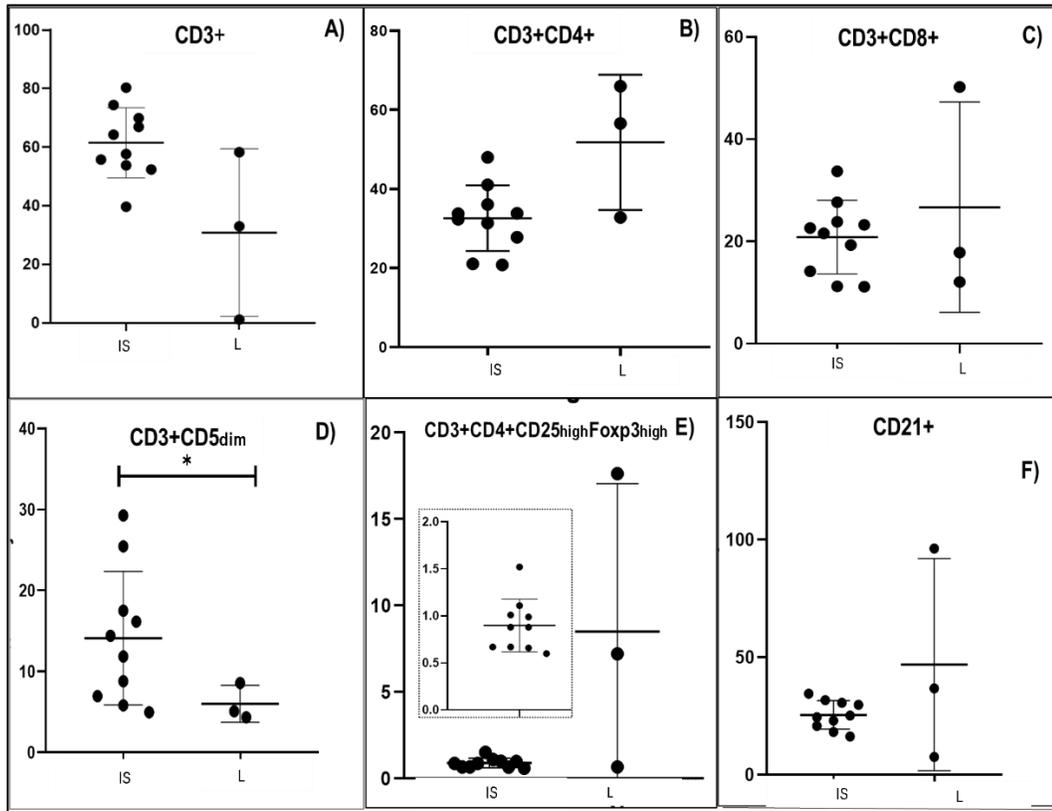
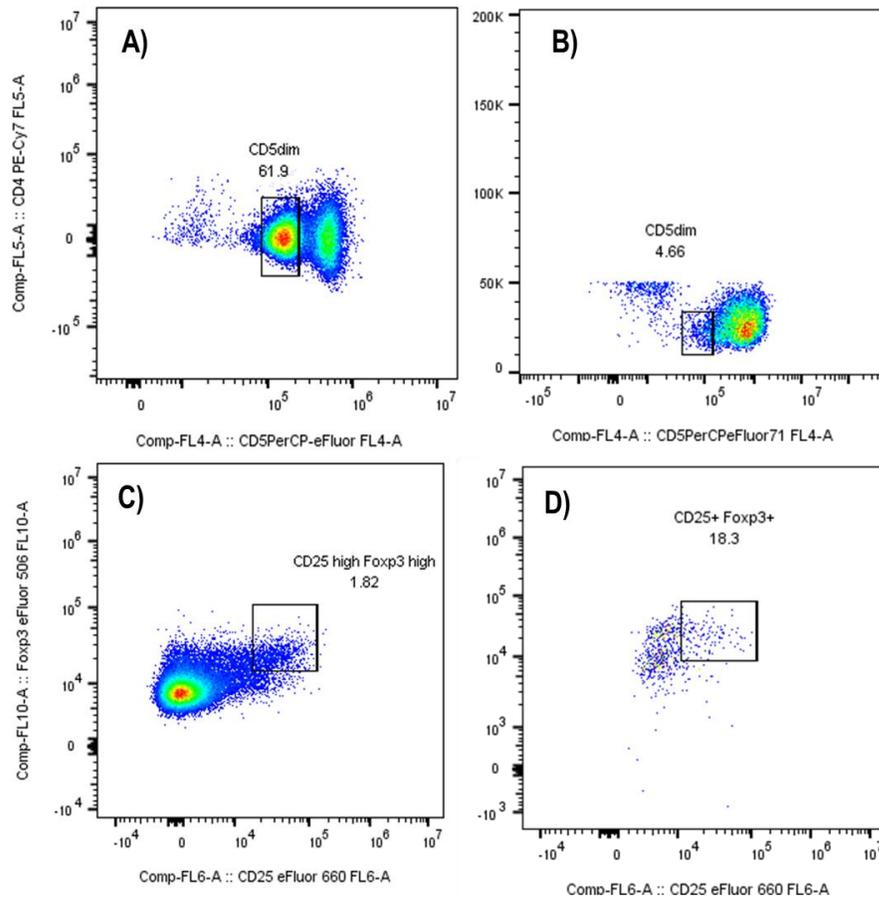


Figura 6. Comparación entre los porcentajes obtenidos de subpoblaciones de linfocitos en el grupo control y los perros con linfoma mediante prueba T de Student. IS=individuos sanos / L= perros con linfoma. A). Linfocitos T (CD3+); B) LTh (CD3+/CD4+); C) Linfocitos T citotóxicos (CD3+/CD8+); D) Células NK like (CD3+CD5<sup>dim</sup>); E) Tregs (CD3+/CD4+/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>high</sup>; F) Linfocitos B (CD21+/CD5-).



**Figura 7. Comparación de subpoblaciones de linfocitos en un Dot Plot representativo. A) subpoblación de células NK like (CD3+ CD5dim) en individuo sano; C) subpoblación de células Treg en individuo sano; B) Subpoblación de células NK like de paciente con linfoma; D) subpoblación de células Treg en paciente con linfoma.**

## 8. Discusión

En el presente trabajo se encontró que los perros con linfoma tienen cambios importantes en la distribución de sus subpoblaciones de linfocitos, en comparación con los perros sanos. Estos son: el incremento en los T reguladores y los linfocitos T cooperadores, así como la disminución de linfocitos T citotóxicos y las NK like.

En el presente estudio observó una disminución de las células NK like ( $6.0 \pm 2.2\%$ ) en comparación con los perros sanos ( $14.11 \pm 8.2\%$ ). En humanos existen pocos estudios con respecto a las células NK en pacientes con LNH y su disminución está principalmente relacionada a un mal pronóstico (61,73). Si bien no existen reportes sobre el comportamiento de esta población en perros con linfoma, nuestro hallazgo apunta a que es un comportamiento semejante al de humanos. Estudiar con mayor amplitud estas poblaciones en perros con linfoma podría ayudar a comprender mejor su comportamiento en estos pacientes. Respecto a las células NK en humanos con este tipo de

neoplasias, se ha reportado que además de disminuir en cantidad, su función se ve afectada por citocinas secretadas por las células B neoplásicas (74), por lo que sería interesante evaluar esto en pacientes caninos.

Anteriormente se ha informado que el incremento de linfocitos T reguladores (CD3+CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>high</sup>) en sangre periférica es un hallazgo común tanto en perros como en humanos con linfoma. En un estudio realizado por Munnoz et al., en perros con linfoma multicéntrico se encontró un incremento de esta subpoblación  $18,84 \pm 2,56$  en comparación con el grupo control  $4,70 \pm 0,50$  (57). En humanos, en un estudio realizado por Cao et al., los pacientes con NHL tuvieron incremento considerable de células T reguladoras  $8.35 \pm 1.43\%$  comparado con el grupo control  $1.98 \pm 0.44\%$  antes de la quimioterapia (56). Ambos estudios son consistentes con los resultados obtenidos en este trabajo donde hubo una tendencia al aumento de esta subpoblación en pacientes con linfoma  $8.5 \pm 8.5\%$  en comparación con los perros saludables  $0.90 \pm 0.2$ . Se ha demostrado que un aumento en las células Treg está relacionado con un mal pronóstico; además, durante el proceso terapéutico la disminución de esta subpoblación está asociada a una buena respuesta al tratamiento. Si bien este estudio no incluyó perros en tratamiento, este abre la posibilidad de que los clínicos del país puedan hacer el seguimiento en sus pacientes, empleando la citometría de flujo con las condiciones ya evaluadas en nuestro grupo de trabajo.

En un estudio realizado por Shin et al., en humanos se informó que un incremento de linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+)  $\geq 47.9\%$  está relacionado a un mal pronóstico y a un menor tiempo libre de enfermedad posterior al tratamiento (75). Este cambio concuerda con los hallazgos en los perros con linfoma reclutados en este estudio que presentan un porcentaje de Th mayor en perros con linfoma ( $51.80 \pm 17.09\%$ ) que el grupo control ( $32.62 \pm 8.3\%$ ).

Los linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+) pueden tener diversos cambios en cuanto a la edad y al estado inmunológico de los pacientes con linfoma; en humanos, el incremento de linfocitos T cooperadores y T reguladores en sangre periférica está relacionado con una disminución de los linfocitos CD8+, lo cual está relacionado a un mal pronóstico (75). Esto se debe principalmente a las citocinas antiinflamatorias secretadas por las células reguladoras, ya que afectan no sólo a la función citotóxica, sino a la replicación de esta subpoblación (54). Sin embargo, es importante considerar que en perros de mayor edad puede haber un aumento en el porcentaje de los linfocitos T citotóxicos, así como una disminución en la relación de linfocitos T CD4/CD8 (76). Los resultados del presente estudio un incremento de la subpoblación de linfocitos T CD8+ en uno de los tres pacientes con linfoma, mientras que en los otros dos disminuyen, en comparación con la media encontrada en los perros sanos ( $20.87 \pm 7.1\%$ ). Si analizamos la relación CD4/CD8 de los perros con linfoma (1.9), frente a los controles (1.5), podría indicar una menor cantidad de linfocitos T citotóxicos y un aumento en la subpoblación de linfocitos T CD4+, esto sería concordante con el aumento de las células T reguladoras de los pacientes con linfoma.

Se observó un aumento considerablemente marcado de linfocitos B en uno de los pacientes. Sin embargo, hay que de considerar que este presentó una linfocitosis exacerbada, posiblemente asociada a la infiltración de células neoplásicas en médula ósea y sangre periférica. Dicho hallazgo puede empeorar el pronóstico de acuerdo con el grado de infiltración (77).

Podemos concluir que los perros con linfoma analizados en este estudio muestran cambios en las poblaciones de linfocitos en comparación con los controles sanos. Esto podría tener relevancia clínica, teniendo en cuenta informes anteriores realizados en humanos y caninos. Sin embargo, sería necesario aumentar la población de estudio ya que el trabajar únicamente con tres pacientes limita la posibilidad de hacer un análisis estadístico más robusto. Además, sería importante realizar un estudio integral con medición de citocinas y otras funciones celulares, así como buscar la posibilidad de dar seguimiento a los pacientes para poder llegar a una mejor comprensión de la respuesta inmunológica de perros con linfoma.

Respecto a los porcentajes obtenidos en las poblaciones de linfocitos de perros sanos en el presente estudio son comparables con otros reportes, por lo que consideramos que la estrategia utilizada es adecuada para continuar con el análisis en perros con linfoma. Es importante destacar que hay diferencias entre los pacientes, las combinaciones de anticuerpos y la metodología utilizadas en los diferentes estudios además de que ninguno emplea un panel similar al empleado en este trabajo.

En este estudio se obtuvieron  $61.52 \pm 11.9\%$  (CD3+),  $32.62 \pm 8.3\%$  (CD3+CD4+),  $20.87 \pm 7.1\%$  (CD3+CD8+), relación CD4/CD8 1.5 y  $25.33 \pm 7.1$  (CD21+CD5-); mientras que Platt et al., obtuvieron porcentajes de  $74 \pm 6.4$  (CD3+),  $43.6 \pm 6.2$  (CD4 +),  $14.3 \pm 4.0$  (CD8 +), relación CD4/CD8 de 3.0 y  $9.6 \pm 2.6$  (CD21 +) utilizando perros Beagles de 6 meses (67). Esta diferencia entre los porcentajes de células T CD4 y TCD8 respecto a nuestro estudio, puede deberse a la edad de nuestros donadores (perros mayores de 1 año) ya que se ha reportado una disminución en la relación CD4 y CD8 a partir del año, lo cual concuerda con lo reportado por Faldyna et al., (76). Por otra parte, en este estudio no se observó una disminución de linfocitos T CD21 en los perros adultos.

Comparando con los resultados obtenidos por Byrne., et al:  $81.2 \pm 3.7$  (CD3+),  $41.7 \pm 9.0$  (CD4+),  $28.6 \pm 10.0$  (CD8+), 1.74 (relación CD4/CD8),  $15.4 \pm 3.9$  (CD21) en perros de 3.5 años de raza mixta y  $79.5 \pm 1.5$  (CD3+),  $30.9 \pm 8.7$  (CD4+),  $18.9 \pm 8$  (CD8+), 2.2 (relación CD4/CD8),  $13.8 \pm 2.5$  (CD21+) en perros de 9 años de raza mixta (78), se puede observar que el utilizar una o más razas de perros no influye en la distribución de los linfocitos, sin embargo, si podrían haber con respecto a la edad como se discutió anteriormente.

El porcentaje de linfocitos T reguladores obtenido en este estudio  $0.90 \pm 0.2\%$  (CD3+CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>high</sup>) es reducido respecto a otros reportes, por ejemplo Platt., et al obtuvo  $2.9 \pm 0.6\%$  en perros de 6 meses (67), mientras Anai et al., obtuvo  $4.7 \pm 0.5\%$  en perros adultos de 6,5±2,9 años (79).

Los porcentajes de los linfocitos NK like caninas en sangre periférica no se han estudiado a profundidad en estado basal. Sin embargo, el porcentaje obtenido  $14.11 \pm 8.2\%$  (CD3+CD5<sup>dim</sup>) es consistente con lo reportado por Huang., et al:  $14.9 \pm 6.68\%$  (64).

Finalmente es importante mencionar algunas diferencias con respecto a los métodos utilizados para el presente trabajo: el fabricante menciona que los anticuerpos anti-CD3 (CA17.2A12) y anti CD21 (CA2.1D6) no deben ser utilizados de manera conjunta, dato que pudimos corroborar en ensayos previos a la realización del panel en conjunto, en el que no fue posible diferenciar ambas poblaciones. Esto difiere de lo reportado por Platt., et al (67) y Yagihara., et al (80) que informaron no haber presentado esta interacción en sus análisis de citometría, a excepción de unas pocas células CD21+ que coexpresaban el marcador CD4 (6.0% de células CD21+ y 0.5% del total de linfocitos) (67); por otra parte cabe mencionar que la identificación de las células Treg en este estudio se realizó de manera más completa al utilizar los anticuerpos anti-CD25 y anti-Foxp3 a diferencia de Muhnoz., et al no utilizó el anticuerpo CD25, sólo el anti-Foxp3, mientras Anai., et al no utilizó el anticuerpo Anti-Foxp3 (57,79).

## 9. Conclusiones

1.- El panel de anticuerpos utilizado para el presente proyecto mostró tener resultados consistentes con otros informes similares, tanto en perros saludables como en pacientes con linfoma, por lo que puede ser una opción diagnóstica para perros adultos.

2.- Se observaron cambios en las poblaciones de linfocitos en los pacientes con linfoma en comparación con los controles sanos, principalmente una tendencia a la disminución de las células NK like y una tendencia al incremento en las células T reguladoras. Esto podría tener relevancia clínica, teniendo en cuenta informes anteriores realizados en humanos y caninos.

## 10. Prospectivas

Ante las limitantes del presente trabajo es de considerarse realizar un estudio integral con una n superior que incluya la clasificación y estadificación del linfoma, medición de citocinas relevantes, la medición de la capacidad citotóxica de células efectoras, así como incluir el seguimiento a los pacientes con linfoma para monitorear los cambios que pueden ser producto del tratamiento, de esta manera se podrían identificar con mayor facilidad factores pronósticos y/o marcadores asociados a la respuesta al tratamiento.

## 11. Bibliografía

1. Meng X, Zhong J, Liu S, Murray M, Gonzalez-Angulo AM. A new hypothesis for the cancer mechanism. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2012;31(1-2):247-68.
2. Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun*. 2018;9(1).

3. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* (1979). 2013;340(6127):1546–58.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
6. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31–46.
7. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;0(0):1–41.
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
9. Reynoso-Noverón N, Torres-Domínguez JA. Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual* [Internet]. 2018;8(1):9–15. Available from: [www.r-proyect.org](http://www.r-proyect.org)
10. INEGI. COMUNICADO DE PRENSA NÚM . 105 / ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER. In 2021. Available from: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf)
11. Gardner HL, Fenger JM, London CA. Dogs as a Model for Cancer. *Annu Rev Anim Biosci*. 2016;4(1):199–222.
12. Ostrander EA, Dreger DL, Evans JM. Canine Cancer Genomics: Lessons for Canine and Human Health. *Annu Rev Anim Biosci*. 2019;7:449–72.
13. Doherty A, Lopes I, Ford CT, Monaco G, Guest P, de Magalhães JP. A scan for genes associated with cancer mortality and longevity in pedigree dog breeds. *Mammalian Genome* [Internet]. 2020;31(7–8):215–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00335-020-09845-1>
14. Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT. Epidemiologic Studies of Risk Factors for Cancer in Pet Dogs [Internet]. Vol. 20. 1998. Available from: <http://epirev.oxfordjournals.org/>
15. Seelig DM, Avery AC, Ehrhart EJ, Linden MA. The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma. *Vet Sci*. 2016;3(2).
16. Dhaliwal RS, Kitchell BE, Messick JB. Canine lymphosarcoma: Clinical features. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 2003;25(8):572–82.
17. Pastor M, Marchal T, Keck G, Magnol JP, Ponce F. Genetic and Environmental Risk Indicators in Canine Non - Hodgkin's Lymphomas: Breed Associations and Geographic Distribution of 608 Cases Diagnosed throughout France over 1 Year. *J Vet Intern Med*. 2009;301–10.
18. Wartewig T, Ruland J. PD-1 Tumor Suppressor Signaling in T Cell Lymphomas. *Trends Immunol* [Internet]. 2019;40(5):403–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.03.005>

19. Juszczynski P, Nowak J, Warzocha K. Host immune response in B-cell lymphomas: Friend or foe? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008;56(4):245–55.
20. Xiong J, Cui BW, Wang N, Dai YT, Zhang H, Wang CF, et al. Genomic and Transcriptomic Characterization of Natural Killer T Cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 2020 Mar 16;37(3):403–419.e6.
21. Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet* [Internet]. 2017;390(10091):298–310. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32407-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32407-2)
22. Villamil JA, Henry CJ, Hahn AW, Bryan JN, Tyler JW, Caldwell CW. Hormonal and Sex Impact on the Epidemiology of Canine Lymphoma. *J Cancer Epidemiol*. 2009;2009:1–7.
23. Vail, David M. Pinkerton Marie, Young KM. Hematopoietic Tumors. In: *Small Animal Clinical Oncology*. 6th ed. 2020. p. 688–772.
24. Ansell SM. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd; 2015. p. 1152–63.
25. Evens AM, Ronald Gartenhaus DB. Treatment of T-cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2004;5:289–303.
26. Suzuki R. NK/T-cell lymphomas: Pathobiology, prognosis and treatment paradigm. *Curr Oncol Rep*. 2012 Oct;14(5):395–402.
27. Li F, Chen Y, Pang M, Yang P, Jing H. Immune checkpoint inhibitors and cellular treatment for lymphoma immunotherapy. Vol. 205, *Clinical and Experimental Immunology*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 1–11.
28. Impellizeri JA, Gavazza A, Greissworth E, Crispo A, Montella M, Ciliberto G, et al. Tel-eVax: A genetic vaccine targeting telomerase for treatment of canine lymphoma. *J Transl Med*. 2018 Dec 11;16(1).
29. Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Hernaiz-Leonardo JC, Moreno-Aguilera E, Monteverde-Suarez D, Vera-Aguilera C, et al. The Synthetic Parasite-Derived Peptide GK1 Increases Survival in a Preclinical Mouse Melanoma Model. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013 Nov 1;28(9):682–90.
30. Torres-García D, Pérez-Torres A, Manoutcharian K, Orbe U, Servín-Blanco R, Fragoso G, et al. GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model. *Vaccine*. 2017 Oct 9;35(42):5653–61.
31. Pérez-Tapia S, Vallejo-Castillo L, López-Morales C, Mellado-Sánchez G, Pavón L, Nieto-Patlán A, et al. Transferon® in 2020. *Revista bio ciencias*. 2020;7.
32. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10.
33. Finn OJ. Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology*. 2012;23(SUPPL.8):8–11.
34. Lussier DM, Schreiber RD. Cancer Immun-surveillance: Immunoediting [Internet]. Vol. 4, *Encyclopedia of Immunobiology*. Elsevier; 2016. 396–405 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.17001-8>

35. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* (1979). 2011;331(6024):1565–70.
36. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(1):235–71.
37. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2019;37(1):457–95.
38. Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol*. 2016;28(8):401–9.
39. Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(8):662–74.
40. Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon- $\gamma$  in cancer. Vol. 17, *Clinical Cancer Research*. 2011. p. 6118–24.
41. Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 Balance by Stat3 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2009 Feb 3;15(2):114–23.
42. Curran EK, Godfrey J, Kline J. Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. *Trends Immunol* [Internet]. 2017;38(7):513–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.04.004>
43. Khurana A, Ansell SM. Role of microenvironment in non-hodgkin lymphoma: Understanding the composition and biology. *Cancer Journal (United States)*. 2020;26(3):206–16.
44. Che F, Heng X, Zhang H, Su Q, Zhang B, Chen Y, et al. Novel B7-H4-mediated crosstalk between human non-Hodgkin lymphoma cells and tumor-associated macrophages leads to immune evasion via secretion of IL-6 and IL-10. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2017;66(6):717–29.
45. Tiemann M, Samoilova V, Atiakshin D, Buchwalow I. Immunophenotyping of the PD-L1-positive cells in angioimmunoblastic T cell lymphoma and Hodgkin disease. *BMC Res Notes* [Internet]. 2020;13(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04975-w>
46. Ribatti D. Mast cells in lymphomas. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2016;101:207–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.016>
47. Han Y, Wu J, Bi L, Xiong S, Gao S, Yin L, et al. Malignant B cells induce the conversion of CD4 +CD25 - T cells to regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *PLoS One*. 2011;6(12):4–13.
48. Vendrame E, Martínez-Maza O. Assessment of pre-diagnosis biomarkers of immune activation and inflammation: Insights on the etiology of Lymphoma. *J Proteome Res*. 2011;10(1):113–9.
49. Gu Y, Shore RE, Arslan AA, Koenig KL, Liu M, Ibrahim S, et al. Circulating cytokines and risk of B-cell non-Hodgkin lymphoma: A prospective study. *Cancer Causes and Control*. 2010;21(8):1323–33.
50. Dlouhy I, Filella X, Rovira J, Magnano L, Rivas-Delgado A, Baumann T, et al. High serum levels of soluble interleukin-2 receptor (sIL2-R), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF)

are associated with adverse clinical features and predict poor outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res.* 2017;59(March):20–5.

51. Dias JNR, Lopes M, Peleteiro C, Vicente G, Nunes T, Mateus L, et al. Canine multicentric lymphoma exhibits systemic and intratumoral cytokine dysregulation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2019;218(February):109940.
52. Perry JA, Thamm DH, Eickhoff J, Avery AC, Dow SW. Increased monocyte chemotactic protein-1 concentration and monocyte count independently associate with a poor prognosis in dogs with lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2011;9(1):55–64.
53. Irac SE, Oksa A, Jackson K, Herndon A, Allavena R, Palmieri C. Cytokine expression in canine lymphoma, osteosarcoma, mammary gland tumour and melanoma: Comparative aspects. *Vet Sci.* 2019;6(2).
54. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Attenuation of CD8+ T-cell function by CD4+CD25 + regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 2006;66(20):10145–52.
55. Höpken UE, Rehm A. Targeting the Tumor Microenvironment of Leukemia and Lymphoma. *Trends Cancer.* 2019;5(6):351–64.
56. Cao J, Guo P, Xiao S, Fu X. Relationship of regulatory T cell level in peripheral blood with curative efficacy and prognosis of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016;9(11):11876–82.
57. Munhoz TD, Anai LA, Fonseca DM, Semolin LM, Sueiro FR, Tinucci-Costa M. Regulatory T cells in dogs with multicentric lymphoma: Peripheral blood quantification at diagnosis and after initial stage chemotherapy. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2016;68(1):1–9.
58. Anai LA, Munhoz TD, Chaves MRS, Terra EM, Silva AFN, Costa MT, et al. Regulatory T Cells in Dogs with Cancer: A Literature Review. *Source Journal of Veterinary Science.* 2014;1(1):875–81.
59. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):413–25.
60. Kim JK, Chung JS, Shin HJ, Song MK, Yi JW, Shin DH, et al. Influence of NK cell count on the survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood Res.* 2014;49(3):162–9.
61. Zhou XH, Zhang XY, Liang JH, Zhu HY, Wang L, Xia Y, et al. Low absolute NK cell counts in peripheral blood are associated with inferior survival in patients with mantle cell lymphoma. *Cancer Biomarkers.* 2019;24(4):439–47.
62. Al-Anazi K, Al-Jasser A, Al-Anazi W. Natural killer cells in patients with hematologic malignancies, solid tumors and in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *J Stem Cell Ther Transplant.* 2019;3(1):031–55.
63. Lee SH, Shin DJ, Kim Y, Kim CJ, Lee JJ, Yoon MS, et al. Comparison of phenotypic and functional characteristics between Canine Non-B, Non-T Natural killer lymphocytes and CD3+CD5dimCD21-cytotoxic large granular lymphocytes. *Front Immunol.* 2018;9(APR):1–15.

64. Huang YC, Hung SW, Jan TR, Liao KW, Cheng CH, Wang YS, et al. CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells. *J Leukoc Biol.* 2008;84(6):1501–10.
65. Grøndahl-Rosado C, Bønsdorff TB, Brun-Hansen HC, Storset AK. NCR1+ cells in dogs show phenotypic characteristics of natural killer cells. *Vet Res Commun.* 2015;39(1):19–30.
66. Wu Y, Chang YM, Stell AJ, Priestnall SL, Sharma E, Goulart MR, et al. Phenotypic characterisation of regulatory T cells in dogs reveals signature transcripts conserved in humans and mice. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-50065-8>
67. Platt R, Ng T, Glover S, Roof M, Kimura K, Roth JA. Canine peripheral blood lymphocyte phenotyping by 7-color multiparameter flow cytometry. *Anal Quant Cytol Histol.* 2013;35(4):197–204.
68. Zeigler BM, Boyle-Holmes Y, Falzone D, Farmer J. Validation of an eight parameter immunophenotyping panel in adult canines for assessment of immunotoxicity. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2013;154(1–2):75–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.04.005>
69. Abrams VK, Hwang B, Lesnikova M, Gass MJ, Wayner E, Castilla-Llorente C, et al. A novel monoclonal antibody specific for canine CD25 (P4A10): Selection and evaluation of canine Tregs. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2010;135(3–4):257–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.006>
70. Swann JW, Woods K, Wu Y, Glanemann B, Garden OA. Characterisation of the immunophenotype of dogs with primary immune-mediated haemolytic anaemia. *PLoS One.* 2016;11(12):1–18.
71. Triana Marrero Y, Marsán Suárez V. Aplicaciones de la citometría de flujo en el estudio de los síndromes linfoproliferativos crónicos. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia.* 2020;36(1):1–21.
72. Pinheiro D, Singh Y, Grant CR, Richard C, Sacchini F, Walker RL, et al. Phenotypic and functional characterization of a CD 4 + CD 25 high FOXP 3 high regulatory T-cell population in the dog. 2010;111–22.
73. Shafer D, Smith MR, Borghaei H, Millenson MM, Li T, Litwin S, et al. Low NK cell counts in peripheral blood are associated with inferior overall survival in patients with follicular lymphoma. *Leuk Res.* 2013 Oct;37(10):1213–5.
74. Park S, Mun YC, Seong CM, Huh HJ, Huh J. Variable Natural Killer Cell Activity in Hematological Malignancies at Diagnosis. *Laboratory Medicine Online.* 2018;8(2):41.
75. Shin HJ, Kim DY, Chung J, Shin KH, Lee H. Prognostic Impact of Peripheral Blood T-Cell Subsets at the Time of Diagnosis on Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Acta Haematol.* 2021 Jul 1;144(4):427–37.
76. Faldyna M, Leva Â L, Âna Kno Ètigova Â P, Toman M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs Ð a low cytometric study.

77. Marconato L, Comazzi S, Aresu L, Riondato F, Stefanello D, Ferrari R, et al. Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow infiltration in newly-diagnosed canine nodal marginal zone lymphoma. *Veterinary Journal*. 2019 Apr 1;246:78–84.
78. Byrne KM, Wook H, Chew BP, Reinhart GA, Hayek MG. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *2000*;73:167–82.
79. Anai LA, Munhoz TD, Semolin LMS, Filho NPR, Terra EM, Jark PC, et al. Quantification of Treg cells in peripheral blood and lymph nodes of dogs with multicentric lymphoma. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2017;69(6):1496–502.
80. Yagihara H, Uematsu Y, Koike A, Tamura K, Isotani M, Yamaguchi T, et al. Immunophenotyping and gene rearrangement analysis in dogs with lymphoproliferative disorders characterized by small-cell lymphocytosis.