



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE  
LA SALUD ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN DEL LINFOMA FELINO Y SU RELACIÓN CON EL VIRUS DE  
LEUCEMIA FELINA**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

**JUAN MIGUEL PÉREZ ENRIQUEZ**

TUTORA PRINCIPAL:

LAURA PATRICIA ROMERO ROMERO  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Departamento de Patología

COMITÉ TUTOR:

DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Departamento de Genética y Bioestadística

DR. EZEQUIEL FUENTES PANANA  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ  
Unidad de Investigación en Virología y Cáncer

MEXICO, CD.MX., marzo 2024



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.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, por ser una fuente de inspiración y ejemplo de resiliencia. ¡Sin ustedes no sería quien soy, gracias!

A mis hermanos, Ariel, Margarita, Dacia, Luis y Belén, porque siempre me he propuesto ser la persona que ustedes ven en mí. Gracias por motivarme y demostrarme que lo que hago deja huella.

A mi primo, José Zeferino Pérez Enriquez, te adelantaste en este viaje hermano. Tal vez eso era todo...

A Janet, por estar, por acompañarme, por aguantarme y por seguir a mi lado. Sin tu compañía este proceso habría sido más complicado.

A Saquito, sin duda el mejor compañero para escribir. Saber que todo esto ayuda a los tuyos fue una fuente de inspiración y razón suficiente para seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a mi tutora, la Dra. Laura P. Romero Romero, por creer en mi potencial, motivarme a trabajar duro y nunca dudar de mí, gracias por ser una excelente tutora, profesora, jefa y amiga.

Le agradezco profundamente a mi comité tutorial, quienes aportaron en lo académico, pero también fueron fuente de inspiración, ejemplos a seguir y personas con las que pude contar durante todo el proceso.

Al personal administrativo de posgrado de la FMVZ-UNAM por apoyarme en todo momento y siempre tener una actitud de servicio.

Por último, le agradezco a la Universidad Nacional, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en especial al Departamento de Patología, mi casa en estos últimos años.

“Ser Puma es un acto de esperanza, es una profesión de fe, es una larga paciencia, un prolongado estoicismo entre unas cuantas alegrías, es un grito que se ahoga y, para peor, ser Puma es irrenunciable”

Germán Dehesa.

## RESUMEN

Se estima al linfoma como la neoplasia hematopoyética más frecuente en gatos, los cuales son considerados la especie con mayor incidencia de esta patología. El objetivo del presente trabajo fue clasificar, de acuerdo con la Organización Mundial de Salud (OMS), los linfomas felinos remitidos al Departamento de Patología (FMVZ-UNAM) en un periodo de 13 años, contemplando su asociación con el virus de leucemia felina (LeVF). Se colectaron 76 casos (2006-2018) que fueron clasificados histopatológicamente según la OMS, utilizando los marcadores anti-CD3 (Abcam, 1:50) y anti-CD79a (Dako, 1:300). La identificación del provirus de FeLV en los tejidos tumorales se realizó mediante qPCR. Se obtuvieron estadísticos descriptivos, análisis de frecuencias y se evaluó asociación entre variables. En los linfomas se encontró un predominio de linfoma de células T (n=60, 81%) sobre el B (n=14, 19%), dos de los casos no fueron inmunotipificados. Fue posible identificar 11 tipos de linfomas según la OMS; la enteropatía asociada a linfoma de células T tipo II (EATLII) fue la entidad más frecuente (30%, n=23), seguida del linfoma linfoblástico de células T (T-LBL) y el linfoma periférico de células T (PTCL) con un total de 15 casos cada uno (20%). En total, en el tejido tumoral, se encontró en 21% de los casos material genético del virus de leucemia felina, siendo el T-LBL la entidad con mayor número de casos positivos. La clasificación del linfoma felino de acuerdo con la OMS pudo ser aplicable a la población estudiada, encontrando similitudes con estudios de otras partes del mundo. El T-LBL se observó con una frecuencia mayor que en otros reportes y esto podría estar relacionado a la frecuencia del FeLV en nuestro país, debido a que la mayoría de casos positivos fue en este tipo de linfoma.

**Palabras Clave:** Linfoma, Leucemia viral felina, WHO

## **ABSTRACT**

Lymphoma is considered the most frequent hematopoietic neoplasm in cats, which are considered the species with the highest incidence of this pathology. The aim of this study was to classify, according to the World Health Organization (WHO), feline lymphomas referred to the Department of Pathology (FMVZ-UNAM) over a period of 13 years, considering their association with feline viral leukemia virus (FeLV). Seventy-six cases (2006-2018) were collected and histopathologically classified according to WHO, using anti-CD3 (Abcam, 1:50) and anti-CD79a (Dako, 1:300) markers. Identification of FeLV provirus in tumor tissues was performed by qPCR. Descriptive statistics, frequency analysis and association between variables were obtained. T-cell lymphoma (n=60.81%) predominated over B-cell lymphoma (n=14.19%), two of the cases were not immunotyped. It was possible to identify 11 types of lymphomas according to WHO; enteropathy associated with T-cell lymphoma type II (EATLII) was the most frequent entity (30%, n=23), followed by T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LBL) and peripheral T-cell lymphoma (PTCL) with a total of 15 cases each (20%). Overall, in 21% of the cases, feline viral leukemia virus genetic material was found in the tumor tissue, with T-LBL being the entity with the highest number of positive cases. The classification of feline lymphoma according to the WHO could be applicable to the population studied, finding similarities with studies from other parts of the world. T-LBL is observed with a higher frequency than in other reports and this could be related to the frequency of FeLV in our country, because most of the positive cases were in this type of lymphoma.

**Palabras Clave:** Lymphoma, feline viral leukemia virus, WHO

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIAS</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>VII</b>
<b>Capítulo I</b>	
<b>Caracterización del linfoma felino y su relación con el virus de leucemia felina</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>4</b>
<b>Objetivos</b>	<b>5</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>6</b>
<b>Epidemiología del virus de leucemia felina</b>	<b>6</b>
<b>Mecanismos de oncogénesis por el virus de leucemia felina</b>	<b>9</b>
<b>Clasificaciones histopatológicas en el estudio del linfoma</b>	<b>11</b>
<b>Uso de la clasificación de la OMS en el linfoma felino</b>	<b>13</b>
<b>Evaluación de clonalidad mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>	<b>16</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
<b>Población y muestra</b>	<b>18</b>
<b>Métodos e instrumentos de recolección de datos</b>	<b>18</b>
<b>Histopatología e inmunohistoquímica</b>	<b>18</b>
<b>Extracción y cuantificación de ADN</b>	<b>19</b>
<b>PCR para la identificación de ADN proviral del virus de Leucemia Felina</b>	<b>19</b>
<b>Construcción de la curva de cuantificación</b>	<b>20</b>
<b>Procedimiento del ensayo</b>	<b>21</b>
<b>Amplificación por PCR de las regiones V y J de la cadena y del TCR para la evaluación de clonalidad de linfocitos T</b>	<b>21</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>35</b>
<b>Capítulo II</b>	
<b>Secuenciación e identificación de los subtipos de LeVF implicados en el desarrollo de linfoma felino</b>	<b>40</b>
<b>Capítulo III</b>	<b>43</b>
<b>Evaluación de parámetros hematológicos y poblaciones linfocitarias en el desarrollo y desenlace de la infección por el virus de leucemia felina (LeVF)</b>	
<b>ANEXOS</b>	<b>47</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Primers utilizados para identificar el TCRG. Mochizuki (2012) GeneScan analysis to detect clonality of T-cell receptor gene rearrangement in feline lymphoid neoplasms.

## LISTA DE FIGURAS

Ilustración 1. Clasificación de linfomas en medicina veterinaria, de acuerdo con la clasificación de la OMS. Valli y Col, 2016.

Ilustración 2. Se muestra cómo se realizaron las diluciones del DNA control para obtener una curva de calibración de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioTecMol).

Ilustración 3. Representación esquemática del rearreglo del TCRg y localización de los primers utilizados. Mochizuki (2012) GeneScan analysis to detect clonality of T-cell receptor gene rearrangement in feline lymphoid neoplasms.

Figura 1. Presentación anatómica de los casos de linfoma felino (2006-2018).

Figura 2. Linfoma Difuso de Células B Grandes (DLBCL).

Figura 3. Linfoma de Células B Pequeñas (BSCL).

Figura 4. Linfoma Linfoblástico de células T.

Figura 5. *Linfoma de la zona T (TZL).*

Figura 6. Linfoma de células T Periférico.

Figura 7. *Enteropatía Asociada a Linfoma de Células T tipo II (EATL II).*

*Figura 8. Frecuencia del provirus de Leucemia Viral Felina según la presentación anatómica del Linfoma.*

*Figura 9. Frecuencia del provirus de Leucemia Viral Felina según la edad de los gatos con linfoma.*

## INTRODUCCIÓN

El linfoma es una neoplasia muy común en la mayoría de las especies animales, incluyendo al ser humano. Se estima que la neoplasia hematopoyética es la más frecuente en gatos, los cuales son considerados la especie con mayor incidencia en esta patología (Louwerens y Col, 2005). Esta alta incidencia se ha asociado, en parte, a la presencia del virus de leucemia felina (LeVF), un retrovirus ampliamente estudiado por su capacidad de inducir entre otras alteraciones, desórdenes linfoproliferativos en los gatos infectados. La asociación de linfoma felino con LeVF ha sido establecida en diferentes formas: el linfoma puede ser inducido en gatos a través de la inoculación experimental del virus; así también, los gatos que son naturalmente infectados con LeVF tienen un mayor riesgo de desarrollar linfoma que los gatos no infectados (Stützer y Col, 2011). Históricamente, LeVF se considera responsable de la mayoría de las muertes relacionadas con la enfermedad y demás síndromes clínicos que cualquier otro agente infeccioso en gatos. Se ha propuesto que aproximadamente un tercio de todas las muertes relacionadas a tumores en gatos son causadas por el virus y que un mayor número de gatos murieron por anemia secundaria a LeVF y enfermedades infecciosas secundarias causadas por efectos supresivos en médula ósea y el sistema inmune (Hartmann y Col, 2011).

A pesar de que el virus de LeVF ha disminuido en su asociación como causante de linfoma, esto podría explicarse con la aparición de la vacuna contra el virus; estudios recientes han resaltado el uso de técnicas moleculares para la identificación de ADN proviral integrado al huésped lo cual ha correlacionado con la aparición de desórdenes linfoproliferativos, sin embargo, más estudios son requeridos para esclarecer la importancia clínica de este hallazgo (Hofmann-Lehmann, 2008).

Aún no se ha establecido con claridad una causa subyacente de los linfomas felinos no relacionados a retrovirus. Se cree que existe una asociación entre la exposición crónica al humo de cigarrillo y el desarrollo de linfoma. También se ha demostrado

que esta neoplasia se presenta frecuentemente en órganos o sitios afectados por inflamación crónica y se ha propuesto la conexión del linfoma alimentario con la enfermedad inflamatoria intestinal en gatos. Estas observaciones sugieren que el linfoma, como muchas otras neoplasias, requiere tanto de factores predisponentes como desencadenantes (Louwerens y Col, 2005).

Con la intención de entender un poco más el comportamiento del linfoma en el ser humano, se han estudiado diferentes clasificaciones histopatológicas, logrando encontrar una asociación entre el tipo de linfoma y el pronóstico para el paciente. Estudios previos han adoptado la clasificación histopatológica de linfoma del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (Working Formulation –WF-) encontrando que las alteraciones linfoproliferativas de los gatos son similares en la topografía y citomorfología de su contraparte en humanos y otros animales domésticos. Si bien, el linfoma en el gato representa un grupo diverso de lesiones que varía ampliamente en su arquitectura, morfología celular y presumiblemente en el rango de diseminación y progresión, parece ser un modelo útil en el estudio de la biología y comportamiento del linfoma en humanos (Gabor y Col, 1999; Valli y Col, 2000) En 2002, la World Health Organization (WHO) publicó una revisión de la clasificación Europea-Americana de linfoma en animales domésticos (REAL). A esta clasificación, también adaptada de medicina humana, se le anexaron otras neoplasias hematopoyéticas mieloides bajo la guía del panel de expertos veterinarios de la WHO. El objetivo principal de esta clasificación fue correlacionar cada categoría de linfoma con su comportamiento y grado de malignidad (Valli y Col, 2000; Vezzali y Col, 2009). Con el desarrollo de varios reactivos para identificar el linaje hematológico por inmunohistoquímica, la REAL fue propuesta para evitar la falta de diferenciación entre células B y T en el sistema de la WF (Valli y Col, 2000). A partir de entonces, en medicina veterinaria, la antigua WF y otras clasificaciones propuestas, como la actualización de Kiel, fueron reemplazadas por la nueva clasificación REAL/WHO propuesta inicialmente en 2002 y actualizada en 2011. Esta clasificación ha sido detallada por Valli (2007) en el libro Veterinary

Comparative Hematopathology y la actualización por la WHO fue descrita en el libro Pathology of Domestic Animals (Wolfesberger y Col, 2018).

El linfoma en el gato representa un diverso grupo de patologías con variaciones importantes en su arquitectura, morfología celular y en su patrón de progresión. Para entender mejor la participación y potencial de malignidad del virus de la leucemia viral felina se requieren estudios moleculares que determinen la posible implicación del virus en el desarrollo de desórdenes linfoproliferativos en gatos, para ello, es necesario también evaluar las características morfológicas de los linfomas felinos, así como utilizar técnicas moleculares que permitan determinar el linaje de las células neoplásicas y la presencia de ARN viral y/o ADN proviral del LeVF en las células, con la finalidad de establecer una posible correlación entre el linaje, las características morfológicas y localización del linfoma, así como determinar si el virus está implicado y de qué manera se relaciona con estos procesos neoplásicos. Además, existen estudios que demuestran el potencial del linfoma felino como modelo de estudio de la biología y comportamiento del linfoma en humanos.

**Hipótesis:** las características morfológicas, fenotípicas y la localización anatómica del linfoma felino están definidas por la presencia de ADN proviral del virus de leucemia felina.

**Objetivo General:**

Identificar la frecuencia del provirus de LeVF en los casos de linfoma felino diagnosticados en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM en el periodo de 2006 a 2018 y conocer su relación con subtipos específicos del linfoma, de acuerdo con la clasificación de la OMS.

**Objetivos específicos:**

1. Identificar el papel que juegan las neoplasias y, en particular, el linfoma felino, entre las muestras de gatos remitidos al Departamento de Patología, FMVZ-UNAM para estudio histopatológico.
2. Determinar la presencia de ADN proviral del virus de leucemia felina en tejidos embebidos en parafina mediante la técnica de qPCR y precisar su frecuencia e implicación en los casos de linfoma felino.
3. Clasificar, de acuerdo con la OMS, los casos de linfoma felino diagnosticados en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM en el periodo comprendido entre enero de 2006 a diciembre de 2018, contemplando su asociación con el virus de leucemia felina.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Epidemiología del virus de leucemia felina

A partir de que se instauró la vacunación contra el LeVF su control ha sido muy exitoso. Como resultado, la prevalencia global ha disminuido y, con esto, la población en riesgo de sufrir linfoma secundario al proceso infeccioso. En 1970, el 70% de los casos de linfoma en gatos de EUA eran atribuidos al LeVF, comparado con menos del 15% reportado en un periodo de 20 años antes del 2003 (Louwerens y Col, 2005). Una caída similar en la prevalencia de 59% a 13% en dos periodos consecutivos de 15 años hasta el 2009 fue reportado en Alemania, curiosamente, un impacto negativo en la incidencia de linfoma felino *per se* no fue aparente (Louwerens y Col, 2005; Meichner y Col, 2012; Beatty y Col, 2014).

Debido a la propuesta de que la inserción del material genético del virus por si sola, sin que necesariamente el virus se mantenga activo, es suficiente para el desarrollo de linfoma (mutagénesis insercional), los estudios más recientes se centraron en analizar la correlación de la presencia de ADN proviral y el desarrollo de linfoma. Weiss y Col, (2010) cuantificaron el ADN proviral presente en diferentes clasificaciones histopatológicas de linfoma encontrando ADN proviral en el 79% de los casos de linfoma de células T, 60% de los linfomas de células B y 67% en los linfomas no B no T. En contraste, el antígeno solo fue encontrado en el 21% de linfomas de células T, 11% de los linfomas de células B y en 33% de los linfomas NK; en todos estos casos también fue posible detectar ADN proviral. Con esto, se destaca el papel de la inserción del ADN proviral en el genoma celular en los casos de linfoma, sin la necesidad de una replicación activa del virus, por lo que, debido a la alta prevalencia del provirus en este estudio, se considera que la infección con LeVF podría seguir representando una de las principales causas de linfoma en gatos.

En Australia, en el 2001 se realizó un estudio donde se determinó el estado viral en suero y tejido neoplásico de 107 gatos con diagnóstico de linfoma; en este estudio se encontró una prevalencia baja del LeVF y poca correlación en los 86 casos donde

se pudo determinar la presencia del antígeno (proteína p27 del virus) en suero mediante la técnica de ELISA y la detección de ADN proviral en tejido neoplásico mediante PCR, ya que solo 2 casos de los 19 en los que se obtuvo ADN proviral fueron positivos a la proteína en suero. Debido a la baja prevalencia tanto en la detección de partículas virales como en la del ADN proviral, los autores sugieren que otros factores deben tener más peso en el desarrollo de linfoma en los gatos australianos (Gabor y Col, 2001).

En Argentina, Galdo y Col, (2016) evaluaron la prevalencia del LeVF y del virus de inmunodeficiencia felina (VIF) en muestras sanguíneas de 255 gatos de la ciudad de Buenos Aires que llegaron a consulta al Hospital de Pequeños Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, mediante dos técnicas de diagnóstico; un método de ELISA comercial para identificar la proteína p27 del antígeno y la técnica de PCR anidado para la amplificación de una región de 166 pb de la región U3 del segmento LTR del virus. En este estudio la prevalencia del LeVF no difiere mucho a lo reportado en otros países, mostrando positividad en 8% de los casos analizados por ELISA y 12% mediante la técnica de PCR.

Otro estudio también realizado en Sudamérica, en la ciudad de Rio de Janeiro, en Brasil, reporta una prevalencia de 33% del LeVF (27/81) mediante serología y dos técnicas de PCR distintas. El objetivo era evaluar la coinfección con el virus espumoso felino (FFV), del cual existe muy poca información clínica y epidemiológica (Cavalcante y Col, 2018). En otra región de Brasil, Santa Catarina, se encontró con una prevalencia del LeVF mayor, incluyendo únicamente pacientes con diagnóstico de linfoma. En este caso, fue evaluado mediante inmunohistoquímica el tejido neoplásico de 53 casos de linfoma felino, diagnosticado durante el periodo de enero 2010 a septiembre 2017, utilizando un anticuerpo primario anti gp70 del LeVF (Bio-Rad, formerly AbD Serotec, Kidlington, UK), hallando una prevalencia de 57% del LeVF; al correlacionar con la localización anatómica, se reveló mayor prevalencia del virus en los casos de linfoma multicéntrico y mediastínico. A pesar de la baja casuística, para los autores

esta prevalencia sugiere una participación importante por parte del virus de leucemia felina en el desarrollo de linfoma en los gatos de dicha región (Cristo y Col, 2019).

Aun cuando en México la vacuna contra LeVF lleva varios años en el mercado, en la actualidad no hay suficientes estudios epidemiológicos que confirmen una disminución en la incidencia de la infección viral y mucho menos su posible implicación en los casos de linfoma felino. En el 2006, se llevó a cabo un estudio donde se demostró una prevalencia de 30% del LeVF en tres laboratorios de diagnóstico para pequeños animales de la Ciudad de México, la técnica empleada fue un inmunoensayo de flujo lateral comercial en una población total de 831 gatos (Kanafany y Col, 2006). En otro estudio, en Mérida Yucatán, una zona tropical de México, se encontró una prevalencia de 2.5% (5/227) utilizando también una prueba de IFL (Ortega-Pacheco y Col, 2014); sin embargo, en ninguno de los estudios se evaluó la posibilidad de una infección latente con técnicas moleculares, ni se abordó la relación con la presencia de linfoma. En el 2007 se estudió la presencia del virus mediante inmunohistoquímica en los casos de procesos linfoproliferativos de gatos remitidos al laboratorio de necropsias de la FMVZ-UNAM durante el periodo de 2002-2005, donde se reportó un 71.4% de inmunopositividad con una mayor presentación del virus de leucemia felina en los casos de linfoma multicéntrico; a pesar de haber trabajado con una población muy pequeña (21 casos totales) es el único estudio realizado en México del que se tenga conocimiento que evalúe la correlación de los casos de linfoma con la presencia del LeVF (Fonseca y Col, 2007), sin embargo, no se determinó el linaje de las células neoplásicas y su posible relación con la infección. En 2014 se estandarizó en la FESC-UNAM una técnica de PCR con la cual fue posible detectar presencia de ADN proviral en células mononucleares de sangre periférica, mostrando una sensibilidad del 92% y una especificidad de 95% (Autran y Col, 2014). En 2016, en un reporte de caso en la FMVZ-UNAM, se describió el desarrollo de linfoma multicéntrico y leucemia linfoblástica aguda en un gato que fue positivo a la presencia del antígeno en suero

mediante IFL. En este caso se realizó inmunohistoquímica encontrándose positividad al marcador CD79a que indica predominio de células B, contrario a lo que reporta la mayoría de la literatura en gatos positivos al virus de leucemia felina (Pérez-Enriquez y Col, 2017).

### **Mecanismos de oncogénesis por el virus de leucemia felina**

A pesar de que algunos estudios han logrado determinar cierta correlación entre la localización anatómica y la presencia o ausencia del LeVF con el linaje de las células neoplásicas, aún existe cierta controversia al respecto, y a diferencia del linfoma en perros y humanos, no se ha establecido con precisión su posible implicación en el pronóstico del linfoma en felinos; sin embargo, diferentes autores concuerdan que es necesario realizar más estudios con poblaciones que incluyan un mayor número de gatos con el padecimiento para poder generar datos estadísticos de mayor relevancia (Petterson-Kane y Col, 2004; Guzera y Col, 2014). La infección por el virus de leucemia felina puede resultar en diferentes escenarios, incluyendo una infección latente, la cual se caracteriza por la ausencia de antigenemia, pero con presencia de ADN proviral del LeVF en sangre periférica y/o médula ósea. La asociación entre la presencia del ADN proviral y el desarrollo de linfoma no está clara (Weiss y Col, 2010). Es ampliamente aceptado que el linfoma inducido por el LeVF se asocia con la expresión del antígeno en el tumor, al menos en las etapas tempranas, sin embargo, la integración del ADN proviral del LeVF ha sido propuesta como suficiente para la inducción de linfoma por mutagénesis insercional (Fujino y Col, 2008; Cattori y Col, 2008; Hofmann-Lehmann y Col, 2008). Esta teoría es respaldada por algunos estudios que han reportado una asociación entre el desarrollo de linfoma y la presencia del ADN proviral del LeVF en tumores negativos a la presencia del antígeno mediante pruebas de ELISA (Weiss y Col, 2010; Jackson y Col, 1996; Valli y Col, 2000).

Se ha demostrado que el potencial oncogénico del LeVF depende de, al menos, tres determinantes genéticos: secuencias reguladoras de la transcripción en la

región repetida terminal larga del virus (LTR), influencias potenciales sobre el tropismo de la célula diana y la diseminación *in vivo* por variaciones en una glicoproteína superficial de la envoltura (SU), y la activación de los oncogenes celulares, típicamente por la integración adyacente de un provirus transcripcionalmente activo (Bolin & Levi, 2011).

La región LTR del LeVF juega un papel importante en su replicación y patogénesis; esta región contiene múltiples sitios de unión a factores de transcripción (FT) lo que provee capacidad de expresión tejido-específica al virus. Estos sitios de unión a FT pueden promover la actividad transcripcional de genes propios del huésped, adyacentes al sitio de integración del virus. La activación insercional de los proto oncogenes *c-myc*, *pim-1*, *pvt-1*, *flvi-2*, *int-1/wnt-1*, entre otros, ha sido reportada en la patogénesis de estos virus (Abujamra y Col, 2006).

Esta región presenta notable variación genética entre los aislamientos naturales y las variantes de LTR que se han vinculado a enfermedades particulares. Por ejemplo, los provirus del LeVF clonados directamente a partir de linfomas tímicos de células T típicamente contienen dos o tres potenciadores repetidos en tándem en la región LTR, por el contrario, la región LTR del LeVF derivados de enfermedades no neoplásicas o enfermedades no relacionadas con células T generalmente contienen solo una copia del potenciador, pero pueden contener elementos repetidos en otras partes de la región LTR (Chandhasin y Col, 2004).

En un estudio donde se analizaron los posibles determinantes genéticos implicados en el desarrollo de linfoma multicéntrico secundario a leucemia viral felina, se encontró, que a diferencia del linfoma tímico, la región LTR de los provirus del LeVF implicados en esta patología contenían solo una copia del potenciador y que esta región presentaba una secuencia repetida en tándem de 21 pb, comenzando 25 pb río abajo del promotor, estas regiones LTR únicas, originalmente descritas en la integración de provirus en la región *flvi-1* del ADN felino en linfomas esplénicos no B no T, han demostrado funcionar preferentemente en líneas celulares hematopoyéticas multipotenciales primitivas. Su aislamiento repetido, único en los

linfomas multicéntricos no B no T implica fuertemente a esta variante de la región LTR en la inducción de tumores con este fenotipo (Athas y Col, 1995).

También ha sido demostrado que la región U3 de la LTR del LeVF activa la expresión génica dependiente de NF-kB, vía de señalización importante en la respuesta inmune del huésped y de la cual se han descrito previamente implicaciones en diferentes tipos de cáncer; al modular un diverso rango de genes, muchos involucrados en el crecimiento celular y apoptosis, se ha vuelto un blanco para diferentes tipos de virus (Abujamra y Col, 2006).

### **Clasificaciones histopatológicas en el estudio del linfoma**

Al igual que en patología humana, se han desarrollado varios sistemas de clasificación durante las últimas décadas para los tumores linfoides animales, basados en criterios morfológicos, inmunofenotípicos, y recientemente, genotípicos (Vezzali y Col, 2009). Idealmente, una clasificación de tumores debería reflejar las diferentes categorías morfológicas y tener implicaciones clínicas que predicen el comportamiento de los distintos subtipos y su respuesta a la terapia estandarizada (Parodi, 2001).

En la década de los 60, a partir de 2 hechos importantes que marcaron la forma de abordar el linfoma: (1) el potencial de los linfocitos (que se creía eran células en su estado final completamente diferenciadas) de convertirse en células grandes proliferantes en respuesta a diferentes mitógenos y/o antígenos y (2) la existencia de distintos linajes de linfocitos (B, T, NK), los cuales no pueden ser predichos con exactitud solo por la morfología y que cumplen funciones diferentes en el organismo, los patólogos se encaminaron a utilizar esta nueva información en el abordaje y clasificación del linfoma (Jaffe y Col, 2008).

En Estados Unidos, la clasificación de Rappaport fue de las primeras en ser utilizadas en casos de linfoma en perros; posteriormente, con el advenimiento de los conocimientos inmunogénicos del linfoma, surgieron nuevas clasificaciones, como la de Lukas-Collins y la de Kiel en Europa, esta última fácilmente adoptada en

medicina veterinaria. Con la finalidad de homologar la nomenclatura utilizada entre las distintas clasificaciones, el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI) desarrolló la Working Formulation (WF) en 1982; estrictamente basada en el desarrollo clínico del linfoma sin tomar en cuenta la morfología celular (Maxie y Col, 2008).

En el año 2000 se realizó el estudio más amplio del que se tenga conocimiento del linfoma felino; utilizando la Working Formulation se clasificaron 602 casos de los cuales 69 (11%) fueron diagnosticados como de bajo grado, 210 (35%) como de grado intermedio y 323 (54%) como de alto grado. De estos casos, cerca del 98% correspondía con un linaje de células B. El estado antigénico de la leucemia felina se conocía solo en 166 casos, de los cuales 84 fueron positivos. Con este estudio se concluyó que la topología y citomorfología del linfoma felino es similar a su contraparte en humanos y otros animales domésticos, y que puede ser perfectamente clasificada con las bases de la WF (Valli y Col, 2000).

Otro estudio realizado un año antes, utilizó esta misma clasificación en 107 casos de linfoma felino; nuevamente se encontró al linaje de células B con mayor predominancia (70%) y en cuanto a la gradificación se encontró el linfoma de bajo grado en 11 casos (10%), el grado intermedio en 72 casos (66%) y 26 casos (24%) fueron de alto grado. A pesar de que no se evaluó la influencia del LeVF, se sugiere que pudiera no jugar un papel tan importante dado el fenotipo de los linfomas estudiados, por lo que una revisión epidemiológica sería de gran utilidad para esclarecer cuales son los factores desencadenantes de esta neoplasia en los gatos de Sidney, Australia (Gabor y Col, 1999).

A pesar de que la WF del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos se aceptó como una clasificación viable en medicina veterinaria, sobre todo en perros, el hecho de no adoptar el linaje celular para la gradificación de los linfomas se consideró como una fuerte debilidad. En 1994 el Grupo Internacional de Estudio de Linfoma publicó la Revisión Europeo Americana de Clasificación del Linfoma (REAL), la cual combinaba la morfología celular, el inmunofenotipo, características

genéticas y la manifestación clínica (Parodi, 2001). Al ser una clasificación más completa, incluyendo el linaje celular y siendo comprobado un valor pronóstico en estudios recientes, poco a poco, esta clasificación ha tomado un papel importante en medicina veterinaria.

### **Uso de la clasificación de la OMS en el linfoma felino**

A la fecha, la clasificación de linfomas realizada por la OMS ha sido detallada en literatura veterinaria (Valli y Col, 2016) y ya existen distintos trabajos dónde se utiliza esta clasificación en linfomas felinos; Waly y Col, (2005) describieron 32 casos de linfoma alimentario o multicéntrico con afección intestinal, donde se utilizaron anticuerpos para los marcadores Cd3, Cd79a, Bla-36 y para el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, con la finalidad de determinar el linaje de las células neoplásicas. Con esta herramienta se logró agrupar a los linfomas dentro de tres categorías de la OMS, y asimismo, se descartaron algunos casos que demostraron una población de linfocitos heterogénea que correspondía más con un proceso inflamatorio. Con esto, los autores resaltan la importancia de utilizar el inmunomarcaje en la aproximación diagnóstica del linfoma felino.

Pohlman y Col, (2009) clasificaron 50 casos de linfoma felino gastrointestinal de acuerdo con la OMS encontrando ocho entidades diferentes con un predominio marcado del linfoma difuso de células B grandes (TLBCL) de tipo nuclear inmunoblástico (n = 16) y del linfoma epiteliotrópico de células T pequeñas (EATL) (n = 15).

También en 2009 se realizó un estudio retrospectivo donde se incluyeron 117 casos de linfoma canino y felino con la finalidad de clasificarlos de acuerdo con los lineamientos de la OMS. En este estudio se incluyeron 48 gatos y se encontró una prevalencia de linfomas de células T. La entidad más representativa en gatos fue el linfoma intestinal de células T (EATL), con 16 casos, seguido por el linfoma periférico de células T (PTCL), con 11 casos (Vezzalli y Col, 2009).

Otros estudios han utilizado el inmunomarcaje y la clasificación de la OMS en casos de procesos linfoproliferativos gastrointestinales en gatos, con la finalidad de diferenciar el proceso neoplásico de la enteritis linfoplasmocítica, entidades con características histopatológicas muy similares, con el objetivo de determinar si existen particularidades que sirvan para diferenciar entre estas dos patologías. Ha pesar de su utilidad, el uso de la histopatología e inmunohistoquímica por sí solas, no fue de gran ayuda en la diferenciación entre linfoma intestinal y la enteritis linfoplasmocítica, por lo que se sugirieron técnicas como la evaluación de la clonalidad mediante PCR para su diferenciación (Briscoe y Col, 2011).

Trabajos posteriores se realizaron con la finalidad de evaluar el valor pronóstico del uso de la clasificación de la OMS adaptada en medicina veterinaria para los casos de linfoma felino. Moore y Col, (2012) evaluaron 120 casos de linfoma gastrointestinal felino usando la clasificación de la OMS y apoyándose en técnicas moleculares para evaluar clonalidad. En este estudio se identificó a la enteropatía asociada a linfoma de células T (EATCL tipo II) como la entidad predominante (n = 84) y se observó un periodo medio de sobrevida de 29 meses. La EATCL tipo I (linfoma transmural de células T) se encontró en 19 de los casos de estudio y se correlacionó con un periodo medio de sobrevida de 1.5 meses. El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) se encontró en 19 casos, reportándose en zonas del estómago, yeyuno o en la unión íleo-cólico-cecal, y mostró un periodo de sobrevida de 3.5 meses.

Unos años más tarde, la clasificación de la OMS fue usada no solo para casos que involucraban la región gastrointestinal. Wolfesberger y Col, (2017) evaluaron 30 casos de linfoma con distintas presentaciones anatómicas, los cuales pudieron ser perfectamente incluidos en las diferentes presentaciones de linfoma incluidas en la WHO y se correlacionó con el periodo de sobrevida. De los 30 casos incluidos, la presentación con mayor prevalencia fue el linfoma de células T periférico (PTCL) (37% de los casos; n = 11), seguido por el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) (23%; n = 7), linfoma intestinal de células T (EATL)(10%; n = 3), linfoma

---

**Clasificación de linfoma adoptada de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aplicada en medicina veterinaria.**

---

- Neoplasias de Células B
- Neoplasias de precursores de células B
  - Leucemia linfoblástica B / Linfoma linfoblástico B
- Neoplasias de Células B maduras (periféricas)
  - Leucemia linfocítica crónica B / linfoma linfocítico de células B pequeñas.
  - Linfoma difuso de células B grandes
    - Centroblástico
    - Inmunoblástico
    - Anaplásico
    - Rico en células T
    - Granulomatosis linfomatosa
  - Linfoma folicular de células B (I, II, III)
  - Linfoma de células B de la zona marginal
    - Linfoma nodal de la zona marginal
    - Linfoma esplénico de la zona marginal
    - MALT (tejido linfoide asociado a mucosas)
  - Linfoma de células del manto
  - Linfoma tipo Burkitt
  - Plasmocitoma extramedular.
  - Mieloma múltiple
- Neoplasias de células T y Natural killer (NK)
- Neoplasias de células T precursoras
  - Leucemia linfoblástica T / linfoma linfoblástico T
- Neoplasias de células T maduras (periférico)
  - Linfoma nodal de células T
    - Linfoma de la zona T
    - Linfoma de células T periférico (no específico)
    - Linfoma de células T grandes anaplásico
    - Linfoma de células T angioinmunoblástico
  - Enteropatía asociada a linfoma de células T (EALCT)
    - Tipo I: células grandes
    - Tipo II: células pequeñas
  - Linfoma de células T Extranodal
    - Linfoma de células T hepatoesplénico
    - Linfoma de células T hepatocitotrópico
    - Linfoma de células T periférico (no específico)
  - Linfoma de células T cutáneo
    - Linfoma cutáneo de células T epiteliotrópico
      - Micosis fungoides
      - reticulosis pagetoide
      - Síndrome Sézary
    - Linfoma cutáneo de células T no epiteliotrópico
      - Linfoma periférico de células T (no específico)
      - Linfoma de células T subcutáneo "tipo paniculitis"
      - Linfoma de células T grandes anaplásicas
  - Leucemia linfocítica granular de células T grandes
    - Leucemia linfocítica aguda de células T grandes granulares
    - Leucemia linfocítica crónica de células T grandes granulares

*Ilustración 1. Clasificación de linfomas en medicina veterinaria, de acuerdo con la clasificación de la OMS. Valli y Col, 2016.*

de células B, rico en células T (TCRBCL) (10%; n = 3), linfoma de células grandes granulares (7%; n = 2), linfoma anaplásico de células T grandes (7%; n = 2), linfoma linfocítico de células pequeñas tipo B (BCL) (3%; n = 1) y linfoma angiotrópico de células T (3%; n = 1). En este estudio se observó que los gatos con linfoma intestinal de células T vivieron significativamente más tiempo (1.7 años) que los que presentaron linfoma difuso de células B (4.5 meses) o linfoma periférico de células T (6.1 meses).

El reporte más reciente donde se utiliza la clasificación de la OMS para linfomas felinos se realizó apenas en el 2018, por Wolfesberg y Col, en el que se agruparon 61 casos de linfoma gastrointestinal felino. En este trabajo se resaltó la colaboración de un anatomopatólogo de medicina humana, el cual logró un consenso en el 59% de los casos.

## **Evaluación de clonalidad mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Un punto clave al hablar de neoplasia, es la presencia de una población de células clonales. La identificación de dicha población (también conocida como prueba de clonalidad o evaluación de clonalidad) depende de la presencia de marcadores que, en condiciones normales, son altamente polimórficos en el tipo de célula de interés (Langerak, 2016). En las proliferaciones linfoides, tales marcadores altamente polimórficos existen en forma de genes receptores de antígenos que tienen que reorganizarse de una manera específica en la célula para codificar la molécula de inmunoglobulina (IG) o receptor de células T (TCR); en una población de células reactivas, el repertorio de los genes IG / TCR reordenados es, por lo tanto, muy diverso, mientras que en un contexto neoplásico el repertorio de IG / TCR es en parte o en gran medida idéntico; por esto, las pruebas de clonalidad de los genes IG / TCR reorganizados constituyen una herramienta útil en el arsenal de diagnóstico de leucemias y linfomas (Langerak, 2016).

La técnica de PCR para evaluar el reordenamiento del gen del receptor de antígeno (PARR) es usada para detectar poblaciones de linfocitos clonales; sin embargo, se ha establecido que esta técnica no determina adecuadamente el fenotipo ya que los linfocitos neoplásicos pueden mostrar re arreglo clonal para uno o ambos de los genes de receptores de antígeno de células B o T, independientemente del linaje; esto se ha llamado rearreglo de linaje cruzado y ha sido reportado en neoplasias linfoides de perros y humanos (Andrews y Col, 2016).

La técnica de PARR para la evaluación de clonalidad en el linfoma felino ha sido desarrollada por Weiss y Col, (2011) y Werner y Col, (2005) utilizando como región blanco al locus TRG e IGH respectivamente y ha sido ampliamente utilizada sobre todo para la diferenciación de la enteropatía asociada a linfoma de células T de una enfermedad inflamatoria intestinal; ambas entidades frecuentemente reportadas en gatos domésticos. Andrews y Col, (2016) analizaron 175 casos con sospecha de enteropatía asociada a linfoma de células T de tipo dos (EATCL type II); utilizando un algoritmo que incluía la histopatología, inmunohistoquímica y la evaluación de

clonalidad (PARR) los autores lograron confirmar el diagnóstico en estos casos y concuerdan en que esta técnica es de mucha ayuda para el abordaje diagnóstico, sin embargo, no debe ser utilizada de forma individual o buscando establecer inmunofenotipo sin el uso de la inmunohistoquímica.

Sato y Col, (2011) compararon la determinación del linaje celular mediante inmunohistoquímica y un análisis de clonalidad por PCR en casos de linfomas felinos, encontrando que la PCR tiene un 75% de especificidad y 89% de sensibilidad con los primers para IgH, mientras que se encontró una especificidad de 100% y una sensibilidad de 25% con los primers para TCR $\gamma$ . También se reportó un 25% de linaje cruzado en linfomas de células T en el primer de IgH; lo cual sugiere que el análisis genético debería aplicarse más como una herramienta complementaria y no como una herramienta definitiva en la determinación del linaje de linfoma felino.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Población y muestra**

Se realizó un estudio retrospectivo con la base de datos del departamento de patología de la FMVZ-UNAM de donde se extrajeron los casos de gatos remitidos para estudios pos mortem o biopsias durante el periodo de 2006-2018, se obtuvieron 1816 casos de los cuales 689 correspondieron a procesos neoplásicos. De estos casos se colectaron los 76 bloques de parafina con diagnóstico histopatológico de linfoma.

### **Métodos e instrumentos de recolección de datos**

#### **Histopatología e inmunohistoquímica**

Una vez identificados los casos de linfoma, se procedió al procesamiento de los bloques de parafina para su estudio histopatológico. Los tejidos embebidos en parafina se cortaron a un grosor de 6-10  $\mu\text{m}$  y posteriormente fueron teñidos con hematoxilina-eosina para su análisis microscópico. A su vez se realizó la determinación del inmunofenotipo, para esto se recurrió a la técnica de arreglo de tejidos, donde fue colectado con un punch de 5 mm una región representativa del tejido neoplásico de cada caso, estas fueron embebidas en parafina en un nuevo bloque, el cual contenía entre 9 y 15 tejidos diferentes, obteniendo un total de 6 bloques con todos los casos de estudio.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD3 (1:50 Abcam, E.U.) como anticuerpo primario para la identificación de linfocitos T y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD79a (1:300 Dako, E.U.) como anticuerpo primario para identificar linfocitos B. También se evaluó el índice de proliferación de las células neoplásicas con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido hacia la proteína Ki-67, clona MIB-1 (1:100 Dako, E.U.). Las reacciones fueron visualizadas con el sistema MACH 1 Universal Polymer Detection system (BioCare, E.U.). El índice de proliferación se obtuvo mediante el análisis fotográfico a 10 campos diferentes de 40x en cada caso

con el uso del software QuPath (Bankhead y Col, 2017), haciendo un conteo manual de las células neoplásicas observadas en el campo, distinguiendo entre positivas y negativas al marcador ki67, se determinó el porcentaje de marcaje tomando como base lo reportado por Hashmi y Col, 2014.

### **Extracción y cuantificación del ADN**

La extracción del ADN de los bloques de tejido embebido en parafina se realizó colectando de 5-6 cortes del bloque de aproximadamente 5 µm de grosor con el histotomo, los cuales fueron depositados en microtubos para microcentrífuga. El tejido fue desparafinado con xylol y lavado en dos ocasiones en etanol 100% para posteriormente ser procesado con el Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, E.U.) para la extracción de ADN de sangre y tejidos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La concentración de ADN y su grado de pureza fueron analizados por espectrofotometría con el equipo Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, E.U.).

### **PCR para la identificación de ADN proviral del virus de Leucemia Felina**

Para determinar la presencia de material viral en las muestras de tejido embebidas en parafina con diagnóstico histopatológico de linfoma se utilizó la técnica de PCR tiempo real en las muestras y se utilizaron métodos de amplificación previamente descritos (Torres y Col 2005); utilizando los primers y sonda que a continuación se describen:

5´ AGTTCGACCTTCCGCCTCAT 3´

5´ AGAAAGCQGCGCGTACAGAAG 3´

Sonda: FAM-5´ TAAACTAACCAATCCCCATGQCCTCTCGC 3´-TAMRA

Para la reacción se utilizó el Kit FIND-IT Leucemia Felina® (BioTecMol, México) el cual contiene Find-It Leucemia Felina SuperMix PCR-TR 2X\*. (2 viales con 250µl) (oligonucleótidos y sondas TaqMan, ADN Taq Polimerasa, amortiguador, dNTP`s, MgCl<sub>2</sub>, ADN del control interno y H<sub>2</sub>O). La sonda de hidrolisis para la detección del virus de leucemia felina está marcada con FAM/TAMRA (verde). La sonda del control interno está marcada con HEX/BHQ1 (amarillo).

### **Construcción de la curva de cuantificación**

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus de leucemia felina, se amplificaron 4 diferentes concentraciones conocidas de ADN control estándar. Para esto, se realizaron 4 diluciones decuples seriadas a partir de la concentración inicial del ADN control estándar. Fueron colocados 4 tubos con 45 µl de H<sub>2</sub>O y se toman 5 µl del ADN control estándar que se agregó en el primer tubo, se homogeniza la muestra utilizando un agitador tipo vortex y se toman 5 µl para agregarlo al segundo tubo y así sucesivamente como lo muestra la ilustración 2. Para realizar la curva estándar de amplificación, se tomaron 10 µl de cada dilución y se les agregó 10 µl de super Mix PCR-TR para posteriormente aplicar las condiciones recomendadas de amplificación.

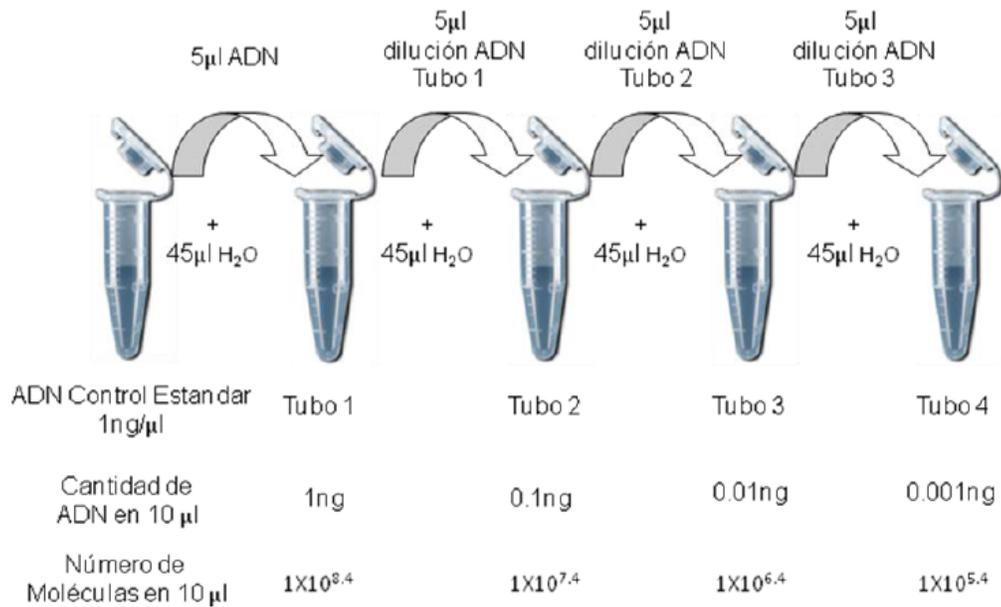


Ilustración 2. Se muestra cómo se realizaron las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioTecMol).

### Procedimiento del ensayo

Fueron añadidos 10 µl de la muestra de ADN previamente cuantificada en diluciones 1:10 y 1:100 o directa cuando la concentración de ADN fuera la mínima necesaria (2.5 ng/ µl). Se agregó 10 µl de la Super Mix PCR-TR 2X. Se sometieron los tubos a amplificación-detección en el equipo termociclador de Tiempo Real (Rotor-Gene Q 5plex HRM System, canales verde y amarillo) con la programación: 42°C por 30 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 45 segundos. Los datos se analizaron en el software Rotor-Gene Q 2.3.1.49

## Amplificación por PCR de las regiones V y J de la cadena $\gamma$ del TCR para la evaluación de clonalidad de linfocitos T

Las secuencias recombinantes del dominio V de la cadena  $\gamma$  del TCR fueron amplificadas siguiendo las recomendaciones de Mochizuki y Col (2012), utilizando cuatro iniciadores sentido complementarios al segmento V del TCR ( $\text{ftcrgv1-2}$ ,  $\text{ftcrgv3}$ ,  $\text{ftcrgv4}$  y  $\text{ftcrgv5}$ ) y tres iniciadores antisentido ( $\text{ftcrgj1}$ ,  $\text{ftcrgj2}$  y  $\text{ftcrgj3}$ ) complementarios al segmento J del TCR y para la amplificación de la región CDR3 (Ilustración 3). Los iniciadores se enlistan en el cuadro 1.

Se prepararon 3 reacciones de PCR, cada tubo con una mezcla de los 4 iniciadores del segmento V del TCR y uno con los iniciadores del segmento J del TCR. Las reacciones se prepararon a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . La mezcla de PCR se compuso por buffer para PCR (biotecmol) 1x, dNTPd (biotecmol) 0.2 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, una mezcla de los 4 iniciadores sentido (0.2 mM por cada uno), ADN del tejido en parafina 250 ng/ $\mu\text{L}$ , un iniciador antisentido 0.2 mM, y TaqPol (biotecmol) 1 U/por reacción.

Las condiciones por ciclo de la PCR consistieron en una fase inicial de desnaturalización de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con un paso de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, con una fase final de extensión a 72°C por 5 minutos. Los productos se corrieron en un gel de poliacrilamida al 20%, utilizando bromuro de etidio como intercalante. La identificación de uno a tres productos de un tamaño aproximado de 100pb fue considerado como clonal.

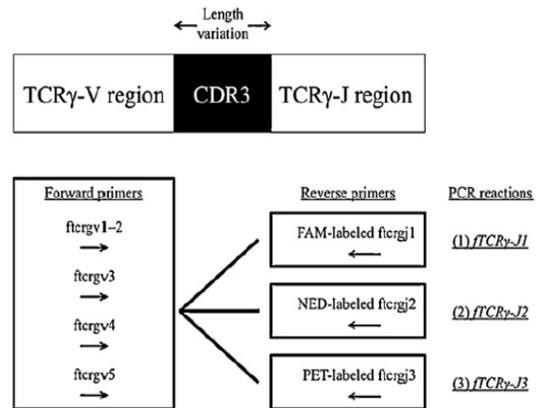


Ilustración 3. Representación esquemática del rearreglo del TCR $\gamma$  y localización de los primers utilizados. Mochizuki (2012) GeneScan analysis to detect clonality of T-cell receptor gene rearrangement in feline lymphoid neoplasms.

ftcrgv1-2	5'-GGSAGAAGAGCGACGAGGGCGTG-3'	Sense
ftcrgv3	5'-GGGCGAAGAGCGATGAGGGAGTG-3'	Sense
ftcrgv4	5'-GTAGTGAGGAGRATGCTGGTCTG-3'	Sense
ftcrgv5	5'-GGCAGAAGCATGACAAGGGCATG-3'	Sense
ftcrgj1	5'-CCCTGAGCAGTGTGCCAGSAC-3'	Antisense
ftcrgj2	5'-GGGGGAGTTACKATGASCTTARTTCC-3'	Antisense
ftcrgj3	5'-ATCCAGATCTCAGGTTTGGGAGGAGG-3'	Antisense

Cuadro 1. Primers utilizados para identificar el TCRG. Mochizuki (2012): *GeneScan analysis to detect clonality of T-cell receptor gene rearrangement in feline lymphoid neoplasms.*

## RESULTADOS

De los 76 casos de linfoma felino analizados, el 58% correspondían a machos, mientras que el 42% restantes fueron hembras. La edad media de presentación del linfoma fue de 7.4 años (DS 5.2) con un valor mínimo de 3 meses y un valor máximo de 20 años. La presentación anatómica más frecuente fue el linfoma alimentario (39%), seguido del linfoma multicéntrico (32%) y en tercer lugar se encontró al linfoma mediastínico (16%), los linfomas epitelial y extranodal fueron encontrados en el 7% de los casos cada uno (Figura 1). El linaje que prevaleció fue de células T (81%), sobre el de células B (19%). La clasificación histopatológica de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) permitió identificar 11 subtipos diferentes de linfoma (Figuras 2-7), siendo la enteropatía asociada a linfoma de células T tipo II (EATL II) la entidad más frecuente.

La presencia de ADN proviral fue encontrada en el 21% de los casos evaluados; la presentación anatómica mediastínico y el grupo etario junior fueron los que mostraron mayor porcentaje de casos positivos a la infección por FeLV (Figuras 8 y 9). El linfoma linfoblástico de células T (T-LBL) fue el subtipo de linfoma, de acuerdo con la clasificación de la OMS, que presentó el mayor número de casos positivos a LeVF.

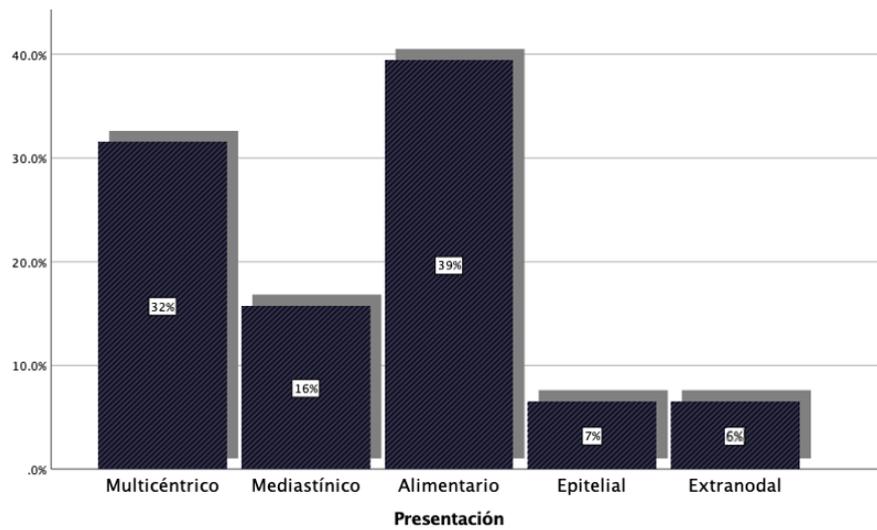


Figura 1. Presentación anatómica de los casos de linfoma felino (2006-2018) en 76 casos analizados.

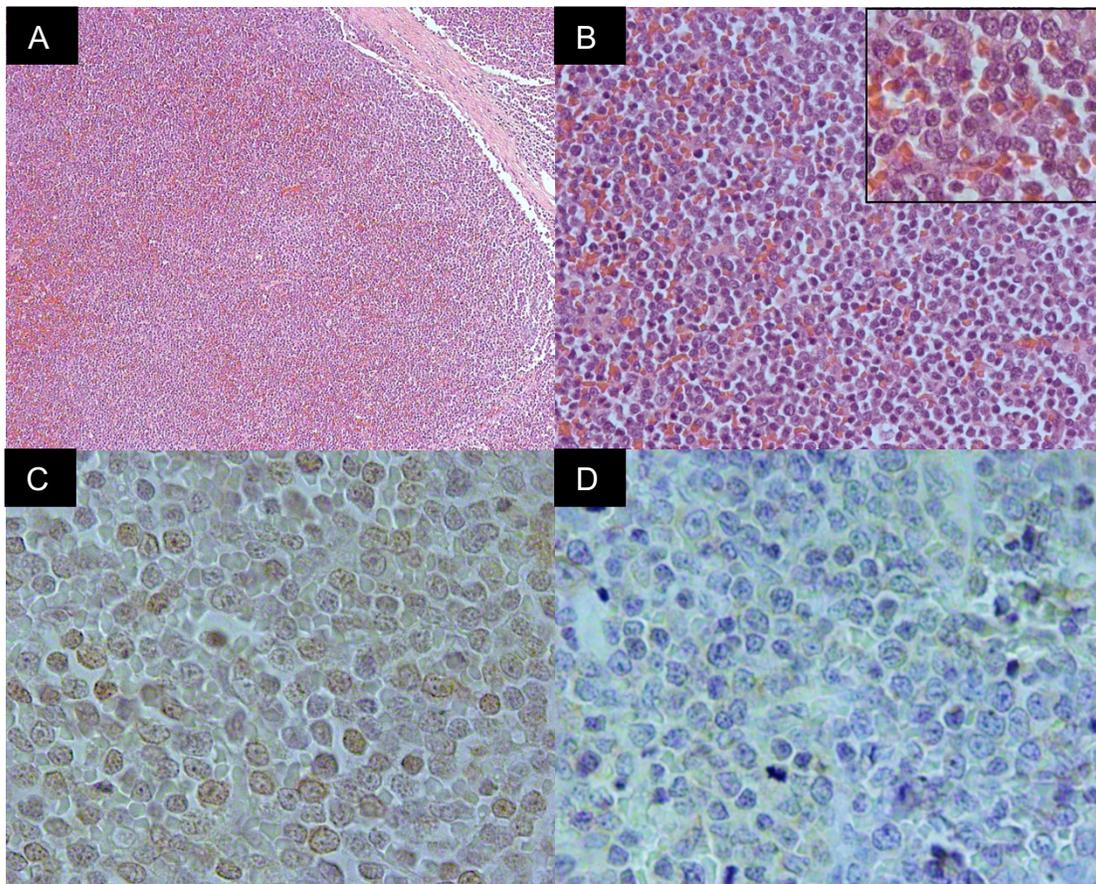


Figura 2. Linfoma Difuso de Células B Grandes (DLBCL). **A.** Las Células neoplásicas se distribuyen de forma difusa en todo el parénquima distorsionando su arquitectura (H&E, 10X). **B.** Grupos de células grandes con escasa cantidad de citoplasma; su núcleo es generalmente redondo con la cromatina abierta y de uno a tres nucléolos (H&E, 40x, 100X) **C.** Las células neoplásicas de tipo B son difusamente positivas para CD79a por inmunohistoquímica **D.** Las células neoplásicas son negativas a CD3 por inmunohistoquímica.

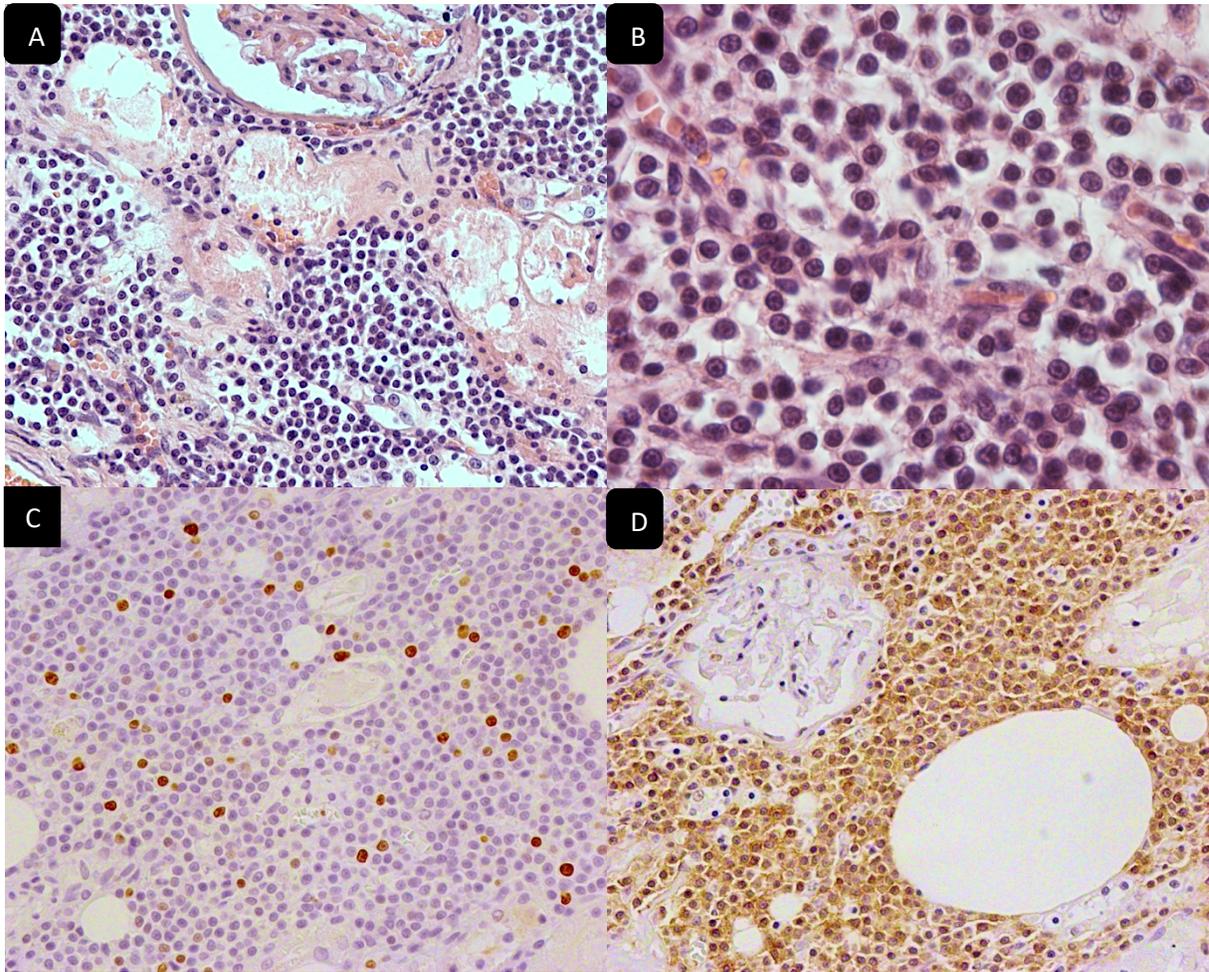


Figura 3. Linfoma de Células B Pequeñas (BSCL). **A.** Infiltración renal de linfocitos neoplásicos pequeños homogéneos que rodean glomerulos dañados (H&E, 40x) **B.** Grupos de células pequeñas con escasa cantidad de citoplasma y núcleo redondo con cromatina condensada (H&E, 100x) **C.** Escasas células neoplásicas marcan positivas para Ki67 mediante inmunohistoquímica, lo cual confirma un bajo índice de proliferación. **D.** Las células neoplásicas son difusamente positivas para CD79a confirmando el linaje de células B.

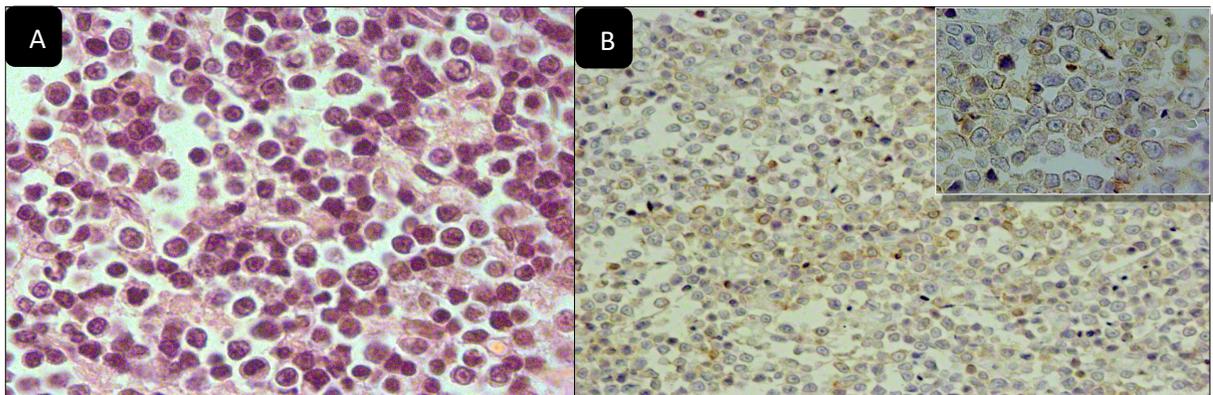


Figura 4. Linfoma Linfoblástico de células T. **A.** Proliferación de células medianas a grandes, con cromatina abierta y nucléolo en ocasiones evidente (H&E, 100x) **B.** En inmunohistoquímica estas células son positivas para CD3 lo que indica linaje de células T.

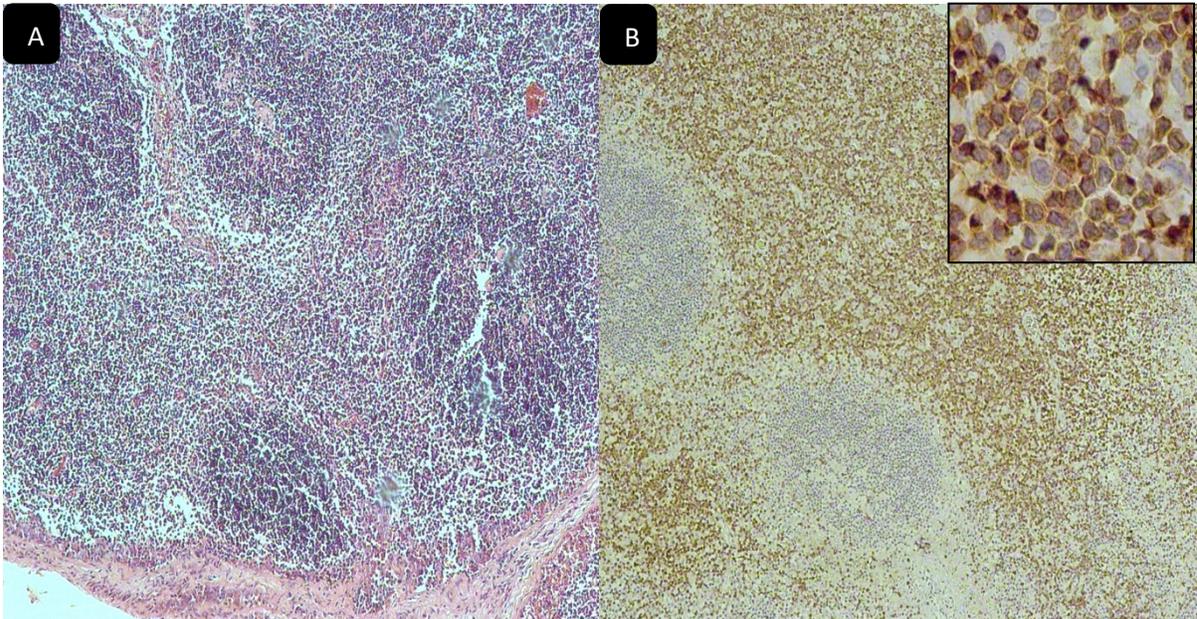


Figura 5. Linfoma de la zona T (TZL). **A.** La proliferación paracortical de las células T neoplásicas ocasiona la compresión y desvanecimiento de los centros germinales (H&E, 10x) **B.** Las células T neoplásicas CD3 positivas, comprimen y recorren a la periferia del linfonodo a los centros germinales (H&E, 10x, 40x).

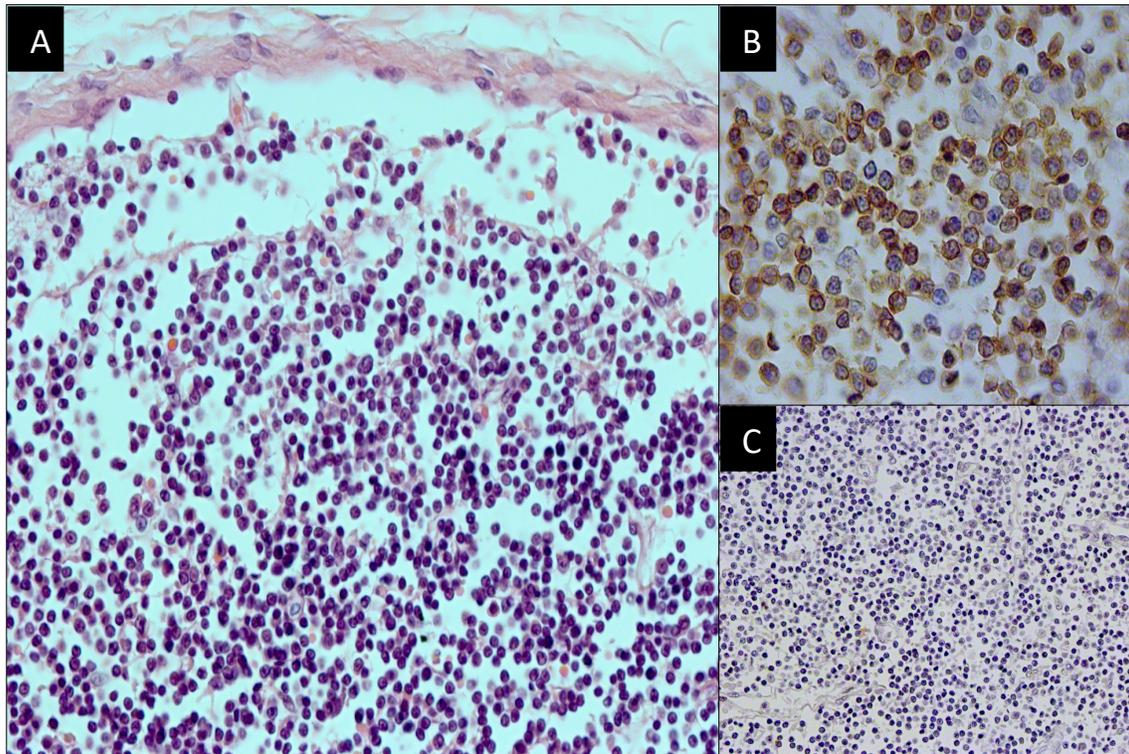
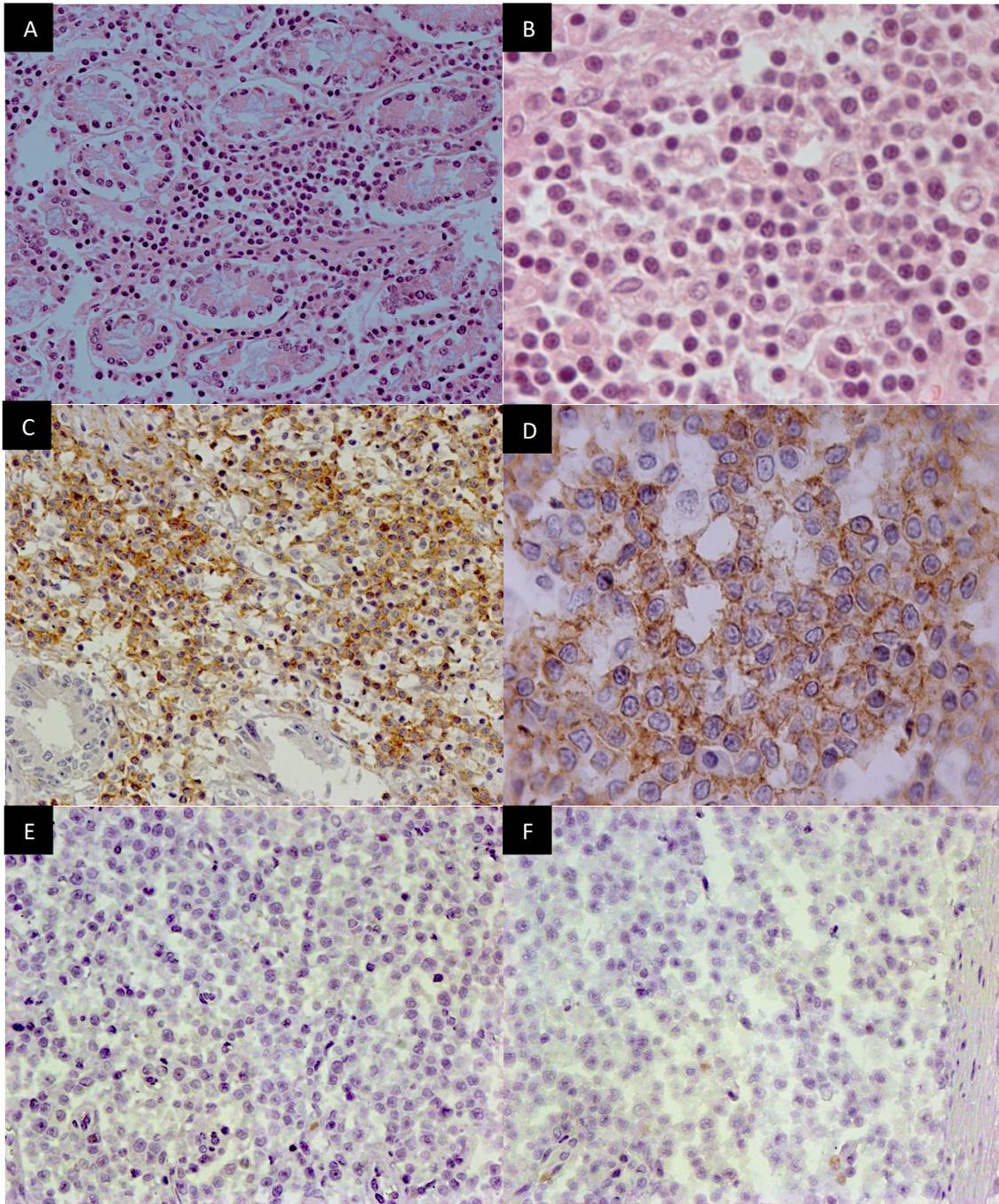


Figura 6. Linfoma de células T Periférico. **A.** Proliferación de células pequeñas, con núcleo pignótico y escasa cantidad de citoplasma (H&E, 40x) **B.** En inmunohistoquímica estas células son positivas para CD3 lo que indica linaje de células T. **C.** El inmunomarcaje para CD79a resulta negativo en este tipo de neoplasias.



*Figura 7. Enteropatía Asociada a Linfoma de Células T tipo II (EATL II). A. Población densa de linfocitos pequeños homogéneos con epiteliotropismo evidente (H&E, 40x) B. Las células neoplásicas tienen morfología de linfocitos pequeños maduros por lo que en ocasiones es difícil diferenciar esta entidad de una enfermedad inflamatoria con base en las características morfológicas (H&E, 100x) C. El epiteliotropismo suele ser más evidente en inmunohistoquímica donde se pueden observar los grupos de células epiteliales rodeadas por linfocitos neoplásicos D. Las células neoplásicas marcan difusamente positivas para CD3 por inmunohistoquímica. E. El inmunomarcaje para CD79a es negativo o en ocasiones se aprecian algunas células infiltrantes. F. El índice de proliferación determinado por el marcador Ki67 suele ser de bajo a nulo en las células neoplásicas.*

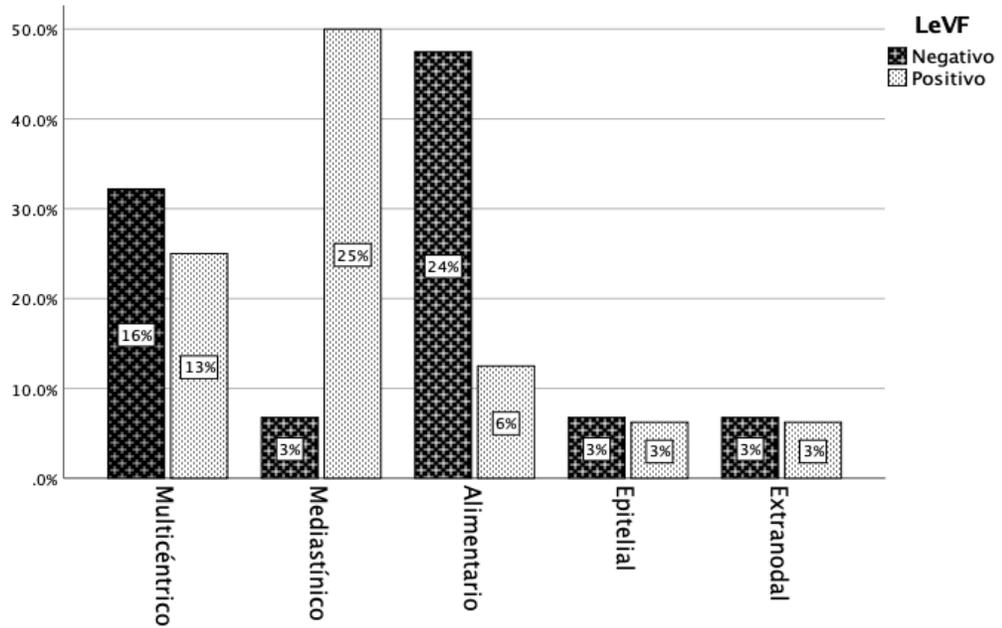


Figura 8. Frecuencia del provirus del virus de leucemia Felina según la presentación anatómica del linfoma.

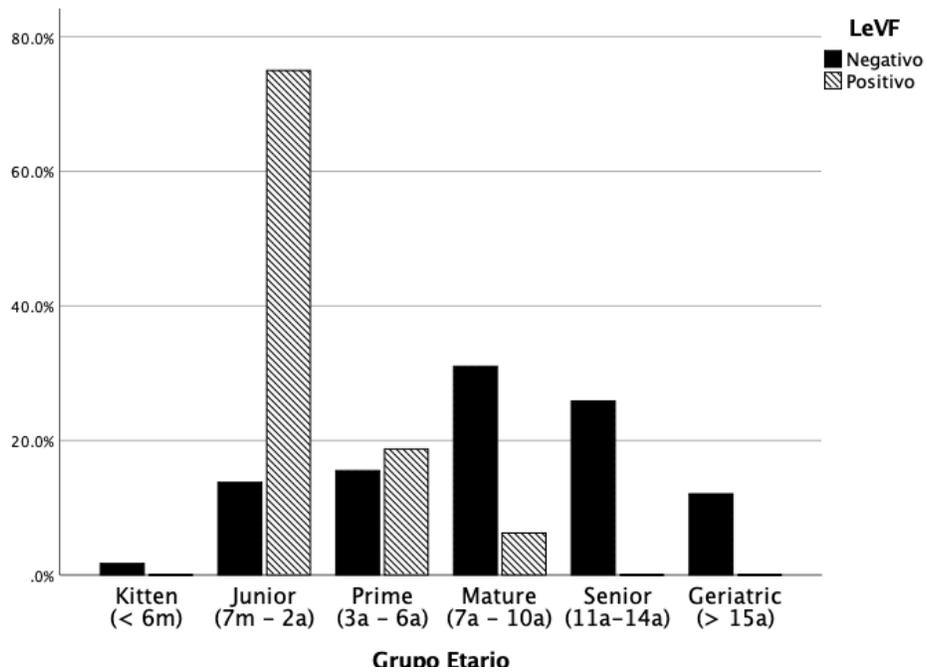


Figura 9. Frecuencia del provirus del virus de leucemia Felina según la edad de los gatos con linfoma.

## DISCUSIÓN

El linfoma comprende un grupo diverso de neoplasias que tienen en común su origen en los linfocitos (Vail, 2020). Antes del control de LeVF en 1980, este virus se asociaba a cerca del 70% de los casos de linfoma felino (Resanka, 1992). En la actualidad se ha visto una disminución importante en la prevalencia de LeVF, reportándose desde un 4% en países como E.U.A y Canadá hasta el 13% en América Latina (Little y Col, 2020), sin embargo, el linfoma sigue siendo considerada la neoplasias más frecuente en los gatos alrededor del mundo (Louwerens y Col, 2005; Beatty J, 2014). La prevalencia de LeVF en casos de linfoma felino presenta diferencias importantes según la región estudiada; mientras que en nuestra población se encontró 21% de los casos positivos a la presencia del provirus de LeVF mediante qPCR, en otra parte de Latino América, se ha reportado hasta un 56% de gatos con linfoma positivos al antígeno en tejido neoplásico (Cristo y Col, 2019). En trabajos realizados en Alemania se ha reportado una prevalencia de 13 y 20% en dos estudios diferentes (Meichner y Col, 2012; Stützer y Col, 2010) y en Australia se reportó en el 26% de los casos (Gabor y Col, 2001). Estos resultados demuestran que en ciertas regiones, sobre todo en países en desarrollo, el virus de LeVF sigue siendo una causa importante de linfoma felino, asociándose a más del 20% de los casos, lo cual va de la mano con la prevalencias de LeVF en estas zonas.

A pesar de no ver una disminución en la frecuencia del linfoma felino asociada a la baja prevalencia de LeVF que se reporta en diferentes estudios alrededor del mundo, sí se ha observado un cambio en la presentación anatómica. En comparación con estudios previos al control vacunal de LeVF donde se reportaba una localización mediastinal y/o multicéntrica con más frecuencia, comúnmente asociada a gatos jóvenes y positivos a LeVF (Morris y Col, 2008; Francis y Col, 1979; Hardy, 1981; Vail y Col, 1998) ahora el linfoma alimentario es el más

reportado, con una media de edad mucho mayor y sin asociación con el virus de leucemia felino (Louwerens y Col, 2005; Weiss y Col, 2010; Moore y Col, 2012; Wolfesberger y Col, 2017-2018; Pohlman y Col 2009; Guzera y Col, 2016). En nuestro estudio también encontramos la presentación alimentaria como la más frecuente (39%), secundada por la presentación multicéntrica (32%) y en tercer y cuarto lugar el linfoma mediastínico y extra nodal con el 16% y 13% respectivamente. La media de edad varió significativamente de acuerdo a la localización anatómica, siendo más baja en el linfoma mediastínico ( $2.1 \pm 2$ ) y la más alta en el linfoma alimentario ( $10 \pm 3.9$ ), similar a lo reportado por otros autores (Cristo y Col, 2019; Morris y Col, 2008; Pohlman y Col, 2009). Cuando se evaluó la presencia del provirus de leucemia felina, se encontró asociación con la localización anatómica y edad de presentación, siendo los linfomas mediastínicos y los gatos del grupo etario junior (<2 años) los que presentaron mayor incidencia del mismo, en línea con lo reportado en la bibliografía (Stützer, 2011; Cristo y Col, 2019; Meichner y Col, 2012; Morris y Col, 2008; Vail y Col, 1998). De acuerdo a Louwerens y Col (2005), los linfomas no asociados a retrovirus, como el de tipo alimentario, son considerados los más frecuentes en la actualidad, sin embargo, las presentaciones multicéntrica y/o mediastínica, asociadas al virus de LeVF aún tienen una frecuencia importante en nuestra población, particularmente en el centro del país.

Aún cuando actualmente la antigua National Cancer Institute Working Formulation (NCI-WF) y el sistema de clasificación de Kiel actualizado, han sido reemplazados por la nueva clasificación de la WHO (REAL/WH) en el estudio y clasificación de los linfomas en animales domésticos (Wolfesberger y Col, 2018), son pocos los reportes que utilizan esta clasificación en el linfoma felino y no existe asociación de algún tipo específico de linfoma con la presencia de LeVF. La mayoría de los estudios que utilizan la clasificación de la WHO en linfomas felinos se han centrado en la evaluación del linfoma alimentario, considerado un linfoma no asociado a retrovirus (Moore y Col, 2012; Wolfesberger y Col, 2018; Pohlman y Col, 2009). Pohlman y

Col (2009) analizaron 50 casos de linfoma alimentario felino y encontraron un predominio de células B (54%), contrario al 18% encontrado en nuestro estudio y otros trabajos que reportan una prevalencia del fenotipo de células T (Vezzali y Col, 2010; Moore y Col, 2012; Wolfesberger y Col, 2017-2018). En ese mismo estudio, se encontró al subtipo DLBCL como el más frecuente, similar a lo reportado por Valli y Col (2000), sin embargo, este último no discriminó por localización anatómica. En otro estudio, a pesar de encontrar al DLBCL como el linfoma más frecuente en gatos, en los linfomas alimentarios el tipo predominante fue EATL (Leite-Filho y Col, 2019), similar a nuestro reporte, donde esta entidad representó cerca del 90% de los linfomas alimentarios y a otros reportes donde también se menciona una prevalencia de linfomas de células T (Vezzali y Col, 2010; Moore y Col, 2012; Wolfesberger y Col, 2017-2018). En concordancia con nuestro trabajo, el EATL, en particular el subtipo II, parece ser el linfoma de localización alimentaria predominante, el cual no se asocia al LeVF y ha mostrado una supervivencia significativamente más alta en los gatos que otros linfomas reportados en el tracto gastrointestinal (Wolfesberger y Col, 2017).

En un estudio realizado por Vezzali y Col (2010) se analizaron 171 casos de linfoma no Hodgkin en perros y gatos y fueron clasificados de acuerdo a la OMS, reportando una prevalencia de neoplasias de células T en gato, similar al 82% que nosotros encontramos. El subtipo más frecuente en ese trabajo fue el linfoma intestinal de células T (EATL) (n=16), seguido del linfoma periférico de células T (PTCL) (n=11) y en tercer lugar se encontró al linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) (n=5); similar a estos resultados, nosotros encontramos a la enteropatía asociada a linfoma de células T de tipo dos (EATLII) como la más frecuente, representando el 32% de los casos (n=24), seguida por el linfoma periférico de células T (PTCL) en el 21% de los casos (n= 16) y en tercer lugar, a diferencia de Vezzali y col, nosotros encontramos al linfoma linfoblástico de células T (T-LBL) representando el 18% de los casos (n=14). Interesantemente el T-LBL no se encontró en ninguno de los casos

evaluados por Vezzali y Col. y mientras que ellos no evaluaron la presencia de partículas virales o el provirus de LeVF, nosotros encontramos una alta frecuencia de LeVF en este tipo de linfoma, representando más del 50% del total de casos positivos al virus, por lo que podemos especular que esta discrepancia se puede asociar a la influencia del LeVF sobre el desarrollo de este tipo de linfoma en nuestra población. Por su parte, en otro estudio realizado en Brasil, donde la prevalencia de LeVF fue mucho mayor (52%), el T-LBL apenas se observó en 3 casos, siendo el DLBCL la entidad más frecuente (n= 54) (Leite-Filho y Col, 2019). Aunque en este caso no se hizo asociación directa entre la presencia del virus y el tipo de linfoma, la localización mediastínica fue la que presentó con mayor frecuencia la presencia del FeLV, similar a nuestros resultados, y a pesar de que la mayoría de los T-LBL que ellos identificaron se encontraron en esta región, el DLBCL fue el subtipo predominante de los casos positivos. Algunos puntos a considerar en ese estudio, son la proporción muy similar de linfomas de tipo B y T en la región con mayor incidencia del virus (mediastinal), donde el PTCL se reportó con más frecuencia; este subtipo se considera como un subtipo no especificado para todos los linfomas de células T que no logran ser clasificados adecuadamente en otros de los subtipos (Valli y Col, 2015), interesantemente en el presente estudio solo un PTCL fue positivo a LeVF. Ha pesar de que la morfología celular y localización anatómica, así como la distribución y fenotipo son las herramientas principales para la clasificación de acuerdo a la OMS, en ocasiones es complicado diferenciar entre subtipos y el uso del marcador de proliferación como Ki67, en nuestro caso, ayudó en la identificación de los linfomas del subtipo T-LBL, donde se observó una proliferación mucho mayor que en el resto de los linfomas, incluyendo al PTCL, lo que correlaciona con lo reportado en la literatura (Valli y Col, 2015; Hashmi y Col, 2014). Debido a lo anterior no descartamos que los casos de T-LBL en la clasificación de Leite-Filho y Col (2019) pudieran haber sido incluidos en el subtipo PTCL. También es importante mencionar que la técnica de IHQ para la identificación de LeVF ha sido cuestionada para analizar el status viral en los linfomas felinos debido a que no

considera la mutagénesis insercional por la propia inserción del provirus sin necesidad de un estado replicativo (Weiss y Col, 2010).

En otro estudio, el cual no utilizó la clasificación de la OMS, se encontró una prevalencia similar de LeVF en linfomas de alto grado con ambos fenotipos (Chino y Col, 2013). Estas variaciones en el fenotipo, en los casos de linfoma asociados a LeVF, podrían estar relacionadas a un diferente potencial patológico de la variante genética del virus predominante en las regiones de estudio (Bolin y Col, 2011). A pesar de que más estudios son necesarios para esclarecer si existe influencia de LeVF en el desarrollo específico de algún subtipo de linfoma de acuerdo a la clasificación realizada por la OMS; nuestros hallazgos sugieren que el T-LBL pudiera estar relacionado a un origen retroviral, lo cual se respalda por la literatura que ha encontrado una asociación de los linfomas de alto grado, típicamente de células T, presentes en la forma anatómica multicéntrica o mediastinal en gatos jóvenes con la infección viral (Weiss y Col, 2010; Rezanka y Col, 1992; Beatty, 2014; Francis y Col, 1979; Tsatsanis y Col, 1994) y por la asociación que se ha hecho de variantes genéticas específicas del virus con el desarrollo de linfomas de células T en timo (Bolin y Col, 2011).

Solo existe un estudio que ha valorado el potencial pronóstico de la clasificación de la OMS en los linfomas en gatos, el cual concluyó que esta clasificación provee información más detallada que solo etiquetar los tumores como de bajo, mediano o alto grado, sin embargo, no determinó repercusiones en la elección del tratamiento (Wolfesberger y Col, 2017); desafortunadamente, en nuestro estudio no se incluyó el seguimiento de los pacientes, ni su manejo terapéutico, por lo que muy poca información podemos aportar al respecto.

La influencia de LeVF en el desarrollo de linfoma varía considerablemente de acuerdo a la región donde se evalúa esta asociación y debe considerarse la

influencia de las variantes genéticas del virus en su potencial patológico. En la población estudiada en el presente trabajo se puede apreciar una influencia importante de LeVF en el desarrollo de esta neoplasia en gatos jóvenes, con una presentación multicéntrica y mediastinal, que corresponden frecuentemente con el T-LBL de acuerdo a la clasificación de la OMS. A pesar de que este subtipo no ha sido descrito con frecuencia en los escasos reportes que existen sobre el uso de la clasificación en felinos, se especula que pudiera estar agrupado en los PTCL, entidad que se reporta con más frecuencia y funciona como un diagnóstico no específico para todos los linfomas de células T que no logran ser clasificados adecuadamente. En humanos este subtipo se reporta más frecuente en niños y en forma de linfoma y/o leucemia, mostrando similitudes al proceso observado en los casos de linfoma/leucemia secundarios al virus de LeVF. La EATL se reporta como el linfoma más frecuente en gatos y aparentemente no existe asociación con el virus de LeVF. El uso de la clasificación de la OMS nos ayuda a dejar de ver al linfoma como una sola entidad y contemplarlo como un grupo de neoplasias diferentes con características patológicas y clínicas distintas. Conforme más estudios de este tipo sean realizados, más podremos entender sobre la prevalencia, patogenia, pronóstico y tratamiento para cada uno de los tipos de linfoma felino.

## REFERENCIAS

- Louwerens M, London CA, Pedersen NC, Lyons LA. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med.* 2005;19(3):329–35.
- Stützer B, Simon K, Lutz H, Majzoub M, Hermanns W, Hirschberger J, et al. Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. *J Feline Med Surg.* 2011;13(2):81–7.
- Hartmann K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus. *Infection. Veterinary Immunology and Immunopathology* 143 (2011) 190–201.
- Hofmann-Lehmann R, Cattori V, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Riond B, et al. How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;123(1–2):119–23.
- Gabor LJ, Canfield PJ, Malik R. Immunophenotypic and histological characterisation of 109 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J.* 1999;77(7):436–41.
- Valli VE, Jacobs RM, Norris A, Couto CG, Morrison WB, McCaw D, et al. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagnostic Investig.* 2000;12(4):295–306.
- Vezzali E, Parodi AL, Marcato PS, Bettini G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol.* 2010;8(1):38–49.
- Wolfesberger B, Fuchs-Baumgartinger A, Greß V, Hammer SE, Gradner G, Knödl K, et al. World Health Organisation Classification of Lymphoid Tumours in Veterinary and Human Medicine: a Comparative Evaluation of Gastrointestinal Lymphomas in 61 Cats. *J Comp Pathol.* 2018;159:1–10.
- Meichner K, Kruse BD, Hirschberger J, Hartmann K. Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. *Vet Rec.* 2012;171(14):348.
- Beatty J. Viral causes of feline lymphoma: Retroviruses and beyond. *The Veterinary Journal* (2014) 174–180.
- Weiss A, Klopffleisch R, Gruber AD. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. *Journal of Feline Medicine and Surgery* (2010) 12, 929-935. [doi:10.1016/j.jfms.2010.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.07.006)
- Galdo Novo S, Bucafusco D, Diaz LM, Bratanich AC. Viral diagnostic criteria for Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus infections in domestic cats from Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* (2016) 48 (4): 293 -297. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.07.003>.
- Cavalcante, L.T.F.; Muniz, C.P.; Jia, H.; Augusto, A.M.; Troccoli, F.; Medeiros, S.d.O.; Dias, C.G.A.; Switzer, W.M.; Soares, M.A.; Santos, A.F. Clinical and Molecular Features of Feline Foamy Virus and Feline Leukemia Virus Co-Infection in Naturally-Infected Cats. *Viruses* (2018) 10, 702. <https://doi.org/10.3390/v10120702>
- Cristo TG, Biezu G, Noronha LF, Pereira LHHS, Withoef JA, Furlan L V., et al. Feline Lymphoma and a High Correlation with Feline Leukaemia Virus Infection in Brazil. *J Comp Pathol.* 2019;166:20–8.
- Kanafany GR, Ramírez DG, Lima MA. Frecuencia del virus de leucemia viral felina en tres laboratorios de la Ciudad de México. 2006. UNAM, dirección general de biblioteca de bibliotecas, tesis digitales (Licenciatura).
- Ortega-Pacheco A, Aguilar-Caballero AJ, Colin-Flores RF, Acosta V, Eugenia KY, Guzman-Marin and Jimenez-Coello M. Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2014, Vol. 16(6) 460–464.
- Fonseca AWF, Salas GG, Cedillo PC. Diagnóstico inmunohistoquímico de leucemia viral felina en tejidos de gatos con enfermedad linfoproliferativa. 2007. UNAM, dirección general de biblioteca de bibliotecas, tesis digitales (Licenciatura).

Autran MM, Martínez RHA, Caballero CHS, Álvarez RH. Uso de las técnicas de PCR para confirmar el diagnóstico de leucemia viral felina y el análisis filogenético de los productos amplificados. 2014. UNAM, dirección general de biblioteca de bibliotecas, tesis digitales (Maestría).

Pérez-Enriquez JM, García OLE, Romero RLP, Carrasco RA, Aguayo AO. Uso de los marcadores CD79a y CD3 en la tipificación inmunológica de leucemia linfoblástica, secundaria al virus de leucemia viral felina. *Clínica Veterinaria*, abordaje diagnóstico y terapéutico, Vol. 3, No. 1, Enero-Abril 2017. <http://revistas.fmvz.unam.mx/index.php/Clinica-Veterinaria>.

Petterson-Kane JC, Kugler BP, Francis K. The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. *J Comp Pathol*. 2004;130:220–2. DOI: 10.1016/j.jcpa.2003.09.008.

Guzera M, Cian F, Leo C, Winnicka A, Archer J. The use of flow cytometry for immunophenotyping lymphoproliferative disorders in cats: a retrospective study of 19 cases. *Vet Comp Oncol*. 2016;14:40–51.

Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;123(1–2):138–43.

Cattori V, Tandon R, Pepin A, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Rapid detection of feline leukemia virus provirus integration into feline genomic DNA. *Mol Cell Probes*. 2006;20(3–4):172–81.

Hofmann-Lehmann R, Cattori V, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Riond B, et al. How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;123(1–2):119–23.

Jackson ML, Wood SL, Misra V, and Haines MD. Immunohistochemical Identification of B and T Lymphocytes in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Feline Lymphosarcomas: Relation to Feline Leukemia Virus Status, Tumor Site, and Patient Age *Can J Vet Res* 1996; 60: 199-204.

Bolin LL, Levy LS. Viral determinants of FeLV infection and pathogenesis: Lessons learned from analysis of a natural cohort. *Viruses*. 2011;3(9):1681–98.

Abujamra AL, Spanjaard RA, Akinsheye I, Zhao X, Faller DV, Ghosh SK. Leukemia virus long terminal repeat activates NFkappaB pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology*. 2006 Feb 20;345(2):390-403. doi: 10.1016/j.virol.2005.10.003.

Chandhasin C, Lobelle-Rich P, Levy LS. Feline leukaemia virus LTR variation and disease association in a geographical and temporal cluster. *J Gen Virol*. 2004;85:2937–42. doi: [10.1099/vir.0.80149-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.80149-0).

Athasb GB, Choi B, Prabhu S, Lobelle-Rich PA, Levy LS. Genetic Determinants of Feline Leukemia Virus-Induced Multicentric Lymphomas. *Virology*. 1995; 214 (2): 431-438. doi: [10.1006/viro.1995.0053](https://doi.org/10.1006/viro.1995.0053).

Parodi AL. Classification of Malignant Lymphoma in domestic Animals: History and Conceptual Evolution. *European Journal of Veterinary Pathology*. 2001; 7 (2).

Jaffe ES, Lee HN, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008; 112 (12): 4384–4399. doi: [10.1182/blood-2008-07-077982](https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-077982)

Valli VEO, Kiupel M, Bienzle D, Wood R, Chapter 2 - Hematopoietic System, (Eds) M. Grant Maxie, Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 3 (Sixth Edition). W.B. Saunders. 2016; 102-268.e1. doi: [10.1016/B978-0-7020-5319-1.00013-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5319-1.00013-X).

Waly NE, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR, Day MJ. Immunohistochemical Diagnosis of Alimentary Lymphomas and Severe Intestinal Inflammation in Cats. *J Comp Pathol*. 2005;133(4):253-60.

Pohlman LM, Higginbotham ML, Welles EG, Johnson CM. Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol*. 2009;46(2):259–68.

Briscoe KA, Krockenberger M, Beatty JA, Crowley A, Dennis MM, Canfield PJ, et al. Histopathological and Immunohistochemical Evaluation of 53 Cases of Feline Lymphoplasmacytic Enteritis and Low-Grade Alimentary Lymphoma. *J Comp Pathol*. 2011;145(2-3):187-98.

Moore PF, Rodriguez-Bertos A, Kass PH. Feline Gastrointestinal Lymphoma: Mucosal Architecture, Immunophenotype, and Molecular Clonality. *Vet Pathol*. 2012;49(4):658–68.

Wolfeberger B, Skor O, Hammer SE, Flickinger I, Kleiter M, Rütgen BC, et al. Does categorisation of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats? *J Feline Med Surg*. 2017;19(8):897–906.

Wolfeberger B, Fuchs-Baumgartinger A, Greß V, Hammer SE, Gradner G, Knödl K, et al. World Health Organisation Classification of Lymphoid Tumours in Veterinary and Human Medicine: a Comparative Evaluation of Gastrointestinal Lymphomas in 61 Cats. *J Comp Pathol*. 2018;159:1–10.

Langerak AW, Toward Standardization of Clonality Testing in Veterinary Medicine. *Veterinary Pathology*. 2016; 53 (4) 705-706. doi: [10.1177/0300985816638724](https://doi.org/10.1177/0300985816638724).

Andrews C, Operacz M, Maes R, Kiupel M. Cross Lineage Rearrangement in Feline Enteropathy-Associated T-Cell Lymphoma. *Veterinary Pathology*. 2016; 53 (3): 559 – 562. doi: [10.1177/0300985815595518](https://doi.org/10.1177/0300985815595518).

Weiss A, Klopfeisch R, Gruber AD. T-Cell Receptor  $\gamma$  Chain Variable and Joining Region Genes of Subgroup 1 are Clonally Rearranged in Feline B- and T-Cell Lymphoma. *Journal of Comparative Pathology*. 2011. 144 (2-3). doi: [10.1016/j.jcpa.2010.08.001](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.08.001).

Werner JA, Woo JC, Vernau W, Graham PS, Grahn RA, Lyons LA, Moore PF. Characterization of Feline Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes for the Molecular Diagnosis of B-cell Neoplasia. *Veterinary Pathology*. 2005. 42 (5). doi: [10.1354/vp.42-5-596](https://doi.org/10.1354/vp.42-5-596).

Sato H, Fujino Y, Uchida K, Ohno K, Nakayama H. and Tsujimoto H. Comparison between immunohistochemistry and genetic clonality analysis for cellular lineage determination in feline lymphomas. *J. Vet. Med. Sci*. 2011. 73: 945–947.

Bankhead, P. et al. *QuPath: Open source software for digital pathology image analysis*. *Sci. Rep*. 7, 16878 (2017) <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17204-5>

Hashmi AA, Hussain ZF, Faridi N, Khurshid A. Distribution of Ki67 proliferative indices among who subtypes of non-hodgkin's lymphoma: Association with other clinical parameters. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(20):8759–63.

Torres AN, Mathiason CK, Hoover EA. Re-examination of feline leukemia virus: Host relationships using real-time PCR. *Virology*. 2005;332(1):272–83. doi: [10.1016/j.virol.2004.10.050](https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.050).

Mochizuki H, Nakamura K, Sato H, Goto-Koshino Y, Sato M, Takahashi M, et al. GeneScan analysis to detect clonality of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement in feline lymphoid neoplasms. *Vet Immunol Immunopathol*. 2012;145(1–2):402–9. doi: [10.1016/j.vetimm.2011.12.015](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.12.015).

Vail D, Pinkerton M, Young M. Hematopoietic Tumors. In: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM, (Eds) *Withrow & MacEwens's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier; 2020. 791–797.

Rezanka LJ, Rojko JL, Neil JC. Feline leukemia virus: Pathogenesis of neoplastic disease. *Cancer Invest*. 1992;10(5):371–89.

Little S, Levy J, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Hosie M, Olah G, et al. 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *J Feline Med Surg*. 2020;22(1):5–30.

Beatty J. Viral causes of feline lymphoma: Retroviruses and beyond. *Vet J*. 2014;201(2):174–80.

Cristo TG, Biezu G, Noronha LF, Pereira LHHS, Withoef JA, Furlan L V., et al. Feline Lymphoma and a High Correlation with Feline Leukaemia Virus Infection in Brazil. *J Comp Pathol*. 2019;166:20–8. doi: [10.1016/j.jcpa.2018.10.171](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.10.171).

Meichner K, Kruse BD, Hirschberger J, Hartmann K. Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. *Vet Rec*. 2012;171(14):348.

Stützer B, Müller F, Majzoub M, Lutz H, Greene CE, Hermanns W, et al. Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. *J Vet Intern Med*. 2010;24(1):192–7.

Gabor LJ, Jackson ML, Trask B, Malik R, Canfield PJ. Feline leukaemia virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J*. 2001;79(7):476–81.

Morris J, Dobson J. *Small Animal Oncology*. Small Animal Oncology. wiley; 2008. 1–298 p.

Francis DP, Cotter SM, Essex M, Hardy WD. Comparison of Virus-positive and Virus-negative Cases of Feline Leukemia and Lymphoma 1. *Cancer Res*. 1979;39(10):3866–70.

Hardy WD. FeLV Hematopoietic Tumors of cats JAAHA 17,921-940,1981.pdf. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1981;19.

Vail DM, Moore AS, Ogilvie GK, Volk LM. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med*.

1998;12(5):349–54.

Pohlman LM, Higginbotham ML, Welles EG, Johnson CM. Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Pathol.* 2009;46(2):259–68.

Morris J, Dobson J. *Small Animal Oncology.* Blackwell Science Ltd. 2008. 228-251. Doi: [10.1002/9780470690406](https://doi.org/10.1002/9780470690406).

Leite-Filho R V., Panziera W, Bandinelli MB, Henker LC, da Conceição Monteiro K, Corbellini LG, et al. Epidemiological, pathological and immunohistochemical aspects of 125 cases of feline lymphoma in Southern Brazil. *Vet Comp Oncol.* 2019; 1-7. Doi: [10.1111/vco.12535](https://doi.org/10.1111/vco.12535).

Chino J, Fujino Y, Kobayashi T, Kariya K, Goto-Koshino Y, Ohno K, et al. Cytomorphological and immunological classification of feline lymphomas: Clinicopathological features of 76 cases. *J Vet Med Sci.* 2013;75(6):701–7

## **CAPITULO II**

### **Secuenciación e identificación de los subtipos de LeVF implicados en el desarrollo de linfoma felino**

- Objetivo: someter las muestras de los casos de linfoma donde se haya aislado el virus de LeVF a secuenciación para identificar el subtipo involucrado y posibles variantes.

## Introducción

El virus de la leucemia viral felina (LeVF) fue descrito por primera vez por William Jarrett y colaboradores en 1964, cuando se observó la salida de partículas virales de la membrana de linfoblastos malignos de un gato con linfoma natural (Jarrett et al 1964). Se trata de un virus ARN del género *Gammaretrovirus*, de la familia *Retroviridae*; compuesto de una molécula lineal de ARN de 8.3 kb, de donde se identifican tres genes principales, *gag*, *pol* y *env*, flanqueados por regiones long terminal repeat (LTR) (Figura 1); el gen *gag* codifica los antígenos grupo-específicos de la cápside (p27), nucleocápside y matriz, *pol* codifica para las enzimas proteasa (PT), integrasa (IN) y transcriptasa reversa (TR), y *env* codifica las proteínas de envoltura, la de superficie (SU) y transmembranal (p15e) (Chiu 2018, Komina 2019). Su transcripción es regulada por 5'-LTR y contiene dos marcos de lectura abierto (ORFs): uno para los genes *gag* y *pol*, otra para el gen *env* (Komina 2019). Su ARN es transcrito reversamente a ADN de doble cadena el cual posteriormente es integrado al genoma de la célula infectada (provirus) con la ayuda de una integrasa. Después ocurre la síntesis de proteínas virales con el ensamblaje del virión cerca de la membrana celular y su posterior salida por gemación de la célula hospedera (Greene and Sykes 2013).

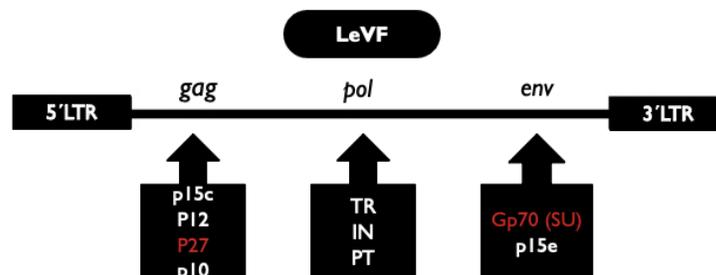


Figure 1. Mapa genómico del virus de leucemia felina y las proteínas que expresa

## Retrovirus endógenos

Los retrovirus endógenos (ERVs) se desarrollaron a través de la infección de células germinales del huésped por retrovirus exógenos, los cuales fueron transmitidos como componentes genéticos a la descendencia del huésped, considerándose remanentes de infecciones antiguas por retrovirus exógenos. En diferentes estudios se ha demostrado el rol que tienen estos retrovirus endógenos en el desarrollo de enfermedad, secundaria a retrovirus exógenos, como el de leucemia felina.

Los retrovirus endógenos del gato doméstico (ERV-DC) son un grupo de *Gammaretrovirus* endógenos en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*) con una estructura genómica simple que codifica una poliproteína Gag-Pol y una proteína Env en un genoma viral de aproximadamente 8.8 kb, sus provirus se clasifican filogenéticamente en tres genotipos (GI, GII y GIII). El gen *env* GI se ha transducido en el virus de la leucemia felina (FeLV), generando un nuevo subgrupo de interferencia: el subgrupo D de FeLV (FeLV-D). Los provirus GII codifican un factor antiviral, Refrex-1, que inhibe específicamente las infecciones ERV-DC GI y FeLV-D (Kawasaki, 2018). El FeLV endógeno (enFeLV) es otro provirus de replicación defectuoso que se encuentra en el gato doméstico. Tanto el FeLV endógeno y exógeno son aproximadamente 86% similares en las secuencias de nucleótidos, las diferencias se encuentran en los genes *gag* y *env* como cambios de un solo nucleótido e inserciones/delecciones, otra diferencia son las mutaciones silenciosas acumuladas en regiones terminales 3' únicas de la LTR; si bien, este retrovirus endógeno no induce enfermedad en el huésped, es muy relevante para la biología de los gatos domésticos (Chiu, 2018). La expresión del ADN del provirus se limita a las transcripciones subgenómicas que evitan el ensamblaje de virus infecciosos, sin embargo, los fragmentos de ADN del enFeLV se pueden recombinar con el FeLV exógeno, lo que da como resultado virus recombinantes que causan enfermedad. Durante la infección por FeLV-A en gatos domésticos, a menudo se produce la recombinación entre enFeLV y FeLV-A codificados por el huésped en la región *env*, lo que da como resultado la producción del subtipo FeLV-B. Se ha descrito que el

FeLV-B ocurre en aproximadamente la mitad de los gatos infectados con FeLV-A y los gatos virémicos con FeLV-A y FeLV-B tienen un mayor riesgo de desarrollar linfoma que los gatos con FeLV-A solo (Powers 2018, Willett 2013, Chiu 2018).

### **Subtipos virales de LeVF**

Los LeVF exógenos (trasmisibles/infecciosos) han sido clasificados en diferentes grupos, variando en la secuencia genética de su gen *env* y en la especificidad del receptor que utilizan (Komina 2019). Los subtipos A, B y C fueron los primeros subgrupos identificados utilizando ensayos de interferencia viral y eventualmente se asociaron con fenotipos clínicos específicos (Chiu 2018).

Mientras que el subtipo A se considera el más común en la transmisión horizontal (Steward 1986), el subtipo B parece tener una influencia mayor en el desarrollo de linfoma en los gatos infectados (Chiu, 2018, Steward 1986, Jarret 1978-2). El subtipo C se considera raro y se ha aislado principalmente en casos con anemia aplásica, lo cual se asocia al tipo de receptor que utiliza (Steward 1986, Komina 2019).

Adicionalmente a estos subgrupos, se ha descrito uno diferente, capaz de ocasionar un desorden inmunosupresor fatal en el gato, conocido como FAIDS (Feline acquired immune deficiency syndrome); este subtipo ha demostrado un tropismo importante hacia linfocitos T, por lo cual fue designado como el subtipo T (Komina 2019).

El objetivo del presente capítulo era identificar el subtipo predominante en las muestras de linfoma que resultaron positivas al virus de leucemia felina y obtener la secuenciación parcial del gen *env* y la región 5´LTR para identificar posibles variantes relacionadas. Con los resultados se busca proponer posibles pruebas que ayuden a identificar estas variantes y hacer una diferenciación del subtipo que afecta a un gato infectado de LeVF como posible factor pronóstico.

## **CAPITULO III**

### **Evaluación de parámetros hematológicos y poblaciones linfocitarias en el desarrollo y desenlace de la infección por el virus de leucemia felina (LeVF)**

- Objetivo: evaluar de forma prospectiva, mediante hematología y citometría de flujo, si existen patrones tempranos en la cinética y características de los leucocitos que permitan predecir el desarrollo de desórdenes linfoproliferativos en gatos infectados con LeVF.

## **Introducción**

El virus de leucemia felina es un *Gammaretrovirus* frecuente que infecta naturalmente a los gatos domésticos y se asocia con enfermedades degenerativas del sistema hematopoyético, inmunodeficiencias y neoplasias (Flynn y Col 2002).

Pese a los calendarios de vacunación y una disminución importante en los desórdenes linfoproliferativos asociados al virus, el papel de LeVF en México no ha sido estudiado a detalle.

La infección por LeVF puede resultar en diferentes escenarios, incluyendo una infección latente; en este estado, los animales se caracterizan por la ausencia de antigenemia, pero con presencia de ADN proviral en sangre periférica y médula ósea. Este estado latente puede ser reactivado en estados de inmunosupresión del huésped (Weiss y Col 2010).

A pesar de que el desarrollo fatal del proceso viral es bien conocido y temido, muy poco se conoce de la fase predecesora asintomática, la cual puede durar muchos años (Hofmann-Lehmann y Col 1997).

Hoy en día, el diagnóstico de leucemia y linfoma es fácil, rápido y de mínima invasión, gracias a herramientas como la citometría de flujo ampliamente utilizadas en oncología humana y en medicina veterinaria, particularmente en perros (Martini et al 2018). En otras especies, como los gatos, esta técnica es limitada por la restricción en el panel de anticuerpos y el papel pronóstico aún inespecífico del inmunofenotipo (Guzera y Col 2014). El presente trabajo pretende estandarizar un protocolo de citometría de flujo que nos permita evaluar las distintas poblaciones linfocitarias en gatos positivos al virus de LeVF y encontrar patrones tempranos que nos pudieran ayudar a predecir la evolución de la infección, así como identificar posible relación con la carga viral.

## **ANEXO**

## Tumor prevalence in cats: experience from a reference diagnostic center in Mexico City (2006-2018)

Juan Miguel Pérez-Enriquez<sup>1</sup>

 0000-0001-6363-2927

Laura Romero-Romero<sup>1,\*</sup>

 0000-0002-1717-7596

Rogelio Alejandro Alonso-Morales<sup>2</sup>

 0000-0002-4159-1682

Ezequiel M. Fuentes-Panán<sup>3</sup>

 0000-0003-2872-0459

<sup>1</sup>Departamento de Patología,  
Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM,  
Ciudad de México, México

<sup>2</sup>Departamento de Genética y Bioestadística,  
Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM,  
Ciudad de México, México

<sup>3</sup>Unidad de Investigación en Virología y Cáncer,  
Hospital Infantil de México "Federico Gómez",  
Ciudad de México, México

\*Corresponding authors:  
Email address:  
[lromeror@unam.mx](mailto:lromeror@unam.mx)

### Abstract

Records of referred cat cases received for diagnosis in the Department of Pathology of the National Autonomous University of Mexico, School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry between 2006 and 2018, were reviewed to examine frequency of occurrence of neoplasms and associated demographic factors. To this end, the records of biopsies, necropsies and clinical information were analyzed to obtain data on animal sex and age, as well as neoplasm histotype, tissue of origin, and malignant/benign biological behavior. A total of 685 neoplasm cases were diagnosed during the study period, which represented 37.7% of all referred histopathological domestic cat cases. Epithelial neoplasms were the most prevalent (56% of cases), followed by mesenchymal tumors (27%), and hematopoietic and lymphoreticular neoplasms (17%). The most common tumor type was carcinoma (31%), followed by sarcoma (14%), adenocarcinoma (13%), lymphoma (13%), and adenoma (6%). Squamous cell carcinoma was the most frequent form of carcinoma (117 cases), followed by lymphoma (88 cases), and spindle cell sarcoma (56 cases). Approximately 85% of all cases corresponded to malignant neoplasms. A relationship between sex and histogenesis was observed, but there was no gender association with malignant behavior. Also, hematopoietic/lymphoreticular tumors occurred more frequently at an early age, than other types of neoplasms. To the extent of our knowledge, this is the first epidemiological report indicating the most common neoplasms in a Mexican domestic cat population.

Published: 2020-12-18

© Copyright 2020  
Juan Miguel Pérez-Enriquez et al.

open access 



Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

### Cite this as:

Pérez-Enriquez JM, Romero-Romero L, Alonso-Morales RA, Fuentes-Panán EM. Tumor prevalence in cats: experience from a reference diagnostic center in Mexico City (2006-2018). *Veterinaria México OA*. 2020;7(4). doi: [10.22201/fmvz.24486760e.2020.4.837](https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2020.4.837)

## Introduction

Cancer is a common disease and one of the most important causes of death in domestic animals.<sup>1</sup> Although precise data on the incidence of tumors in dogs and cats is lacking, conservative estimates suggest that one in every ten dogs or cats will develop a tumor during their lifetime. While human cancer records have existed and evolved since 1940, veterinary registers have been brief and sporadic.<sup>2,3,4</sup> One of the oldest accounts, that considers a reference study of many years, is The California Animal Neoplasm Registry, which started in 1963 to identify all diagnosed neoplasms in animals in the San Francisco Bay Area and Alameda and Contra Costa counties.<sup>5,6</sup> At present, different worldwide records exist, showing that cancer is the cause of death in approximately 15-30% of dog and 26% of cat populations. However, there are deviations from these numbers depending on the reported period and the geographic region.<sup>2</sup> One of the largest studies in feline populations was carried out in Switzerland by Graf et al (2015) and reports a 34.79% of neoplasm cases in cats in a 43-year period (1965-2008).<sup>3</sup> Another equally relevant report was undertaken in the United Kingdom, analyzing over 9,000 feline cutaneous tumors, where squamous cell, fibrosarcoma and basal cell carcinomas were the most frequent types of neoplasms found between 2006 and 2013.<sup>7</sup> These registers have paved the way for epidemiological and descriptive studies that have helped us comprehend the severity of this disease for domestic cats.

The objective of the present study was to analyze archival data of cats cases referred to the Department of Pathology of the National Autonomous University of Mexico School of Veterinary Medicine (FMVZ-UNAM), a veterinary diagnostic reference center in the central area of the country. Data were evaluated to determine the most frequently diagnosed feline neoplasms in this cohort, highlighting tumor histogenesis (tissue of origin) and histotype (mainly sarcomas, carcinomas, and lymphomas), as well as a possible association of frequency of presentation with animal age and sex. To the best of our knowledge, there are not systematic registries in Mexican Veterinary centers and/or epidemiological reports regarding the most common neoplasms in Mexican domestic cats.

## Materials and methods

A total of 13 years of records of feline cases referred to the FMVZ-UNAM Pathology Department for histopathological analysis or post-mortem evaluation were examined, from which only tumor-related reports were selected. Data were compiled considering sex and age of cats, as well as histogenesis, and tumor histotype. For histogenesis classification, the type of the tumor cells was considered (polygonal for epithelial, spindle for mesenchymal, and round cells for hematopoietic and lymphoreticular types), according to what has been previously described.<sup>8</sup> Histotype was also considered (e.g. sarcomas, carcinomas, lymphomas, etc.), in addition to the benign or malignant nature of the lesion. Due to the uneven frequency of mixed breed (domestic shorthair) over purebred cats, this variable was not included in the study. In addition, tumor anatomic location could only be ascertained for lymphomas.

The analysis of histotype frequency was performed on nominal-scale variables, both in absolute and relative numbers (measured as percentages). A contingency

table was created to assess the association between histogenesis and biological behavior of neoplasms (benign or malignant), using Pearson's chi-square test.<sup>9</sup> For each tumor histotype, descriptive statistics for age of presentation (in years) were calculated (mean, median, standard deviation, and maximum and minimum values).<sup>10,11</sup> The Kruskal Wallis test<sup>10</sup> was used to compare both the histogenesis categories (epithelial, mesenchymal and hematopoietic/lymphoreticular) and the most frequent histotypes. Age was also grouped as kitten (<7 months), junior (7 months to 2 years), prime (3-6 years), mature (7-10 years), senior (11-14 years) and geriatric (>15 years), following the American Association of Feline Practitioners-American Animal Hospital Association (AAFP-AAHA) guidelines<sup>12</sup> for variable comparisons. Odds ratios (OR) were calculated for variables sex and neoplastic behavior (malignant/benign).<sup>9</sup> A p-value <0.05 was considered as significant. All statistical analyses were completed using the SPSS v25 program for macOS (IBM).

## Results

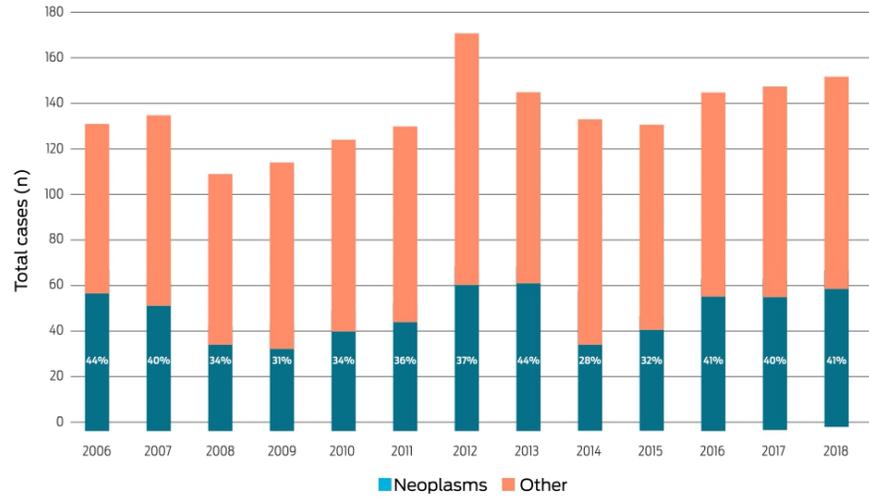
From 1,816 cases of domestic cats that were referred for histopathological diagnosis to the FMVZ-UNAM Pathology Department between 2006 and 2018, 685 were neoplasms (37.7%), 109 of which were diagnosed by necropsy and 576 by biopsy. The frequency of neoplastic cases was constant throughout the study years, with an average of 37% neoplastic cases by year and a standard deviation of 5 cases between years. The minimum percentage of tumor occurrence was 28% in 2014, whilst the maximum was 44% in both 2006 and 2013 (Figure 1).

Females had a higher frequency of neoplasms ( $p < 0.01$ ), mounting up to close to 65% of all evaluated cases (Figure 2a). An association between sex and histogenesis was noted, with a higher frequency of occurrence of epithelial neoplasms in females (79.9%,  $p < 0.001$ ) (Figure 2b). However, there was no apparent association between sex and malignant behavior ( $p > 0.05$ , OR = 1.21 [IC 95% 0.78-1.85]).

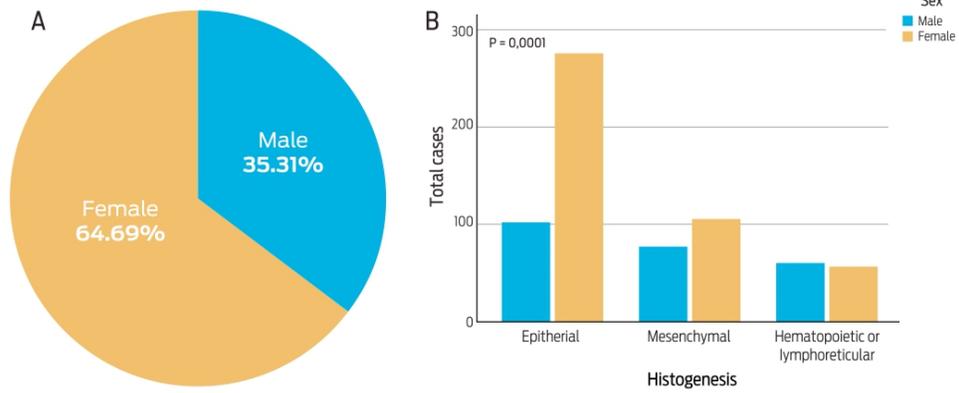
The mean age for neoplasm presentation in cats was  $9.8 \pm 4.2$  years, with a mean of  $10.1 \pm 4.1$  years for benign and  $9.7 \pm 4.2$  years for malignant tumors. Figure 3 shows the frequency of presentation of tumor histotype according to age. Data indicate that hematopoietic and lymphoreticular tumors appear earlier than other types of tumors (7.8 years vs 9.6 to 11.4 years respectively,  $p < 0.001$ ). A  $\chi^2$  test supported an increased risk of younger cats to develop lymphoma (mean age 7.8 years,  $p = 0.001$ ).

When age was categorized, a higher frequency of neoplasm presentation was seen for mature and senior cats, encompassing more than 65% of all tumor cases. The prime group followed with 14.8% of cases, and the geriatric and junior groups trailing with 12.2% and 5.4% respectively. Finally, kittens were affected in less than 1% of cases. No association between age group and biological behavior of tumors was found ( $p = 0.59$ ).

The predominant tissue of origin for diagnosed tumors was epithelial, making up 56% of cases, followed by mesenchymal neoplasms (26%) and hematopoietic and lymphoreticular with a 17% frequency of presentation each (Figure 4). Close to 85% of cases were malignant neoplasms, which were prevalent for all cellular lineages (Table I).



**Figure 1.** Number of samples submitted for histopathological evaluation at the FMVZ-UNAM Pathology Department between 2006 and 2018, and relative frequency of tumor occurrence.



**Figure 2.** Distribution of neoplasms according to sex. **A)** Proportion of neoplasms in females and males. **B)** Distribution of cell lineage by sex.

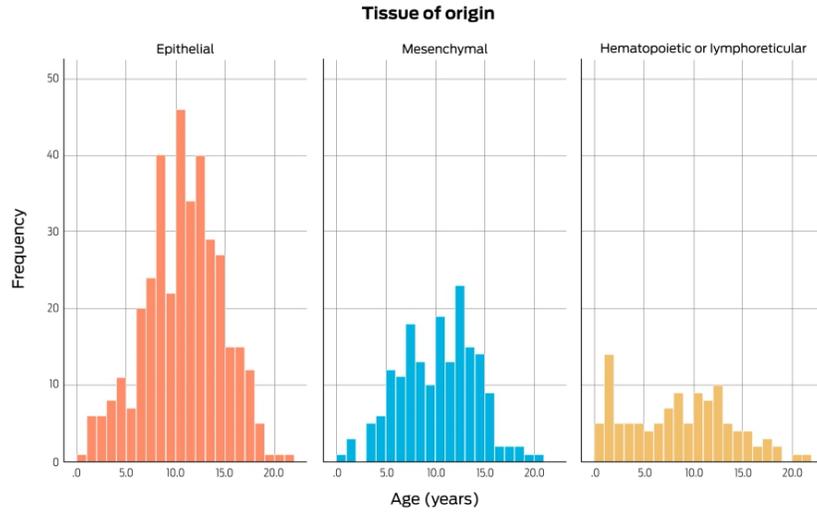


Figure 3. Frequency of tumor type (histogenesis) according to age of cats.

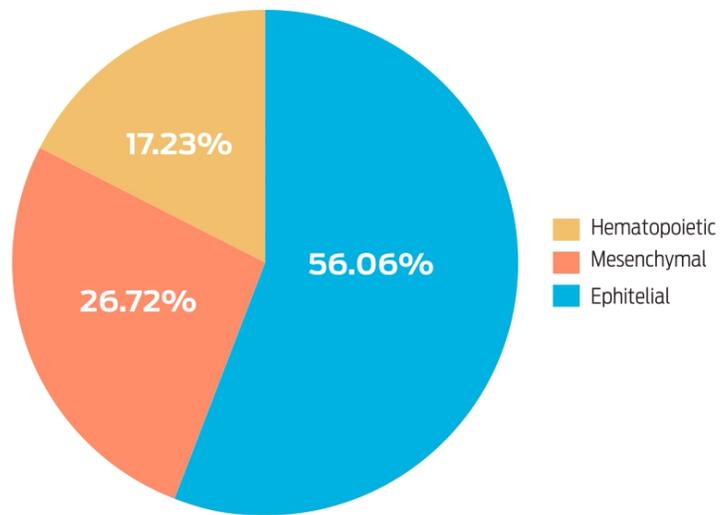


Figure 4. Distribution of neoplasms in cats according to the cellular lineage of origin.

**Table 1.** Number and frequency of tumors according to cellular lineage and neoplastic behavior.

			Neoplastic behavior		
			Benign	Malignant	p-value
Cellular lineage	Epithelial	Count	73	311	
		Proportion	0.19	0.81	<b>3.4054E-36</b>
	Mesenchymal	Count	27	156	
		Proportion	0.15	0.85	<b>1.5721E-13</b>
	hematopoietic/ lymphoreticular	Count	5	113	
		Proportion	0.04	0.96	<b>1.053E-27</b>
	Total	Count	105	580	
		Proportion	0.15	0.85	

Statistical differences ( $p < 0.05$ ) between neoplastic behavior within cellular lineage are marked in bold.

The most frequent histotype was carcinoma, which comprised 30.5% of all cases, followed by sarcoma (13.7%), adenocarcinoma (13.1%), lymphoma (12.8%), and adenoma (5.8%) (Table 2). Figure 5 shows representative hematoxylin-eosin stained slides used for histological classification of neoplasms. Overall, the most common neoplasm was squamous cell carcinoma with a total of 117 cases or 56% of carcinomas and 17% of all analyzed neoplasms, followed by lymphoma with 88 cases (12.8%), and spindle cell sarcoma with 56 cases (9.2%). Of all adenocarcinomas, 80% were in the mammary gland, with the tubulopapillary form representing the majority of cases (50%), followed by the tubular form (approximately 30%). Due to this high proportion of mammary neoplasms, a sex-bias was observed with adenocarcinomas prevailing in female cats ( $p < 0.01$ ) (Figure 6).

Lymphomas were also classified according to their anatomical region of origin, with the gastrointestinal (alimentary) presentation being the most frequent (40%), followed closely by the multicentric form (32%), while other types were significantly less represented (Figure 7). Three of the multicentric lymphomas presented bone marrow invasion and secondary leukemia. The age group was significantly different between anatomical origin categories, with mediastinal lymphoma being the most frequent in younger cats ( $p = 0.0001$ ) and alimentary lymphoma in older cats (Table 3). The extranodal types of lymphoma represented only 16% of lymphoma cases (2.4% hepatic [ $n=2$ ], 5.9% renal [ $n=5$ ], 5.9% cutaneous [ $n=5$ ], pulmonary 1.1% [ $n=1$ ], and splenic 1.1% [ $n=1$ ]). Finally, the most frequent adenomas were those with tubulopapillary presentation, complex adenoma, and papillary adenoma (11% each).

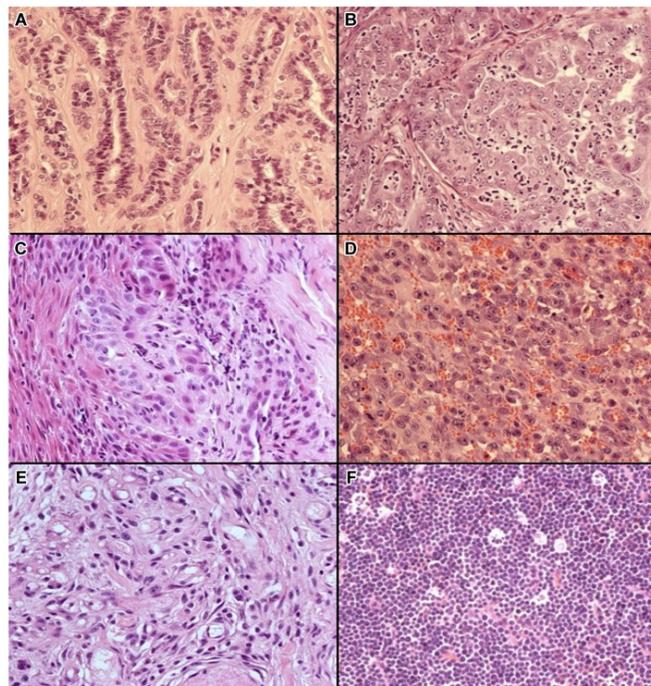
## Discussion

Cancer is a prominent disease in companion animals and one of the leading causes of pet mortality.<sup>13</sup> Classification of neoplasms based on tissue and cellular origin, in addition to the association between frequency of presentation and demographic characteristics, can contribute to guide diagnostic and therapeutic options in veterinary clinics. In the domestic cat cohort included in this study, neoplasms rep-

**Table 2.** Cellular origin, number of cases, frequency and age of presentation, of the five predominant neoplasms in cats.

Neoplasm	Histogenesis	Cases	Occurrence	Median Age (range)	Mean age (SD)
Carcinoma	Epithelial	209	30.50%	10.0 (<1-21)	10.0 (3.9)
Sarcoma	Mesenchymal	94	13.70%	10.0 (1-18)	9.6 (3.4)
Adenocarcinoma	Epithelial	90	13.10%	11.0 (1-26)	10.8 (3.7)
Lymphoma	Hematopoietic	88	12.80%	8.0 (<1-21)	7.8 (5.2)*
Adenoma	Epithelial	40	5.80%	11.0 (4-18)	11.4 (3.3)

\* Significant difference between histotypes (p = 0.001). SD= standard deviation



**Figure 5.** Histopathological features of the most frequently observed neoplasms. A) Mammary adenoma. Regular cords lined by one or two layers of epithelial cells and separated by a fine fibrovascular stroma. Neoplastic cells are cuboidal with poor cytoplasm and minimal atypia. B) Tubular carcinoma. Tubules lined by cuboidal epithelium with large, vesicular nuclei with a prominent nucleolus. There is a discrete intratubular neutrophilic infiltrate. C) Squamous cell carcinoma. Nest of cells with abundant eosinophilic cytoplasm with distinct borders and large vesicular nuclei with a single prominent nucleolus. These cells are immersed in desmoplastic tissue. D) Hemangiosarcoma. Polygonal cells surrounding discrete vascular channels, showing prominent nucleoli and numerous mitoses. E) Soft tissue sarcoma. Spindle-shaped tumor cells, with moderate eosinophilic cytoplasm, poorly defined; the nuclei are oval, with granular chromatin and prominent nucleoli. F) Mediastinal lymphoma. Monomorphic neoplastic lymphoid cells arranged in a solid mantle, supported by a scarce fibrovascular stroma. The cells have scarce cytoplasm, oval nuclei with finely granular chromatin, evident nucleoli, and frequent atypical mitoses. There are multifocal areas of necrosis.

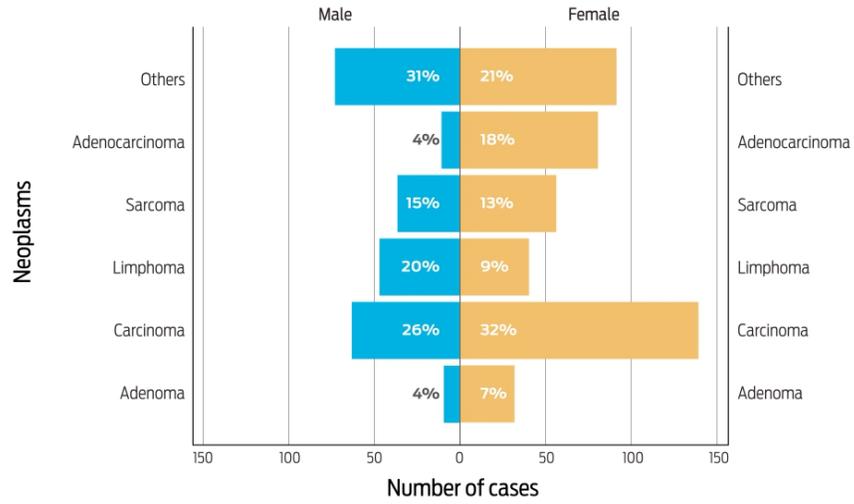


Figure 6. Most frequent neoplasm histotype distribution by sex.

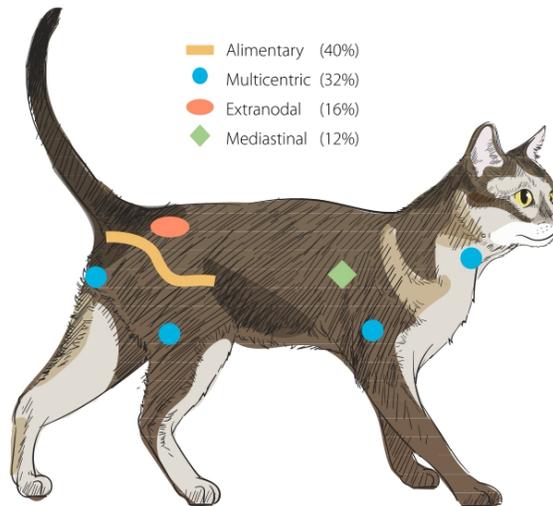


Figure 7. Anatomic localization and frequency of presentation of feline lymphoma.

Table 3. Distribution of lymphoma by anatomical location and age of cats.

Anatomical location	Frequency		Age (years)			
	n	%	Mean	SD	Min	Max
Alimentary	34	40%	10.0	3.88	0.3	17.0
Multicentric	28	32%	6.5	6.0	0.3	20.0
Mediastinal	9	12%	2.2	2.0	0.5	7.0
Extranodal	14	16%	6.8	5.3	3.0	16.0
Total	85	100%				

SD: standard deviation; Min: minimum; Max: maximum.

resented 37.7% of all referred histopathological cases. The predominant tumor histogenesis was epithelial, followed by mesenchymal and lymphoreticular, similar to results from cat groups studied by Graf et al in Switzerland,<sup>3</sup> and by Zambelli et al in South Africa.<sup>14</sup> A predominance of malignant behavior was found in this study for tumors of all tissues of origin (Table 2). However, no differences in malignancy were observed when considering mean age of presentation. This result paralleled the report by Manuali et al in a shorthair cat population in Italy.<sup>15</sup> In addition, a higher frequency of cancer was observed in females than in males ( $p < 0.001$ ), coinciding with previous reports.<sup>13,16</sup> The overall similar outcomes from these studies indicate that regional discrepancies between histogenesis, age of presentation, and sex-bias are limited.

Squamous cell carcinoma was the most common neoplasm in cats from this work, making up 17% of cases ( $n=117$ ), a result that is comparable to that found in other studies.<sup>14,17-19</sup> Manuali et al. found this histotype as the most common malignancy among skin (28.8%), oral cavity and tongue tumors (46%).<sup>15</sup> Other studies in cats focusing on cutaneous neoplasms in the head, neck and oral mucosa also found a predominant presentation of this histotype.<sup>7,20-22</sup> Nonetheless, when all anatomical regions are considered, this predominance can change, since Graf et al noted in a Swiss feline cancer registry from 1965 to 2008, that this type of tumor placed fourth with just 9.9% of all cases, below adenomas/adenocarcinoma (19.1%), fibroma/fibrosarcoma (18.4%) and lymphoma (15.6%).<sup>5</sup> The most common age of presentation for squamous cell carcinoma in this study was 7-10 years (mature cats), deviating slightly from previous reports describing an older age of occurrence (11-14 years).<sup>7,17,18,23</sup> The frequency of squamous cell carcinoma in older cats was half of that observed for mature cats in this study. Since this type of neoplasm is strongly related to sunlight exposure,<sup>17,18</sup> we can speculate that the lifestyle and the outdoor habits in the studied cat population could be a reason for the high occurrence and early presentation of this type of tumor, contrary to the largely indoor cat populations found in other countries. Indeed, the low prevalence of squamous cell carcinoma reported in the Graf et al study<sup>23</sup> could be associated

with differences in temperature and sunlight exposure between Mexico and Switzerland. On the other hand, Zimbelli *et al* also found this neoplasm to be highly represented in South African cats correlating with a greater ultraviolet light exposure.<sup>14</sup>

Adenocarcinomas are frequently reported in female cats because of the high incidence of mammary gland neoplasms.<sup>24</sup> The range of incidence varies according to geographic regions, which also relates to spay practices and age at the time of surgery.<sup>25</sup> These neoplasms are generally aggressive and have a poor prognosis.<sup>26</sup> In this study, adenocarcinomas were the second most common tumor in female cats, representing 18.3% of cases, of which close to 80% were of mammary origin. This is in agreement with the study of Graf *et al*, that places mammary carcinoma as the most frequent neoplasm, comprising 19.1% of the cases and a higher odds ratio in female cats.<sup>23</sup> Moreover, Morris *et al* found mammary carcinomas to place just below lymphoma and skin tumors, accounting for 17% of cases.<sup>24</sup> The reported age of presentation for mammary carcinomas ranges between 10 and 12 years,<sup>27,28</sup> while it varied between 7 and 14 years of age in our study. In male cats, mammary tumors make up for 1-5% of cases;<sup>24</sup> the 1.4% observed in our study falls directly into this range. There are studies that relate incidence of mammary tumors to neutering practices,<sup>24</sup> unfortunately, our study lacks data concerning reproductive status (intact vs. spayed), as most records did not include this information.

Another important neoplasm found in this study was lymphoma. Lymphoma has been reported as the most common neoplasm in cats;<sup>29</sup> however, according to this and other studies,<sup>1,3,4,14,15,23</sup> epithelial neoplasms are more prevalent. Nevertheless, a significant incidence of lymphoma in cats from this study can still be appreciated, particularly in young cats. Lymphoma represents a diverse group of lesions that vary in terms of cell type, grade of dissemination, and anatomic localization.<sup>30</sup> To understand its behavior and establish prognostic factors, a variety of classifications need to be made taking into account morphologic criteria, immunophenotyping, and more recently genotyping, a practice mainly adopted from human medicine and applied to veterinary cases.<sup>31</sup> At present, the most common classification for lymphoma developed by a panel of experts from the World Health Organization (WHO), attempts to standardize its nomenclature and correlate it with the prognosis.<sup>5,25,29,31-34</sup> Alimentary (40%) and multicentric (33%) lymphomas were the predominant types of lymphoma in this study. These two types are consistently reported as the most frequent lymphomas in cats around the world.<sup>15,29,31,34-36</sup> One exception is the study by Wolfesberger *et al*,<sup>26</sup> where alimentary lymphoma was also found to be the most common presentation, but there was no report of multicentric lymphoma in their 30-case revision. In fact, extranodal lymphoma was the second most common form in their study, contrary to our findings where this type of tumor was found in only 16% of lymphoma cases. In Brazil, studies confirmed an important presence of multicentric and/or mediastinal lymphoma in cats, with a correlation with the prevalence of feline leukemia virus (FeLV).<sup>37,38</sup> Since data regarding the prevalence of this viral pathogen in Mexico is limited, FeLV cannot be discarded as a potential cause of the high frequency of mediastinal and multicentric cases reported in this study. The mean age of presentation of lymphoma was  $7.8 \pm 5.2$  years, similar to that observed by Graf *et al* who found this neoplasm to be the most frequent tumor type in young cats.<sup>23</sup>

A relationship between age of presentation and anatomical site was also found in this study, with mediastinal, multicentric and extranodal locations being particularly frequent in junior and prime cats. These results are in accordance with previous reports.<sup>36,39</sup> Interestingly, during the period comprised in this study, no cases of nasal or ocular lymphomas were diagnosed, despite their relatively regular observation in other North American studies.

### Conclusions

Cancer registries in veterinary centers allow a better understanding of the epidemiological characteristics of different neoplasms, and point out discrepancies that may occur between regions, which can support better diagnosis and treatment. This study shows that cancer is a significant health problem of domestic cats from central Mexico City, which could reflect the situation throughout the city and possibly the country. Squamous cell carcinoma was identified as the most frequent neoplasm, with an earlier age of presentation than previously reported. This may be related to both the lifestyle of cats in the region and significant exposure to solar radiation. Epithelial neoplasms were more common in females than in males, with adenocarcinomas in the mammary gland as the most prevalent type; further studies should evaluate an association with neutering practices in our country. Lymphoma was also highly represented in the studied cat cohort, particularly alimentary lymphoma, just as in other studies throughout the world. Nevertheless, other less-reported presentations, such as multicentric lymphoma, were also observed, which may be associated with FeLV prevalence in Mexico. The compiled data in this study serves as a foundation for future research on specific neoplasms known to have a significant presence in cat populations.

## Acknowledgements

The authors also gratefully acknowledge Eugenio Córdova López, Academic Technician of the FMVZ Department of Pathology, for his support with the microscopic photographs.

The authors thank Dr. José Luis Pablos Hach, professor at the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National Autonomous University of Mexico, for his valuable advice in the statistical analysis of the data.

## References

1. Schmidt JM, North SM, Freeman KP, Ramiro Ibañez F. Feline pediatric oncology: retrospective assessment of 233 tumors from cats up to one year (1993 to 2008). *J Small Anim Pract.* 2010; 51(6):306-11. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2010.00915.x
2. Brønden LB, Flagstad A, Kristensen AT. Veterinary cancer registries in companion animal cancer: a review. *Vet Comp Oncol.* 2007;5(3):133-44.
3. Graf R, Grüntzig K, Hässig M, Axhausen KW, Fabrikant S, Welle M, *et al.* Swiss Feline Cancer Registry: A Retrospective Study of the Occurrence of Tumours in Cats in Switzerland from 1965 to 2008. *J Comp Pathol.* 2015;153(4):266-77. DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.08.007
4. Vascellari M, Baioni E, Ru G, Carminato A, Mutinelli F. Animal tumor registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumors in dogs and cats. *BMC Vet Res.* 2009;5(1):39. DOI: 10.1186/1746-6148-5-39
5. Butler ML, *et al.* Epidemiology and the evidence-based medicine approach. In Withrow SJ, Vail DM, Page RL, eds. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology.* 5th ed. St. Louis, MO: Elsevier; 2013. p. 68-82.
6. Dorn CR. The epidemiology of cancer in animals. *California Medicine.* 1967;107:481-9.
7. Ho NT, Smith KC, Dobromylskyj MJ. Retrospective study of more than 9000 feline cutaneous tumors in the UK: 2006–2013. *J Feline Med Surg.* 2018;20(2):128-34. DOI: 10.1177/1098612X17699477
8. Kamstock DA, Russell DS, Powers BE. In Vail DM, Thamm DH, Liptak JM, eds. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology.* 6th ed. Maryland Heights: Elsevier; 2019.
9. Van Belle G, Fisher L, editors. *Biostatistics: a methodology for the health sciences.* 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2004.
10. Hollander M, *et al.* *Nonparametric statistical methods.* 3rd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2014.
11. Kuehl RO. *Design of experiments: statistical principles of research design and analysis.* Duxbury/Thomson Learning; 2000.
12. Vogt A, Rodan I, Brown M, Brown S. AAFP – AAHA Feline Life Stage Guidelines. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2010;46:70–85.
13. Vascellari M, Baioni E, Ru G, Carminato A, Mutinelli F. Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Vet Res.* 2009;5(1):39.
14. Zambelli A. Feline Cancer Prevalence in South Africa (1998 – 2005): Contrasts with the Rest of the World. *J Basic Appl Sci.* 2015;11:370-80.

15. Manuali E, Forte C, Vichi G, Genovese DA, Mancini D, De Leo AAP, *et al.* Tumours in European Shorthair cats: a retrospective study of 680 cases. *J Feline Med Surg.* 2020;22(12):1095-1102. doi: 1098612X2090503.
16. Patnaik AK, Liu SK, Hurvitz AI, McClelland AJ. Nonhematopoietic neoplasms in cats. *JNCL.* 1975;54(4):855-60. <https://doi.org/10.1093/jnci/54.4.855>
17. Lino M, Lanore D, Lajoinie M, Jimenez A, Crouzet F, Queiroga FL. Prognostic factors for cats with squamous cell carcinoma of the nasal planum following high-dose-rate brachytherapy. *J Feline Med Surg.* 2019;21(12):1157-64.
18. Murphy S. Cutaneous squamous cell carcinoma in the cat: Current understanding and treatment approaches. *J Feline Med Surg.* 2013;15(5):401-7.
19. Blackwood L. Cats with cancer: Where to start. *J Feline Med Surg.* 2013;15(5):366-77.
20. Olmsted GA, Farrelli J, Post GS, Smith J. Tolerability of toceranib phosphate (Palladia) when used in conjunction with other therapies in 35 cats with feline oral squamous cell carcinoma: 2009–2013. *J Feline Med Surg.* 2017;19(6):568-75. DOI: 10.1177/1098612X16638118
21. Stebbins KE, Morse CC, Goldschmidt MH. Feline oral neoplasia: A ten-year survey. *Vet Pathol* 1989;26(2):121-8.
22. Tannehill-Gregg SH, Levine AL, Rosol TJ. Feline head and neck squamous cell carcinoma: a natural model for the human disease and development of a mouse model. *Vet Comp Oncol* 2006;4(2):84-97.
23. Graf R, Grüntzig K, Boo G, Hässig M, Axhausen KW, Fabrikant S, *et al.* Swiss Feline Cancer Registry 1965–2008: the influence of sex, breed, and age on tumour types and tumour locations. *J Comp Pathol.* 2016;154(2-3):195-210. DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.01.008
24. Morris J. Mammary tumours in the cat: Size matters, so early intervention saves lives. *J Feline Med Surg.* 2013;15(5):391-400. DOI: 10.1177/1098612X13483237
25. Goldschmidt HM, *et al.* Tumors in the mammary gland. In Meuten DJ, ed. *Tumors in domestic animals.* 5th ed. Ames, Iowa: Wiley/Blackwell; 2017. p. 723-65.
26. Zappulli V, *et al.* Proposed classification of the feline “complex” mammary tumors as ductal and intraductal papillary mammary tumors. *Vet Pathol.* 2013;50(6):1070-7. DOI: 10.1177/0300985813488894
27. Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in domestic animals.* Oxford: Blackwell; 2002. p. 575–606.
28. Lana SE, Rutteman GR, Withrow S. Feline mammary tumors. In: Withrow SJ, Vail DM, eds. *Small animal clinical oncology.* 4th ed. St Louis, MO: Elsevier; 2007. p. 628–36.
29. Wolfesberger B, Fuchs-Baumgartinger A, Greß V, Hammer SE, Gradner G, Knödl K, *et al.* World Health Organisation Classification of lymphoid tumours in veterinary and human medicine: A comparative evaluation of gastrointestinal lymphomas in 61 cats. *J Comp Pathol.* 2018;159:1-10. DOI: 10.1016/j.jcpa.2017.12.006
30. Kiselow MA, Rassnick KM, McDonough SP, Goldstein RE, Simpson KW, Weinkle TK, *et al.* Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995–2005). *J Am Vet Med Assoc.* 2008;232(3):405-10.

31. Vezzali E, Parodi AL, Marcato PS, Bettini G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol* 2010;8(1):38-49. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2009.00201.x
32. Valli VE, *et al.* Hematopoietic system Jubb. In Maxie MG, ed. Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 6th ed. Vol. 3. St. Louis, MO: Elsevier; 2016. p. 213-42.
33. Valli VE. *Veterinary comparative hematopathology*. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell; 2007.
34. Wolfesberger B, Skor O, Hammer SE, Flickinger I, Kleiter M, Rütgen BC, *et al.* Does categorization of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats? *J Feline Med Surg*. 2017;19(8):897-906. DOI: 10.1177/1098612X16666119
35. Louwerens M, London CA, Pedersen NC Lyons LA. Feline lymphoma in the post-Feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med*. 2005;19:329-35.
36. Morris J, Dobson JM. *Small animal oncology*. London; Malden, MA: Blackwell Science; 2001.
37. Cristo TG, Bieuz G, Noronha LF, Pereira LHHS, Withoef JA, Furlan LV, *et al.* Feline lymphoma and a high correlation with feline leukaemia virus infection in Brazil. *J Comp Pathol*. 2019;166:20-8.
38. Leite-Filho RV, Panziera W, Bandinelli MB, Henker LC, da Conceição Monteiro K, Corbellini LG, *et al.* Epidemiological, pathological and immunohistochemical aspects of 125 cases of feline lymphoma in Southern Brazil. *Vet Comp Oncol*. 2019;1-7.
39. Vail DM, Moore AS Ogilvie GK, Volk LM. Feline lymphoma (145 cases): Proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med*. 1998;12(5):349-54. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02134.x