



**Facultad de Veterinaria**  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en veterinaria

Nuevas técnicas de diagnóstico en el linfoma canino y su implicación en la elección del tratamiento.

New diagnostic techniques in canine lymphoma and its involvement in the choice of treatment.

Autor/es

Sergio Pérez Palacios

Director/es

M. Carmen Aceña Fabián

Facultad de Veterinaria

2018

## Índice

1.	RESUMEN/ABSTRACT.....	3
2.	INTRODUCCIÓN .....	4
3.	OBJETIVOS.....	5
4.	METODOLOGÍA .....	5
5.	INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGIA.....	5
6.	ETIOLOGIA.....	6
6.1	Factores genéticos y moleculares:.....	6
6.2	Factores medioambientales: .....	7
6.3	Factores inmunológicos: .....	7
6.4	Factores infecciosos:.....	7
6.5	Otros factores: .....	7
7.	CLASIFICACIÓN.....	8
7.1	Clasificación anatómica: .....	8
7.2	Características inmunofenotípicas: .....	9
7.3	Criterio histológico:.....	9
8.	DIAGNÓSTICO: .....	10
8.1	Examen físico: .....	10
8.2	Hemograma con examen del frotis: .....	10
8.3	Perfil bioquímico con proteinograma:.....	11
8.4	Urianálisis.....	11
8.5	Radiografías torácicas:.....	11
8.6	Ecografía abdominal: .....	11
8.7	Aspirado de médula ósea: .....	12
8.8	Citología:.....	12
8.9	Histología: .....	13
8.10	Inmunofenotipo.....	14
8.11	Técnicas moleculares.....	14
8.11.1	<i>Citometría de flujo.</i> .....	14
8.11.2	<i>PCR para el reordenamiento de receptor de antígeno – ensayos de clonalidad (PARR):</i> .....	18
9.	ESTADIO CLINICO.....	21
10.	TRATAMIENTO .....	21
10.1	Cirugía:.....	21
10.2	Radioterapia: .....	22

10.3 Quimioterapia:.....	22
10.4 Inmunoterapia: .....	26
11. PRONÓSTICO.....	26
12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
13. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	31
14. VALORACIÓN PERSONAL.....	32
15. BIBLIOGRAFÍA.....	33

## **1. RESUMEN.**

El linfoma canino es una de las neoplasias más frecuentes con una incidencia estimada de 20 a 100 casos por cada 100.000 perros y, en muchos aspectos, es comparable con el linfoma no Hodgkin en seres humanos. A pesar de que se desconoce la causa exacta, se cree que los factores ambientales y la susceptibilidad genética juegan un papel importante.

No es una enfermedad única, puesto que están descritas diferentes presentaciones clínicas y subtipos histológicos. Sin embargo, la mayoría de los perros presentan linfadenopatía generalizada (forma multicéntrica) y linfoma de grado intermedio a alto, más frecuentemente de origen de células B.

El diagnóstico de linfoma canino es un proceso complejo que conlleva la realización de un examen físico, pruebas de imagen, citología, hematología, perfil bioquímico, histopatología y cada vez más, técnicas de diagnóstico molecular como la citometría de flujo (CF). La aplicación conjunta de CF y citología consigue aumentar la precisión del diagnóstico de la mayoría de los subtipos de linfoma. Además, puede aportar una serie de datos que pueden llegar a ser verdaderamente útiles como son determinar el inmunofenotipo, la cuantificación del antígeno o la evaluación de patrones aberrantes, entre otros.

La quimioterapia continúa siendo el tratamiento de elección aunque las últimas tendencias ofrecen distintos protocolos en función del inmunofenotipo y el grado histológico del tumor. Gracias a ella, se consigue una remisión completa en la mayoría de los pacientes. A su vez, se han estudiado una gran variedad de factores pronósticos de los cuales, el grado histológico y el inmunofenotipo son los de mayor importancia.

## **ABSTRACT.**

Canine lymphoma is one of the most frequent neoplasms with an estimated incidence of 20 to 100 cases per 100,000 dogs and, in many aspects, is comparable with non-Hodgkin lymphoma in humans. Although the exact cause is unknown, it is believed that environmental factors and genetic susceptibility play an important role. It is not a single disease, since different clinical presentations and histological subtypes are described. However, most

dogs have generalized lymphadenopathy (multicentric form) and intermediate to high grade lymphoma, most frequently of B cell origin.

The diagnosis of canine lymphoma is a complex process that involves the performance of a physical examination, imaging tests, cytology, hematology, biochemical profile, histopathology and, increasingly, molecular diagnostic techniques such as flow cytometry (CF). The joint application of CF and cytology manages to increase the diagnostic accuracy of most lymphoma subtypes. In addition, it can provide a series of data that can become truly useful, such as determining the immunophenotype, quantifying the antigen or evaluating aberrant patterns, among others.

Chemotherapy continues to be the treatment of choice although the latest trends offer different protocols depending on the immunophenotype and the histological grade of the tumor. Thanks to it, a complete remission is achieved in most patients. In turn, a great variety of prognostic factors have been studied, of which the histological grade and the immunophenotype are the most important.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

Los nuevos avances en la medicina veterinaria así como la mayor concienciación de los propietarios por la salud de sus mascotas han propiciado un aumento en la esperanza de vida de sus animales.

Debido a este hecho, se ha observado un incremento en la frecuencia de presentación de algunas patologías como son las neoplasias.

Una de las neoplasias de mayor relevancia en la oncología canina es el linfoma. Se trata de una enfermedad sistémica de carácter heterogéneo, es decir, con una gran variedad de presentaciones (tanto clínicas como histológicas) lo que puede dificultar el diagnóstico.

Actualmente, disponemos de técnicas basadas en el diagnóstico molecular como la Citometría de flujo y la PCR para el reordenamiento de receptor de antígeno (PARR) que cada vez están ganando más importancia debido a las ventajas que ofrecen respecto a las técnicas convencionales tanto para el diagnóstico como para el pronóstico.

Por suerte, las células del linfoma son sensibles a la quimioterapia, pudiendo conseguirse remisiones completas, manteniendo una buena calidad de vida y alargando de esta forma, el tiempo de supervivencia. Además del tratamiento a base de fármacos citostáticos, están apareciendo otras posibilidades entre las que podemos destacar los anticuerpos monoclonales o la radioterapia.

Por estas razones es necesario definir un plan de diagnóstico apropiado y completo a la hora de seleccionar el tratamiento más adecuado para el paciente, así como para informar del pronóstico esperado.

### **3. OBJETIVOS.**

Los objetivos de este trabajo son:

- Conocer la etiología y las distintas presentaciones clínicas del linfoma canino así como los tipos de clasificaciones que hay en la actualidad.
- Comparar y evaluar los diferentes procedimientos diagnósticos con los que contamos y saber cuándo es más conveniente utilizarlos.
- Valorar cuál es el tratamiento de elección en función de los resultados obtenidos en el diagnóstico.
- Saber interpretar los resultados obtenidos en el diagnóstico para establecer el pronóstico más acertado.

### **4. METODOLOGÍA.**

Se realizará una revisión bibliográfica de artículos y publicaciones recientes de ámbito científico acerca del linfoma canino centrándonos en las nuevas técnicas diagnósticas para dicha enfermedad así como del tratamiento de elección.

Para ello se utilizarán bases de datos como Pubmed, Google Académico y Web of Science con las siguientes palabras clave: “*Canine Lymphoma*”; “*Immunophenotype*”; “*Treatment*”; “*Diagnosis*”; “*Flow Cytometry*”; “*PARR*”. Además, se hará el estudio de dos casos procedentes del Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HVUZ) donde se explicará la forma de abordar cada caso y las diferencias que supone el inmunofenotipo y el grado histológico a la hora de elegir el tratamiento más adecuado.

### **5. INCIDENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA.**

El linfoma es un conjunto de neoplasias que tienen en común su origen en las células linforeticulares. Generalmente, se originan en el tejido linfoide (ganglios linfáticos, médula ósea y bazo); sin embargo pueden originarse a partir de cualquier tejido del organismo <sup>[8, 19]</sup>.

Se trata de uno de los tumores más comunes, constituyendo aproximadamente entre un 7-24% de todas las neoplasias caninas <sup>[8, 19, 21]</sup>. Además, es el tumor hematopoyético más corriente en el perro representando el 83% de todas las alteraciones malignas hematopoyéticas <sup>[21]</sup>. El linfoma puede ser diagnosticado a cualquier edad pero suele ser más frecuente en perros de edad media o avanzada, especialmente entre los 6-9 años. Por lo que se deduce que la tasa de incidencia aumenta con la edad <sup>[19]</sup>.

Existe cierta predisposición racial, especialmente en aquellas de talla mediana y grande. Por el contrario, el sexo no se considera un factor de riesgo. Aunque se ha visto que las perras no esterilizadas tienen una menor posibilidad de padecer la enfermedad mientras que las que están esterilizadas con menos de 1 año presentan un mayor riesgo <sup>[22]</sup>. Esto último se ha observado en la raza Golden Retriever <sup>[23]</sup> y Vizsla <sup>[24]</sup>.

También se ha demostrado que algunas razas son más propensas a desarrollar un inmunofenotipo específico<sup>[8]</sup>. De manera que, las razas Boxer, Siberian Husky se asocian a un linfoma de células T mientras que las razas Doberman y Pinscher al de células B<sup>[3]</sup>.

En las últimas décadas, la incidencia de esta neoplasia ha aumentado, viéndose una tendencia similar en humanos, lo que hace que sea posible la existencia de ciertos factores de riesgo comunes, principalmente ambientales<sup>[8]</sup>.

El linfoma canino se ha establecido como modelo para el linfoma no Hodgkin (NHL) del ser humano ya que presentan características clínicas, patológicas e histológicas similares.<sup>[4]</sup>

## **6. ETIOLOGIA.**

Actualmente la etiología del linfoma canino sigue considerándose desconocida en su mayor parte, sin embargo, hay estudios que han demostrado la existencia de factores que propician su desarrollo<sup>[8]</sup>.

### **6.1 Factores genéticos y moleculares**

Gracias al desciframiento del genoma canino, se han identificado diversas aberraciones cromosómicas en los perros que presentan linfoma, algunas incluso, se asocian con el pronóstico<sup>[27]</sup>.

Los últimos avances en citogenética molecular y la disponibilidad de diversas técnicas de investigación genética han permitido que se conozcan mejor las alteraciones genéticas que ocurren en esta enfermedad<sup>[27]</sup>. Algunas de estas aberraciones son:

#### ***Ganancia del cromosoma canino 13.***

Aunque la ganancia del cromosoma 13 en perros parece ser un hallazgo constante en el linfoma, también se ha descubierto en otras neoplasias. Además, se asocian con el pronóstico, de manera que los perros con trisomía del cromosoma 13 presentan una mayor duración de la primera remisión y del tiempo medio de supervivencia<sup>[8]</sup>.

#### ***Mutaciones genéticas***

Se han descrito mutaciones en las líneas germinales de las células somáticas y alteraciones de la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores como el p53<sup>[28]</sup>. La hipometilación del DNA (Ácido desoxirribonucleico) es una característica frecuente de las células neoplásicas<sup>[19]</sup>.

## 6.2 Factores medioambientales

### ***Herbicidas***

Parece que la exposición a herbicidas (ácido 2,4-diclorofenoxyacético) está relacionada con el desarrollo de la neoplasia. De hecho, el uso de pesticidas se ha asociado con un 70% de riesgo de padecerlo <sup>[4]</sup>. Sin embargo, existe cierta discrepancia puesto que en otro estudio se detectó que no había diferencias <sup>[8]</sup> por lo que se deduce que se necesita realizar más estudios para evaluar si ciertos productos químicos están relacionados con el riesgo de linfoma canino <sup>[4]</sup>.

### ***Áreas industriales y uso de químicos***

La vida en zonas industriales y el uso de químicos por parte de los propietarios se han asociado con un aumento del riesgo de desarrollo de linfoma, mientras que la exposición a productos anti-pulgas y garrapatas no se ha relacionado con el riesgo de desarrollarlo <sup>[4]</sup>.

### ***Polución ambiental y desechos radiactivos***

Animales que viven cerca de incineradores de residuos, sitios radiactivos o contaminados presentan un mayor riesgo de padecer la enfermedad <sup>[8]</sup>

## 6.3 Factores inmunológicos

Se han identificado alteraciones del sistema inmunitario como la trombocitopenia inmunomediada donde se ha descubierto que los perros que padecen esta enfermedad tienen una mayor predisposición de desarrollar linfoma de lo que se deduce que las enfermedades autoinmunes son más frecuentes en perros con dicha neoplasia <sup>[19]</sup>.

## 6.4 Factores infecciosos

Recientemente, se ha sugerido la asociación del herpesvirus tipo 4 (Epstein Barr) con la presencia de linfoma ya que se han detectado anticuerpos frente a este virus en perros con la enfermedad, así como proteínas virales en sus ganglios linfáticos <sup>[29]</sup>. A pesar de estos hallazgos, no existe una evidencia definitiva de asociación entre las infecciones víricas o bacterianas y la patogénesis del linfoma <sup>[8]</sup>.

## 6.5 Otros factores

El protooncogén c-kit es un factor importante tanto en la proliferación, supervivencia como en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas. La expresión de c-kit en esta neoplasia es típicamente baja, pero se encontró que aumentaba en algunos linfomas de células T de alto grado <sup>[8]</sup>.

La familia Bcl-2 está compuesta por aproximadamente 25 proteínas que regulan la apoptosis a través del control de la formación del poro de permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMPP). El Bcl-2 canino antiapoptótico no se regula positivamente en los casos de linfoma de células B caninas<sup>[28]</sup>.

El inhibidor 2 de la vía del factor tisular del gen supresor tumoral (TFPI-2) está asociado con la inhibición de la invasión tumoral y la hipermetilación del gen, se identificó la regulación a la baja de la expresión del TFPI-2 en la mayoría de los linfomas caninos de células B de alto grado<sup>[30]</sup>.

La activación de NF-kB, un regulador de genes que controlan la proliferación celular y la apoptosis, y el aumento de la expresión del gen diana NF-kB se demostró en un subconjunto de perros con linfoma de células B. Además, se ha descubierto que el inhibidor del proteasoma bortezomib reduce la expresión de NF-kB e inhibe la proliferación celular en líneas celulares linfoides neoplásicas caninas<sup>[8]</sup>.

## **7. CLASIFICACIÓN.**

Debido a la complejidad de esta enfermedad contamos con diferentes criterios a la hora de clasificarla. Dicha clasificación se basa en su localización anatómica, las características inmunofenotípicas y el criterio histológico<sup>[19]</sup>.

### **7.1 Clasificación anatómica**

Existe una gran variedad de formas descritas en el linfoma canino, siendo las más importantes: linfoma multicéntrico (80%), linfoma mediastínico (5%), linfoma cutáneo (6,3%), linfoma alimentario (5-7%), linfoma extranodal<sup>[19]</sup>. Sin embargo, en este trabajo nos centraremos en la forma multicéntrica.

#### ***Linfoma multicéntrico***

Se trata de la presentación clínica más común en esta especie puesto que supone el 80% de los casos. Afecta a múltiples órganos, principalmente ganglios linfáticos periféricos<sup>[8]</sup>.

La forma más corriente con la que se presenta es una linfadenopatía generalizada no dolorosa, con hepatosplenomegalia e invasión de la medula ósea. Otros signos que se pueden encontrar son anorexia, pérdida de peso, vómitos, fiebre, síndrome poliuria-polidipsia. Sin embargo, muchos de los pacientes presentan exclusivamente una adenopatía, por este motivo hay un subestadiaje que se describirá posteriormente<sup>[8]</sup>.

El diagnóstico diferencial de la linfadenopatía dependerá de la historia del perro: donde vive, si ha viajado o no, tamaño, consistencia y localización de los ganglios afectados, así como los órganos afectados. Otras causas que pueden provocar linfadenopatía son: <sup>[19]</sup>

- Agentes infecciosos como bacterias, virus o parásitos (*Toxoplasma spp* y *Leishmania spp*), rickettsias (*Ehrlichia spp*), infecciones fúngicas o pioderma.
- Enfermedades inmunomediadas como pénfigo o lupus eritematoso.
- Otras neoplasias hematopoyéticas, como leucemias, enfermedades histiocíticas, incluso metástasis de otros tumores como mastocitomas o carcinomas.

## 7.2 Características inmunofenotípicas

Según el inmunofenotipo de las células a partir de las cuales se desarrolla el linfoma canino, la neoplasia se divide en linfomas de células B y T. Esta clasificación es de gran importancia puesto que está asociada a diferente pronóstico y respuesta al tratamiento <sup>[20]</sup>.

En medicina veterinaria, la mayoría de los linfomas caninos son de células B, los cuales representan entorno al 60-80%, le siguen los de células T con un 10-38%, los linfomas de células B y T son menos frecuentes con un 22% y por último los llamados *null cell* con tan solo un 5% <sup>[19]</sup>.

## 7.3 Criterio histológico

Es importante determinar el grado histológico de linfoma canino como bajo, intermedio o alto así como la arquitectura entre folicular o difusa. Para ello, se requiere la toma de una biopsia <sup>[8]</sup>.

Los linfomas de bajo grado están compuestos por células pequeñas presentando una tasa mitótica baja, generalmente progresan lentamente y se asocian con tiempos de supervivencia largos pero son incurables. Los linfomas de alto grado presentan una tasa mitótica alta, progresando rápidamente, pero responden mejor a la quimioterapia <sup>[19]</sup>. En 2009 aparece una nueva clasificación histológica de la WHO (World Health Organization), este nuevo sistema incorpora un criterio anatómico, histológico e inmunofenotípico, con la finalidad de permitir un diagnóstico reproducible entre los diferentes patólogos y dar más información del pronóstico <sup>[8]</sup>.

### **Clasificación World Health Organization (WHO)**

Es la clasificación que se usa actualmente para el diagnóstico del linfoma en humanos. Debido a su éxito en medicina humana, fue adaptada a la veterinaria. Gracias a la incorporación de este sistema de clasificación, los patólogos coinciden en un 83% de los casos y cuando se trata de los tipos más frecuentes, la precisión aumenta hasta el 87% <sup>[1]</sup>.

Las entidades neoplásicas más comunes de acuerdo con esta clasificación son: <sup>[1]</sup>

- Linfoma difuso de células grandes (54%).
- Linfoma de la zona marginal (4%).
- Linfoma periférico de células T no especificado (16%).
- Linfoma nodal de la zona T (14%).
- Linfoma linfoblástico T (5%).

De todas estas entidades, el linfoma difuso de células grandes es el subtipo más frecuente. Se trata de un tumor de alto grado, generalmente de origen de células B. con núcleos uniformemente grandes (> de 2 hematíes), redondeados y citoplasma escaso <sup>[1]</sup>.

## **8. DIAGNÓSTICO.**

A la mayoría de los perros a los que se les diagnostica la enfermedad se realiza de forma rutinaria una analítica completa donde se pueden observar una amplia gama de anomalías, además de las siguientes pruebas que se mencionan a continuación: <sup>[6]</sup>

### **8.1 Examen físico**

Se debe realizar una exploración minuciosa de todos los ganglios linfáticos accesibles (submandibulares, preescapulares, axilares, inguinales y poplíticos) puesto que uno de los signos clínicos más frecuentes es una linfadenopatía generalizada. Cuando se evalúan los ganglios, debemos siempre medir el tamaño y anotarlo. Es fundamental anotar el tamaño desde la primera visita y de forma periódica en cada una de las revisiones porque nos va a servir como sistema de evaluación de respuesta al tratamiento. Puede ser útil inspeccionar las mucosas en busca de palidez, ictericia, petequias o úlceras, signos que nos pueden hacer sospechar de una posible anemia o trombocitopenia <sup>[6]</sup>.

Una correcta palpación abdominal nos puede revelar la existencia de organomegalia (esplenomegalia) o linfadenopatía mesentérica. Por último, medir la temperatura rectal y comprobar si hay pérdida de peso o anorexia <sup>[6]</sup>.

### **8.2 Hemograma con examen del frotis**

La mayoría de los perros presentan una anemia moderada no regenerativa normocítica-normocrómica por enfermedad crónica <sup>[6]</sup>. Además, se pueden observar anomalías morfológicas en los eritrocitos que incluyen esquistocitos y acantocitos <sup>[33]</sup>.

Aunque los recuentos de leucocitos son típicamente normales, se ha descrito tanto leucocitosis como leucopenia. En la mayoría de los casos, la leucocitosis representa una respuesta inflamatoria, observándose neutrofilia <sup>[6]</sup>. La trombocitopenia leve y asintomática es común <sup>[6]</sup> encontrándose en el 30-50% de los casos <sup>[19]</sup>.

La mayoría de los perros con esta neoplasia presentarán anomalías leves en su perfil hemostático que tienden a persistir durante la quimioterapia [8].

### **8.3 Perfil bioquímico con proteinograma**

La bioquímica refleja, frecuentemente, el sitio anatómico implicado. Aunque los aumentos de los valores de las enzimas hepáticas o renales pueden ser el resultado de que el linfoma afecta a alguno de estos órganos, con frecuencia son secundarios a la enfermedad e indican una hepatopatía reactiva y deshidratación [6].

Los niveles de proteína sérica pueden disminuir debido a la pérdida de sangre o a nivel gastrointestinal como ocurre en la forma digestiva, pero también pueden aumentar debido a la gammapatía monoclonal (se ha descrito en el 6% de los perros con linfoma [19]).

La hipercalcemia se observa en un 15% de los casos (en 30-40% de los linfomas mediastínicos y en el 35% de los linfomas de células T). Se caracteriza clínicamente por anorexia, pérdida de peso, debilidad muscular, letargia, poliuria y polidipsia. Se debe a la producción por parte de las células tumorales de una molécula que se llama péptido-relacionado con la hormona paratiroidea [19].

### **8.4 Urianálisis**

El análisis de orina no se realiza de forma rutinaria, pero la proteinuria parece ser un hallazgo frecuente en perros con forma multicéntrica. Por lo general, es leve, independiente del estadio y no tiene impacto en el pronóstico [26].

### **8.5 Radiografías torácicas**

Las radiografías torácicas y abdominales de perros con linfoma multicéntrico a menudo muestran anomalías, aunque éstas son típicamente inespecíficas y simplemente sugieren dicha enfermedad como posible diagnóstico diferencial [8]. Las radiografías torácicas revelan hallazgos anormales en el 70% de los casos de linfoma e incluyen linfadenopatía torácica (ganglios esternales y traqueobronquiales afectados), infiltrados pulmonares y la presencia de una masa mediastínica craneal [19].

### **8.6 Ecografía abdominal**

La ecografía del abdomen y los ganglios linfáticos periféricos es útil para evaluar con precisión el tamaño y la arquitectura de los ganglios linfáticos así como si hay afectación hepática y esplénica [8].

Permite detectar una anormalidad focal o difusa en el tracto gastrointestinal (engrosamiento de una pared o capa, pérdida de la apariencia normal de las capas), una masa (intestinal, gástrica, ganglio mesentérico, pancreática, hepática, esplénica) o alteraciones focales o difusas en la ecogenicidad y tamaño de uno o ambos riñones, hígado, bazo y glándulas adrenales [8]. Además, es útil para ayudar en la toma de muestras mediante aspiración con aguja fina eco-guiada.

## 8.7 Aspirado de médula ósea

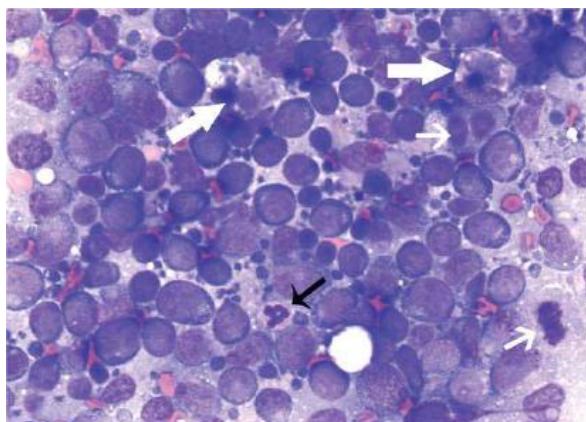
La afectación de la médula ósea se cita en hasta el 55% de los perros y no puede predecirse con precisión a partir de los recuentos de sangre periférica<sup>[31]</sup>.

Dado que las biopsias de médula ósea o citometría de flujo de muestras de médula ósea no se realizan de forma rutinaria en medicina veterinaria, el examen citológico de una sola muestra de aspiración de médula ósea sigue siendo la técnica más utilizada<sup>[32]</sup>.

## 8.8 Citología

El examen citológico se trata de una prueba rápida, económica, y mínimamente invasiva, convirtiéndose en una técnica de gran utilidad siempre y cuando se obtenga una buena muestra y sea examinada por un patólogo con experiencia<sup>[20]</sup>.

**Imagen 1.** Ganglio linfático de perro con linfoma. Se observa una población homogénea de células linfoides grandes con nucléolos prominentes y citoplasma basófilo. Estas células son más grandes que los neutrófilos (flecha negra). Las figuras mitóticas (flecha blanca delgada) y los macrófagos (flechas blancas gruesas) también están presentes<sup>[19]</sup>.



Si en la muestra obtenida se observa una población homogénea y mayoritaria de linfocitos grandes, es decir, con un diámetro del núcleo 3 veces el de un eritrocito, es susceptible de ser un caso de linfoma canino. Además de este hallazgo, existen una serie de factores que se pueden tener en cuenta a lo hora de facilitar el diagnóstico como son:<sup>[20]</sup> (Imagen 1)

- La ausencia de células plasmáticas y células inflamatorias como los neutrófilos, junto con la presencia de una población homogénea de células pequeñas o intermedias de linfocitos.
- La presencia de una población importante de células linfoides grandes en un linfonodo en el que abundan los linfocitos pequeños sin apreciar formas intermedias.
- La presencia de una población importante de células linfoides atípicas, aun siendo estas de pequeño tamaño (ej. Las células en “espejo de mano” características de linfoma T).
- La presencia de células con características morfológicas únicas, como los linfomas de células grandes granulares (LGL).

A su vez, es posible evaluar el grado del tumor gracias a la citología. (*Tabla 1*).

**Tabla 1.** Características citológicas para evaluar el grado de la neoplasia de acuerdo a la WHO<sup>[1]</sup>.

TAMAÑO CELULAR	ÍNDICE MITÓTICO	GRADO DE LINFOMA
Células pequeñas (1-1.5 veces el diámetro de un eritrocito)	Células pequeñas (1-1.5 veces el diámetro de un eritrocito)	Bajo grado
Células medianas (2-2.25 veces el diámetro de un eritrocito)	Células medianas (2-2.25 veces el diámetro de un eritrocito)	Alto grado
Células grandes (3 veces el diámetro de un eritrocito)	Células grandes (3 veces el diámetro de un eritrocito)	Alto grado

Algunos especialistas han aplicado ciertos criterios establecidos por la WHO, consiguiendo una concordancia de hasta el 90% en la diferenciación entre los fenotipos B y T<sup>[8]</sup>. En la bibliografía, disponemos de una serie de criterios morfológicos para diferenciar entre un origen B o T (*Tabla 2*).

Los criterios sugerentes de linfoma de células T son:<sup>[10]</sup>

- Núcleos irregulares.
- Patrón de cromatina fina.
- Citoplasma claro/moderadamente basófilo.

**Tabla 2.** Criterios citológicos que ayudan a establecer el inmunofenotipo del linfoma.<sup>[10]</sup>

CELULAS B VS T	
Macrófagos	Más en B (P=0,09)
Cuerpos linfoglandulares	Más en B (P<0,00001)
Mitosis	No diferencias significativas
Citoplasma vacuolado	No diferencias significativas
Células plasmáticas	Más en T (P=0,0001)

## 8.9 Histología

El estudio histológico continúa siendo la técnica de referencia en el diagnóstico del linfoma. Para la forma multicéntrica, se recomienda la escisión quirúrgica de un linfonodo completo, incluyendo la cápsula para mejorar el diagnóstico histológico<sup>[20]</sup>. Las ventajas que ofrece la histología residen en que permite alcanzar un diagnóstico definitivo en la mayoría de los casos. El principal inconveniente es que se trata de una técnica invasiva que puede no estar indicada en pacientes clínicamente inestables, además, requiere aplicar una clasificación muy compleja por parte de los anatomicopatólogos<sup>[1]</sup>.

Histológicamente, el linfoma canino se caracteriza en función de una serie de criterios morfológicos que incluyen el patrón de crecimiento, el tamaño nuclear, la morfología nuclear (patrón de cromatina, el número y la ubicación de los nucléolos), el índice mitótico y el inmunofenotipo.

Con base a estas características, el tumor se clasifica utilizando un esquema de clasificación <sup>[20]</sup>. Existen multitud de estos sistemas pero actualmente el que se utiliza como referencia es el de la WHO.

## 8.10 Inmunofenotipo

El inmunofenotipo se usa, generalmente, para determinar el tipo de células de las que proviene el linfoma. En algunas ocasiones, sirve además para obtener el diagnóstico de linfoma, porque cuando se espera que en un tejido haya una población diversa de linfocitos y lo que se encuentra es una población homogénea de células con el mismo inmunofenotipo, ese resultado apoya el diagnóstico de neoplasia, aunque hay que tener en cuenta que algunas enfermedades inflamatorias e infecciosas, pueden producir también una expansión homogénea de células linfoides (por ejemplo, *Ehrlichia canis* expansión de CD8+ T cells) <sup>[19]</sup>.

Para la determinación del inmunofenotipo, se utilizan anticuerpos frente a los marcadores de superficie de los linfocitos y se aplican sobre secciones de tejido (inmunohistoquímica), muestras de citología (inmunocitoquímica) o células individuales que se encuentran en un medio líquido (citometría de flujo).

Los anticuerpos más usados incluyen CD20, CD21, CD79a y PAX5 para el linfoma de células B y CD3, CD4 y CD8 para linfomas de células T <sup>[8]</sup>.

## 8.11 Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares se utilizan para obtener el diagnóstico de linfoma, o para caracterizar el tumor después de que el diagnóstico inicial haya sido efectuado. Ocasionalmente, el diagnóstico de linfoma y la diferenciación entre proliferación benigna o maligna de linfocitos no es posible (basándonos en los criterios estándar de histología o citología). En esos casos, es necesario un análisis molecular avanzado para confirmar el diagnóstico <sup>[14]</sup>.

### 8.11.1 Citometría de flujo

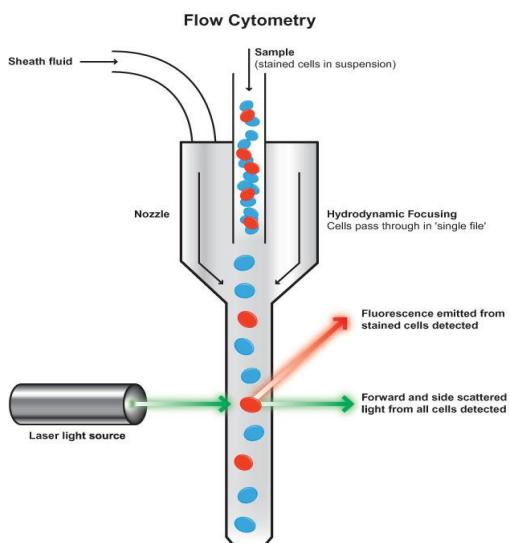
Se trata de una técnica que consiste en la caracterización de los linfocitos presentes en muestras en suspensión mediante la forma en que dispersan la luz y el uso de marcadores fenotípicos <sup>[25,40]</sup>.

En primer lugar, las células se marcan con anticuerpos, marcados a su vez con una molécula de fluoresceína (fluoróforo) para que puedan ser detectados. Estos anticuerpos se unen a receptores de superficie o intracelulares; después se hacen pasar por un conducto en el que se hace incidir una luz láser <sup>[20, 25, 40]</sup>.

La máquina (*Imagen 2*) una serie de detectores, de manera que cuando cada célula independiente pasa por el láser, los anticuerpos monoclonales de la superficie que tienen el fluoróforo son excitadas y emiten luz.

Los diferentes receptores recogen la cantidad de luz dispersada, así como la forma de dispersión y la fluorescencia emitida por los anticuerpos unidos a las células <sup>[20, 25]</sup>. (*Tabla 3*).

**Imagen 2.** Representación simplificada de los componentes y el funcionamiento de un citómetro de flujo.



Esta información obtenida es analizada y se representa en gráficas y valores numéricos, con lo que se obtiene información sobre el tamaño de las células, su complejidad interna y los anticuerpos que se han unido o no a ellas (marcadores celulares presentes en la muestra). [20, 25].

**Tabla 3.** Receptores comúnmente usados en citometría de flujo para el estudio inmunofenotípico del linfoma y células que los expresan [20].

ANTÍGENO	Antígeno encontrado en:
CD 45	Todos los leucocitos
CD 34	Células inmaduras (progenitor de células hematopoyéticas o leucemia)
CD 3	Linfocitos T
CD 4	Linfocitos T (helper) y neutrófilos
CD 5	Linfocitos T
CD 8	Linfocitos T (citotóxicos)
CD21	Linfocitos B maduros
CD 79 <sup>a</sup>	Linfocitos B en todos los estadios

Requerimientos de la muestra: [20,40]

- La muestra debe ser recogida antes de haber empezado con el tratamiento para que la población neoplásica de linfocitos no aparezca alterada.
- Las células deben estar en suspensión, no enviar fragmentos de tejido ni extensiones citológicas pues no son aptas.
- Debe haber un número suficiente de células puesto que las muestras con poca celularidad no aportan resultados fiables. Para obtener unos resultados adecuados ha de tomarse una muestra de una zona representativa con un mínimo de celularidad (ideal  $>4,5 \times 10^9$  células/L).
- El envío tiene que ser rápido y en refrigeración, nunca deben congelarse ya que se produciría la destrucción de las células.

La muestra se envía con una parte de suero salino fisiológico (SSF) y otra de suero del propio paciente. La viabilidad de las muestras es de unas 24-36 horas.

### Utilidad en el linfoma canino: [20]

**Determinación del inmunofenotipo:** las poblaciones de linfocitos presentes en los linfonodos deben ser similares a las que hay presentes en sangre periférica (tanto la proporción que hay de linfocitos B y T, como las subpoblaciones de linfocitos T).

El aspirado de linfonodos y posterior análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo ha demostrado ser una técnica fiable para el diagnóstico del linfoma.

### **Maduración tumoral:** [20]

- Los precursores linfoides y mieloides expresan CD34. Cuando hay presencia de células neoplásicas en médula ósea o en sangre, el uso de este marcador permite distinguir entre una leucemia aguda (si las células son positivas) o un linfoma en estadio V (si las células son negativas). La diferenciación entre linfoma estadio V y leucemia crónica es más compleja y debe basarse, principalmente, en los signos clínicos. Además, algunos linfomas pueden manifestar un cierto porcentaje de células positivas a CD34, lo que se considera un patrón de expresión aberrante.
- Los marcadores CD21 y CD79a ayudan a diferenciar entre linfocitos B maduros ( $CD21^+CD79a^+$ ) o linfocitos B inmaduros ( $CD21^-CD79a^+$ ).
- Los linfocitos T se forman como células doblemente negativas ( $CD4^-CD8^-$ ) hasta su maduración en la corteza del timo, donde pasan a ser doblemente positivos ( $CD4^+CD8^+$ ). En este mismo lugar, mediante la interacción con las células presentadoras de antígenos, se produce su diferenciación hacia linfocitos T colaboradores ( $CD4^+CD8^-$ ) o citotóxicos ( $CD4^-CD8^+$ ) y su movimiento hacia órganos linfoides secundarios, sangre y medula ósea. Este proceso de maduración es útil a la hora de distinguir un linfoma tímico, en el que suele haber expansión clonal de un inmunofenotipo concreto, y un timoma, en el que puede aparecer un alto número de células  $CD4^+CD8^+$ .

### **Detección de patrones aberrantes:**

Un patrón aberrante es la expresión cualitativa o cuantitativa anormal de un antígeno en las células linfoides neoplásicas [25].

Resulta útil a la hora de detectar enfermedad mínima residual y para establecer un pronóstico cuando ciertos patrones están presentes, no siendo siempre el pronóstico peor cuando se detecta el patrón aberrante (*Tabla 4*).

Dentro de los patrones aberrantes más frecuentes en el linfoma, se encuentran la coexpresión de antígenos de linfocitos B y T ( $CD3^+CD79^+$  y  $CD3^+CD21^+$ ), la expresión de CD34, la coexpresión de CD4 y CD8 en linfomas T y la pérdida de marcadores de leucocitos como el CD45 o el CD18 [11, 12].

La detección de la expresión aberrante de CD45 (antígeno leucocitario común) es un rasgo bastante frecuente en las neoplasias linfoides. Estas características son mucho más frecuentes en neoplasias precursores y en

neoplasias de células T pudiendo ser útiles a la hora de ayudar a diferenciar si se trata de una enfermedad reactiva o neoplásica<sup>[12]</sup>.

**Tabla 4.** Ejemplos de expresión aberrante de marcadores de superficie y su pronóstico asociado.<sup>[11]</sup>

PATRÓN ABERRANTE	PRONÓSTICO
Baja expresión de CMH II en linfoma B	Mayor mortalidad y menor tiempo hasta recaída.
Pérdida de CD45 en linfoma de zona T	Supervivencia mucho mayor que los que expresaban CD45
Pérdida de la expresión de CD 45	Curso clínico indolente
Disminución de CMH II en linfomas T CD4 <sup>+</sup>	Curso clínico agresivo

\*CMH II: Complejo mayor de histocompatibilidad clase 2.

#### **Estadioje y enfermedad mínima residual:**

La citometría de flujo permite evaluar la extensión de la enfermedad mediante la identificación de células neoplásicas en sangre periférica, médula ósea, hígado o bazo<sup>[20]</sup>. Además, la presencia de linfocitos con un patrón aberrante ayuda a su identificación como neoplásicos entre una población de linfocitos normales<sup>[25]</sup>.

La presencia de más del 3% de linfocitos B grandes en médula ósea de pacientes con linfoma B de células grandes se ha asociado a menor supervivencia (115 frente a 322 días) y una progresión más rápida de la enfermedad (69 frente a 149 días) comparado con aquellos pacientes con menos del 3% de estas células en médula ósea<sup>[20]</sup>.

La detección de marcadores de proliferación celular como el Ki67 también ha demostrado cierta finalidad para predecir el pronóstico en perros con linfoma de células B de alto grado, con aquellos pacientes con una marcación de Ki67 que supongan menos del 20,1% de las células neoplásicas muestran una mayor supervivencia que aquellos con una marcación superior<sup>[41]</sup>.

#### Ventajas de la técnica.<sup>[20]</sup>

- Realizar mediciones múltiples de forma simultánea en un gran número de células.
- La posibilidad de reunir una gran variedad de información de cada célula.
- La facilidad de la técnica, en comparación con otros métodos de inmunofenotipado.
- La rapidez con la que se obtienen los resultados.
- Determinar inmunofenotipo (linfoma de células B vs T).
- Diferenciar timoma (CD4+CD8+) de linfoma mediastínico de bajo grado (CD4+CD8-).
- Diferenciar linfoma estadio V (CD34-) de leucemia aguda (CD34+).
- Diferenciar poblaciones monomórficas no neoplásicas, por ejemplo, folículo linfoide esplénico.

Los principales inconvenientes son: [20]

- La necesidad de emplear muestras frescas y de suficiente celularidad.
- Su elevado precio debido al alto coste de los anticuerpos y los equipos de análisis.
- La necesidad de personal especializado para una correcta interpretación de los resultados.

#### 9.11.2 PCR para el reordenamiento de receptor de antígeno – ensayos de clonalidad (PARR).

Los linfomas son tumores hematopoyéticos causados por la expansión clonal de linfocitos. La detección de la clonalidad se basa en el hecho de que los linfocitos contienen regiones de ADN que son únicas en longitud y secuencia. Estas regiones únicas están mayoritariamente localizadas en los genes que codifican para la región CDR3 (Complementary Determining Region 3) tanto de las inmunoglobulinas como del receptor de células T gamma (TCR $\gamma$ ) [20,34].

La población maligna de células deriva de una expansión a partir de un único clon maligno. Por ejemplo, en un perro con linfoma de células T, todas las células malignas deben tener la misma secuencia de ADN para la región variable del gen del receptor de célula T (TCR). En el caso de un linfoma de células B, las células tumorales tienen que tener la misma secuencia de ADN en la región variable del receptor de inmunoglobulina; por el contrario, si se trata de una linfocitosis reactiva, las células tendrán que ser policlonales para sus receptores de antígenos [20,34].

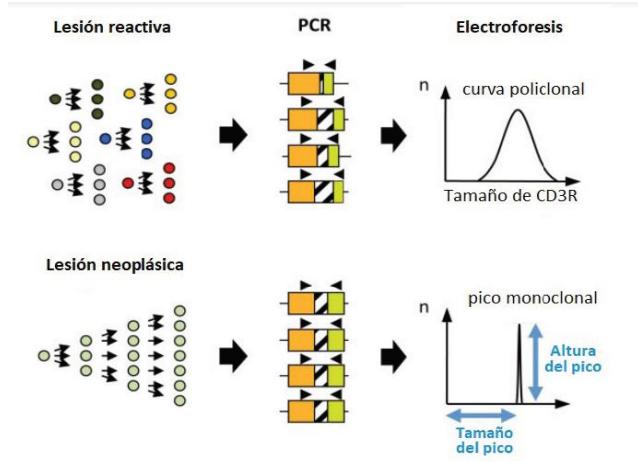
A partir de este concepto surge la PARR, una técnica de diagnóstico molecular capaz de amplificar el gen que codifica para la región variable de la célula T (TCR) y del receptor de inmunoglobulina, y así detectar poblaciones de linfocitos clonales. Es decir, se utiliza para saber si hay clonalidad o falta de ella en una población de linfocitos T o B que son sospechosos de ser neoplásicos [20,34].

En circunstancias normales, los receptores de linfocitos B y T presentan una variedad tan amplia como los distintos antígenos que son capaces de reconocer y, por lo tanto, la expansión del ADN que codifica para esos receptores reflejará esa variedad en los resultados de la PARR (expansión policlonal) [20,34].

En los procesos reactivos, los linfocitos derivan de múltiples células precursoras que difieren (en este caso) en distintos tamaños y combinaciones de la región complementaria 3 (CDR3, receptor de linfocitos T), lo que resulta en segmentos amplificados de distintos tamaños en la electroforesis que siguen una distribución en campana de Gauss. En los procesos neoplásicos, los linfocitos derivan de una única célula precursora y, por lo tanto, tienen idéntica longitud de CDR3, lo que resulta en segmentos amplificados de igual tamaño y un pico en la electroforesis [20,34] (*Imagen 3*).

La presencia de pico monoclonal u oligoclonal es altamente sugestivo de linfoma canino y aunque esta prueba tiene una alta sensibilidad (75%) y alta especificidad (95%), existen algunas infecciones como la ehrlichiosis monocítica y otras enfermedades neoplásicas como la leucemia mieloide aguda que pueden conducir a falsos positivos [20].

**Imagen 3.** Representación esquemática del principio de clonalidad. [34]



#### Requisitos de la muestra:

Para llevar a cabo la prueba es necesario que haya un número suficiente de linfocitos con el fin de conseguir una cantidad significativa de ADN (un mínimo aproximado de 50 mil células). Puede realizarse a partir de muestras de tejido fijado en formalina, congelado, extensiones citológicas o muestras de fluido. [20]

Esta técnica es tan sensible que puede dar un falso positivo en presencia de muy pocos linfocitos ya que si solo hay un linfocito, será una población clonal [14].

#### Indicaciones en el linfoma canino:

La técnica PARR se utiliza como una herramienta de diagnóstico adicional, siendo su principal aplicación diferenciar entre proliferaciones linfoideas reactivas y neoplásicas cuando el examen citológico y/o histológico no es concluyente [14].

Es importante recalcar que la PARR no debe utilizarse como única prueba para determinar el inmunofenotipo debido a la posibilidad de que aparezcan falsos positivos y negativos. Además, existen otras técnicas como la citometría de flujo que aportan mucha más información acerca del pronóstico [14]. La detección de la expresión aberrante de CD18 o CD45 en células neoplásicas es sugeritiva de clonalidad y también puede ser útil para confirmar la malignidad [12].

Posibles resultados e interpretación: [20]

Tanto los resultados como su interpretación se muestran en la *tabla 5*.

**Tabla 5.** Resultados más probables que se pueden obtener al realizar la técnica PARR y su interpretación.

RESULTADO OBTENIDO	INTERPRETACIÓN
Expansión monoclonal/biclonal de linfocitos B/T	Compatible con Linfoma B/T
Expansión policlonal de linfocitos B/T	Compatible con tejido linfoide normal o hiperplásico
Expansión monoclonal/biclonal de linfocitos B/T con presencia de fondo policlonal del mismo tipo de linfocitos y expansión policlonal de la otra población	Compatible con Linfoma B/T (a menor cantidad de fondo, mayor certeza).
Insuficiente cantidad de ADN	Escaso número de linfocitos en la muestra

Usos de PARR: [20,34]

- Determinar si hay una proliferación clonal de células linfoides en un tejido en particular.
- Confirmar o descartar la presencia de neoplasia linfoide (expansión monoclonal).
- Diferenciar entre un proceso reactivo (expansión policlonal) o neoplásico (expansión monoclonal).
- Monitorizar enfermedad residual en pacientes con linfoma.

Las ventajas de la técnica son superiores a los inconvenientes, siempre que se use con la finalidad para la que está indicada. [20]

- Posibilidad de realizar la prueba en gran variedad de muestras, incluso mucho tiempo después de haber sido tomadas.
- Permite hacer un examen citológico y/o histológico previo de la muestra, lo que permite evaluar la celularidad.
- Es poco invasiva, al poder realizarse a partir de aspirados citológicos.
- Económica en comparación con otras pruebas.

Los inconvenientes están asociados, principalmente a la técnica: [20]

- Necesidad de utilizar cebadores específicos de la especie.
- Requiere personal con conocimientos y experiencia en el campo de la genética.

**Tabla 6.** Principales diferencias entre la Citometría de flujo y la PARR.

CITOMETRIA DE FLUJO	PARR
Determina el inmunofenotipo de una población.	Determina si la población de la muestra es reactiva o neoplásica.
Requiere de células en suspensión y en un medio adecuado.	No requiere mucha celularidad.
Muestra (exclusivamente células vivas).	Muestra (variedad de muestras: células, tejidos, extensiones citológicas)

Más recientemente, se ha defendido el uso de la PARR como una alternativa para inmunohistoquímica o citometría de flujo, pero la citometría de flujo demostró ser superior a la PARR (la concordancia total entre las pruebas fue del 60%), aunque en ausencia de muestras frescas, el PARR puede ser una alternativa aceptable<sup>[35]</sup>. Aunque la PARR se ha utilizado para estadiar pacientes con linfoma, el estadio clínico demostró ser un mejor indicador de pronóstico que el estadio PARR y, como resultado, no se recomienda para la estadificación de rutina. La PARR puede usarse para el inmunofenotipo, pero es menos preciso que las técnicas basadas en anticuerpos y debe reservarse para aquellos casos en los que no hay muestras disponibles para la immunotinción o la citometría de flujo<sup>[35]</sup>.

## **9. ESTADIO CLINICO.**

Una vez que el diagnóstico de linfoma se confirma, es necesario establecer el estadio clínico del paciente. El estadio clínico implica una evaluación completa de la extensión de la enfermedad a la vez que ofrece información sobre el estado general del animal, pronóstico, monitorización de la respuesta al tratamiento y toma de decisiones. La Organización Mundial de la Salud (WHO) ha establecido una clasificación del estadio clínico sobre el linfoma canino de acuerdo con el lugar anatómico que se encuentre afectado:<sup>[8,19]</sup>

- Estadio I: solo está implicado un nódulo linfático o tejido linfoide de un único órgano.
- Estadio II: afectación regional de varios nódulos linfáticos del organismo.
- Estadio III: hay una afección generalizada de nódulos linfáticos no dolorosa.
- Estadio IV: afectación generalizada de nódulos linfáticos así como hígado y/o bazo.
- Estadio V: implicación de la sangre, medula ósea y/o otros órganos.

Existe a su vez, un subestadiaje “a” para indicar la ausencia de signos sistémicos, y “b” para indicar la presencia de signos sistémicos tales como fiebre, pérdida de peso, o hipercalcemia<sup>[8,19]</sup>.

## **10. TRATAMIENTO.**

### **10.1 Cirugía**

La cirugía se utiliza a menudo para conseguir un diagnóstico a través de una biopsia incisional, excisional o incluso una linfadenectomía. Se realiza también para aliviar una situación que compromete al paciente y que no puede esperar a que la quimioterapia haga su efecto. Hay que tener en cuenta que la cirugía no tiene ningún efecto sobre el tiempo de supervivencia<sup>[2]</sup>.

Está indicada en pacientes con linfoma en estadio I, por ejemplo, un solo ganglio linfático afectado o una lesión cutánea bien delimitada, sin embargo, no se recomienda como única forma de tratamiento puesto que la mayoría progresan a enfermedad sistémica y ello hace aconsejable la quimioterapia sistémica adyuvante <sup>[2]</sup>.

## 10.2 Radioterapia

Las células neoplásicas son radiosensibles y por tanto podría estar indicado. Sin embargo, tiene un papel limitado puesto que no hay un soporte hematológico y trasplante de medula ósea adecuados <sup>[8]</sup>.

La radioterapia se usa más comúnmente como terapia adyuvante para la quimioterapia sistémica y se puede realizar en una única sesión de irradiación de cuerpo entero (WBI) o en dos sesiones separadas de irradiación de medio cuerpo (HBI). Esta última presenta menos efectos secundarios que la WBI por lo que es preferida por los oncólogos <sup>[8]</sup>.

Un protocolo HBI utilizado para el tratamiento de linfoma en 94 perros, obtuvo un tiempo de supervivencia de 486 días <sup>[15]</sup>. Así también, se describen tiempos medios de remisión y de supervivencia en 6 perros tratados con quimioterapia y radioterapia a medio cuerpo de 455 y 550 días respectivamente. Estos resultados sugieren que la radioterapia a medio cuerpo junto con un protocolo de quimioterapia puede incrementar la duración de la remisión comparado con protocolos quimioterápicos solos <sup>[16]</sup>.

Debido a su alto coste de adquisición y mantenimiento, unido a la necesidad de formación de especialistas y personal de mantenimiento para hacer funcionar las máquinas, éstas están generalmente disponibles solo en centros oncológicos de referencia, en España solo existe un centro de estas características localizado en Córdoba (Ciovet).

## 10.3 Quimioterapia

### **Generalidades:**

La quimioterapia es una técnica terapéutica que consiste en la administración de fármacos citostáticos para el tratamiento del cáncer, que actúan interfiriendo el ciclo celular, de esta forma se consigue mantener controlado el crecimiento neoplásico. Las células del linfoma son sensibles a los fármacos quimioterápicos por lo que se considera la terapia de elección <sup>[2]</sup>.

Sin embargo, la mayoría de los pacientes con linfoma canino no se curan con este tratamiento; el objetivo de la quimioterapia es por lo tanto lograr una remisión completa a largo plazo con resolución de los signos clínicos y mejora /mantenimiento de la calidad de vida del paciente al mismo tiempo que se proporciona una toxicidad mínima al paciente <sup>[40]</sup>.

Los fármacos quimioterápicos usados para tratar pacientes con linfoma canino son similares a los utilizados en humanos, aunque existen diferencias importantes en el calendario de tratamiento, eficacia y toxicidad <sup>[40]</sup>.

### **Efectos secundarios/toxicidad:**

La toxicidad de la quimioterapia es uno de los principales problemas y de preocupación por parte de los propietarios ya que lo asocian a los efectos secundarios que produce en humanos. Por este motivo, hay que hacer especial hincapié en que se utilizan dosis más bajas y protocolos menos intensos que para el tratamiento de neoplasias humanas, por lo que generalmente es bien tolerada<sup>[17]</sup>.

Los efectos secundarios más frecuentes son la falta de apetito y letargia. Además de estos, podemos destacar la toxicidad hematológica que puede cursar con neutropenia, trombocitopenia y anemia; toxicidad gastrointestinal (vómitos y diarreas); reacciones alérgicas (urticaria, prurito) entre otras. Sin embargo, la mayor parte de estos efectos secundarios pueden prevenirse y/o tratarse de forma adecuada<sup>[17, 21]</sup> (*Tabla 7*).

**Tabla 7.** Algunos quimioterápicos comunes junto con su toxicidad<sup>[40]</sup>.

FÁRMACO	TOXICIDAD
Ciclofosfamida	Gastrointestinal, mielosupresión, cistitis hemorrágica estéril
Clorambucilo	Mielosupresión
Lomustina	Mielosupresión (neutropenia aguda y trombocitopenia crónica), hepatotoxicidad
Dacarbacina	Gastrointestinal
Doxorubicina	Gastrointestinal, mielosupresión, reacción de hipersensibilidad aguda, cardiotoxicidad
Vincristina	Gastrointestinal, mielosupresión, neuropatía periférica
L-asparaginaza	Hipersensibilidad: reacción anafiláctica en la primera hora post-administración.

### **Elección del protocolo:**

Debido a la cantidad de protocolos quimioterápicos disponibles, se deben considerar muchos factores que deben ser discutidos con el propietario para hacer la mejor elección (coste de tratamiento, la experiencia del clínico, el número de visitas, uso de protocolo multi-agente o de agente único, tipo de linfoma)<sup>[2]</sup>.

En general, los protocolos quimioterápicos más complejos son más caros, requieren de más tiempo, además de presentar mayor toxicidad en comparación con protocolos simples (solo un agente). A pesar de esto, la terapia combinada continúa siendo la de elección porque utilizan drogas con distintos mecanismos de acción, evitando el desarrollo de multiresistencias<sup>[2]</sup>.

Como se ha ido presentando anteriormente, el linfoma canino no es una única entidad, sino que existen diferentes tipos, por lo que en la actualidad cada uno recibe un tratamiento específico que se explica a continuación.

### Tratamiento del linfoma indolente

El linfoma indolente o de bajo grado es una neoplasia de proliferación lenta, por lo que la quimioterapia se debe usar con precaución ya que afecta principalmente a las células que se replican activamente. En medicina humana, la mayoría de los linfomas indolentes inicialmente no reciben tratamiento y, por lo general, se recomienda una estrategia de ‘watchful waiting’<sup>[2,8]</sup>.

Solo en etapas avanzadas de la enfermedad, es decir, ante la presencia de signos sistémicos, depresión de la médula ósea... se recomienda quimioterapia. De acuerdo con la estrategia que se sigue en humanos, los perros asintomáticos con linfomas indolentes solo deben ser monitorizados<sup>[2,8]</sup>.

Recientemente, se ha demostrado que los perros con linfomas de bajo grado tienen un buen pronóstico a largo plazo y que el uso de protocolos basados en CHOP no ofrece ningún beneficio de supervivencia<sup>[36]</sup>.

En otro estudio se observó que, perros sin tratamiento para TZL vivieron una media de 22.6 meses, los que si fueron tratados con doxorubicina alcanzaron medias de 13.4 meses y los que recibieron quimioterapia sin doxorubicina fue de 10,3 meses<sup>[9]</sup>.

Por lo tanto, se recomienda que solo se hagan controles del tamaño de los ganglios linfáticos y de la hematología y no se traten o en el caso de ser tratados (cuando la enfermedad progresiona o el paciente muestra signos clínicos)<sup>[3]</sup>, se utilicen protocolos de baja intensidad como clorambucilo y prednisolona (CP)<sup>[40]</sup>.

### Tratamiento del linfoma de grado intermedio/alto

Dentro del linfoma de grado intermedio/alto, el tratamiento es diferente en función del origen de las células, es decir, si es de linfocitos B o T ya que no responden igual al mismo tipo de quimioterápicos.

Por un lado, el tratamiento estándar para el linfoma de células B se basa en un protocolo CHOP ya que presenta una tasa de respuesta cercana al 90%<sup>[18]</sup>. Recientemente ha aparecido un protocolo que se basa en la alternancia de rabacfosadina y doxorubicina. Este protocolo presenta una tasa de respuesta del 84% con un intervalo libre de progresión de 194 días de media. Aunque la rabacfosadina no está todavía comercializada en Europa<sup>[13]</sup>.

Sin embargo, Los pacientes con linfoma de células T de alto grado tratados con protocolo CHOP presentan una tasa de remisión más baja (del 40%), una remisión menos duradera, es decir, recaen más temprano y presentan una tasa de supervivencia menor (5.3 meses) que los perros con linfoma de células B tratados con el mismo protocolo<sup>[9]</sup>. Además, la efectividad de la doxorubicina es deficiente, solo el 50% de los perros respondieron en comparación con el 100% en casos de linfomas de células B<sup>[8]</sup>. En otro estudio se observó que utilizar un protocolo basado en L-CHOP produjo una remisión completa en el 88% de los pacientes, sin embargo, el periodo medio de supervivencia fue bastante corto, de apenas 3.4 meses<sup>[37]</sup>. Una posible causa de la falta de respuesta ante el protocolo CHOP es la resistencia a múltiples fármacos.

Los fármacos exportados por MDR-1 (doxorubicina, vincristina) serían menos efectivos. La inclusión de agentes alquilantes en un protocolo para el tratamiento de linfoma T de alto grado es lógico puesto que estos agentes no se ven afectados por MDR-1 y muestran poca resistencia cruzada<sup>[3]</sup>.

Por ello, se ha sugerido que los protocolos basados en agentes alquilantes como L-asparaginasa podrían ser superiores a un protocolo clásico basado en CHOP donde se observa una mejora en el periodo libre de enfermedad (remisión)<sup>[3,8]</sup>. En un estudio de 50 perros con linfoma de células T de alto grado tratados con L-MOPP se observó una tasa superior de respuesta y tiempo de supervivencia en comparación con los tratados con CHOP<sup>[3]</sup>.

Otra posibilidad, es usar un protocolo tipo LOPP, ya que en un estudio reciente, 31 perros fueron tratados con LOPP obteniéndose los resultados que se observan en la *tabla 8*<sup>[18]</sup>.

**Tabla 8.** Comparación de los resultados de 4 protocolos combinados utilizados para tratar el linfoma de células T.

	Protocolo VELCAP-TSC <sup>[3]</sup>	Protocolo L-MOPP <sup>[3]</sup>	Protocolo CHOP <sup>[37]</sup>	Protocolo LOPP <sup>[18]</sup>
Número de perros	70	50	24	31
% remisión completa	64%	78%	88%	97%
Supervivencia media en días	237	278	234	176
1 año de supervivencia	31%	-	14%	39%
2 años de supervivencia	20,2%	>25%	5%	25%
Toxicidad	90%	67%	-	42%

\*VELCAP-TSC: vincristina, L-asparaginasa, ciclofosfamida, doxorubicina, mitoxantrona, actinomicina D, procarbacin, prednisolona y lomustina.

\* L-MOPP: L-asparaginasa, mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbacin.

\* CHOP: Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y Prednisona.

\*LOPP: lomustina, vincristina, procarbacin, prednisolona.

### **Limitaciones de la quimioterapia**

La eficacia de la quimioterapia está limitada por el desarrollo de la resistencia (DR) a los fármacos quimioterápicos. El DR puede tener muchas causas pero se cree que los transportadores de fármacos de la superfamilia de cassettes ATP-binding, incluyendo P-gp (ABCB1), MRP1 (ABCC1) y BCRP (ABCG2) juegan un papel importante<sup>[8]</sup>.

Un estudio prospectivo reciente mostró que, aunque la expresión del ARNm del transportador ABC es común en el linfoma canino, es poco probable que sea la única causa. El DR fue más común en las células T que en el linfoma de células B<sup>[8]</sup>.

Dichas limitaciones de la quimioterapia condicionan la necesidad de valorar el empleo de otras modalidades terapéuticas que traten de atacar las células tumorales por otras vías.

## 10.4 Inmunoterapia

Esta terapia se basa en el uso de los anticuerpos, proteínas producidas por el sistema inmunitario que se unen a su antígeno específico en la superficie celular (diana) y el sistema inmune es capaz de identificarlo y eliminar las células donde el anticuerpo se haya unido <sup>[8]</sup>.

En la actualidad existen 2 anticuerpos monoclonales para el tratamiento del linfoma canino. Aunque todavía están bajo estudios clínicos y hay pocos datos sobre su eficacia, todo parece indicar que los nuevos avances en el tratamiento del linfoma se centran en combinar la inmunoterapia con la quimioterapia <sup>[3,8]</sup>.

Uno de los anticuerpos monoclonales está dirigido para el linfoma de células B (AT004) y el otro está dirigido al linfoma de células T (AT005). El AT004 es un anticuerpo dirigido frente al antígeno CD20 (antígeno que se expresa en células B de perros con linfoma) que combinado con quimioterapia aumenta el porcentaje de remisión completa y el periodo libre de enfermedad <sup>[8,40]</sup>. El AT005 se trata de un anticuerpo dirigido frente al antígeno CD52 que se expresa en células T de perros con linfoma <sup>[8]</sup>.

## 11. PRONÓSTICO.

Aproximadamente entre el 70-80% de los casos con linfoma multicéntrico alcanzan remisiones completas con un tratamiento adecuado y permanecen en esa fase de 6 a 9 meses de media. Una vez que la enfermedad reaparece, el pronóstico empeora, ya que menos del 50% de los casos responde a la terapia de rescate <sup>[2]</sup>.

El pronóstico del linfoma varía y depende de diferentes factores que se nombran a continuación (*tabla 9*):

**Tabla 9.** Factores pronóstico asociados al linfoma canino.

FACTOR	COMENTARIOS
<b>Subestadio clínico (WHO)</b>	Subestadio b se asocia con una menor supervivencia
<b>Grado histológico</b>	Grado intermedio/alto → alta respuesta al tratamiento pero reducida supervivencia. Linfoma indolente → supervivencia prolongada incluso sin tratamiento.
<b>Inmunofenotipo</b>	Linfoma de células T → supervivencia reducida.
<b>Hipercalcemia</b>	Se asocia con un peor pronóstico
<b>Estadio clínico*</b>	Estadio I y II → favorable ; Estadio V → desfavorable
<b>Anemia</b>	Asociado a peor pronóstico
<b>Linfocitosis (Linfoma T)</b>	Recuentos superiores a 9.2 tienen un mayor tiempo de supervivencia.
<b>Pretratamiento con glucocorticoides</b>	El tiempo de supervivencia está reducido en los pacientes que han sido tratados previamente con glucocorticoides.

(\*): Requiere una mayor investigación.

## **Signos clínicos/Estadio clínico**

Los perros con linfoma que presentan diversos signos clínicos o con enfermedades concomitantes a nivel cardiaco, pulmonar, renal... influyen en gran medida en el protocolo de tratamiento y la supervivencia. Estos aspectos se asocian con un subestadio b, es decir, con un pronóstico más desfavorable [5].

## **Inmunofenotipo**

Según multitud de estudios, los linfomas de células B son más frecuentes y se asocian a mayor tiempo de supervivencia y de remisión en comparación con los linfomas de células T. Algunos de estos estudios describen una supervivencia media de 389 días para los linfomas B respecto a los 159 días de media de los linfomas T [20].

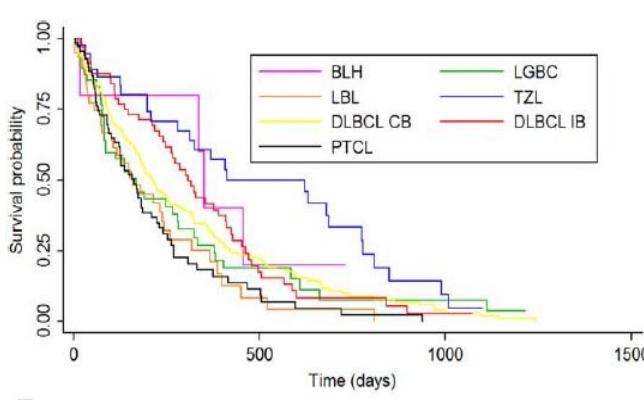
## **Grado histológico (Imagen 4)**

Los linfomas de intermedio-alto grado de células B responden mejor a la quimioterapia. Perros con linfoma de bajo grado, pueden tener largos tiempos de supervivencia sin necesidad de una terapia agresiva [9].

Según un estudio reciente que estudiaba la asociación entre la clasificación histológica, el estadio del tumor, el subtipo del tumor, el índice mitótico y el tratamiento del linfoma canino con la supervivencia, se comprobó que el grado histológico basado en el índice mitótico era una de las características más importantes para predecir el pronóstico de la enfermedad [9].

De esta forma se observó, que el linfoma de alto grado de células T era el subtipo con un peor pronóstico (162 días de supervivencia de media), mientras que el linfoma de bajo grado de células T mostraba el mejor pronóstico (622 días de media) compartiendo ambos el mismo inmunofenotipo [9].

**Imagen 4.** Probabilidad de supervivencia en 7 grupos distintos [9].



- BLH: Hiperplasia linfoide benigna.
- LGBC: linfoma de células B de bajo grado.
- LBL: linfoma de células B de alto grado.
- TZL: Linfoma de células T de bajo grado.
- DLBCL CB: linfoma B centroblástico de células grandes.
- DLBCL IB: linfoma B inmunoblástico de células grandes.

## **Pre-tratamiento con glucocorticoides**

El tratamiento a base de glucocorticoides antes de iniciar el tratamiento quimioterápico reduce la tasa de respuesta a la quimioterapia [6, 38].

La falta de respuesta a la terapia (sin respuesta completa) ya sea al inicio de la terapia o después de una recaída, afecta negativamente el resultado del tratamiento y por consiguiente al valor pronóstico. En todas estas situaciones, se cree que el fracaso del tratamiento es el resultado de la resistencia a los quimioterápicos<sup>[8]</sup>.

#### ***Presencia de hipercalcemia***

Se trata un indicador de mal pronóstico<sup>[38]</sup> pero también está asociado con el inmunofenotipo de células T<sup>[8]</sup> y se ha demostrado que la presencia de hipercalcemia en los linfomas de células T no tiene ningún efecto negativo en la respuesta al tratamiento o la supervivencia<sup>[37]</sup>.

#### ***Índices proliferativos***

Los índices proliferativos incluyen índice mitótico, PCNA, Ki-67 y regiones organizadoras nucleolares agrofílicas (AgNOR), de los cuales Ki-67 y AgNOR se pueden evaluar tanto en muestras histológicas como citológicas. La expresión de Ki-67, PCNA y AgNOR es más alta en pacientes con linfoma canino que en proliferaciones linfoides benignas<sup>[8]</sup>.

Además, los niveles de expresión de AgNOR y Ki-67 se relacionaron con el grado<sup>[39]</sup> y demostraron tener valor pronóstico a diferencia del índice mitótico y la expresión de PCNA<sup>[9]</sup>.

## **12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

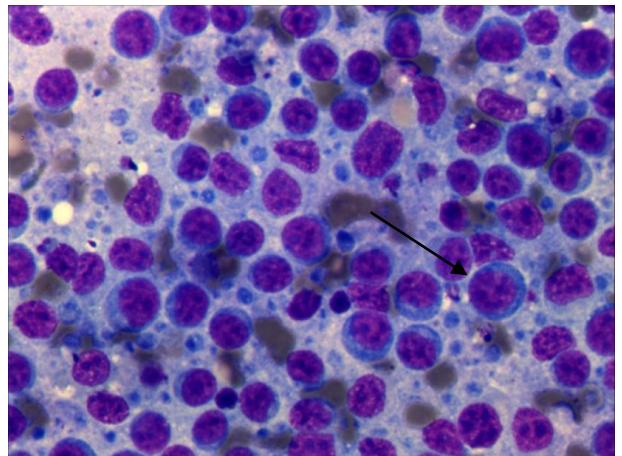
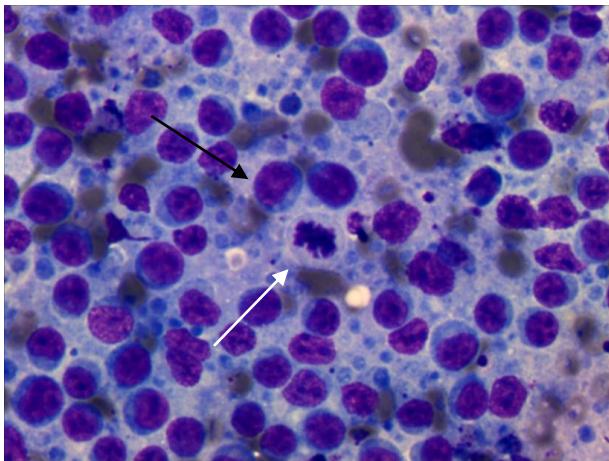
A continuación, se presentan 2 casos procedentes del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza.

#### **Caso 1.**

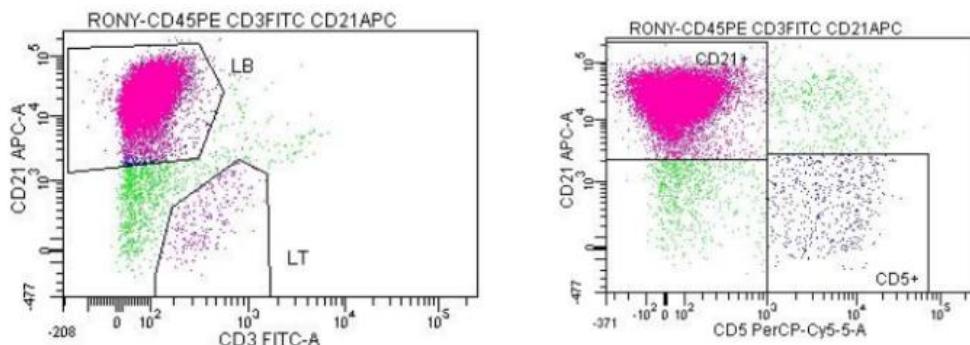
Rony, un Shar-pei de 14 años, castrado acude a consulta de medicina interna (08/01/2018) porque ha perdido peso (25,5kg a 22,4 kg), ha tenido algún vómito y lo notan más apático. Durante la exploración, lo único reseñable es una linfadenopatía generalizada (preescapulares, submandibulares y poplíticos aumentados de tamaño). Se realiza hemograma, bioquímico y citología (*imágenes 5 y 6*), la cual es compatible con un linfoma de alto grado. Posteriormente se propone a los dueños llevar a cabo una Citometría de Flujo para conocer el inmunofenotipo del linfoma, remitiéndose aspirado de ganglio linfático. Además, gracias a esta técnica podemos constatar que se trata de un linfoma de células grandes puesto que el tamaño de los linfocitos B (tumorales) es 1,88 veces el de los linfocitos T (sanos) y que el valor Ki67 supera el 40%. Ambos hallazgos son considerados factores pronósticos negativos<sup>[41]</sup>.

Tras obtener los resultados de la citometría de flujo (*imágenes 7 y 8*), se confirma un linfoma de células B de alto grado y se empieza a tratar con protocolo UW Madison CHOP. A día 05/09/2018 continua en remisión.

**Imágenes 5 y 6.** Citológias del ganglio poplíteo izquierdo y preescapular de Rony. Se observa una población homogénea de linfoblastos (flechas negras). Se pueden apreciar figuras de mitosis (flecha blanca).



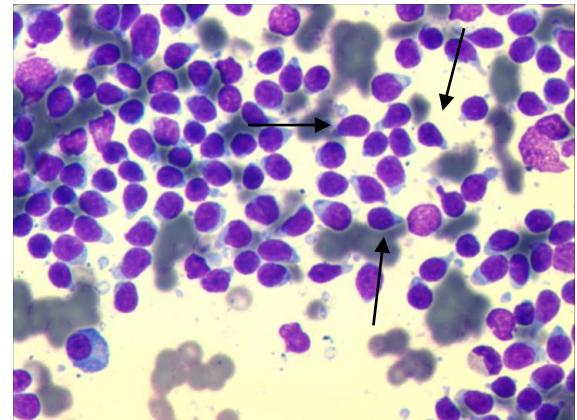
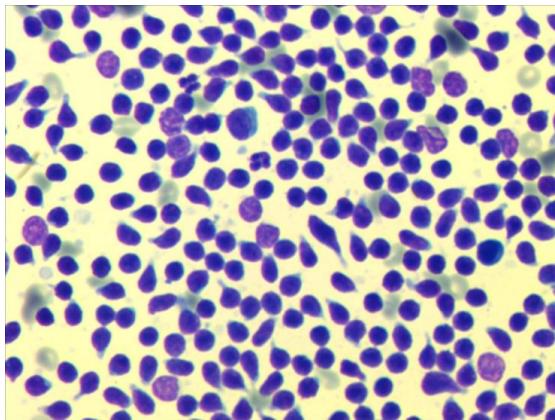
**Imágenes 7 y 8:** Resultados obtenidos en la citometría de flujo donde se muestra que la población celular predominante en el ganglio de Rony son células linfoides tipo B ( $CD45^+$ / $CD21^+$ / $CD3^-$ / $CD5^-$ ).



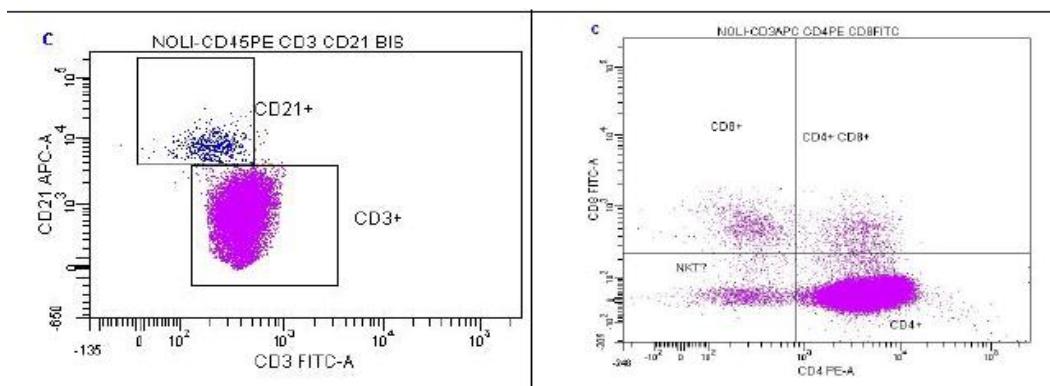
### Caso 2.

Noli, una Yorkshire terrier de 14 años, esterilizada acude a consulta de oncología remitida por su veterinario (15/06/2017) porque presentaba un “bulto” y la notan muy apática. Durante la exploración, lo único reseñable es una linfadenopatía generalizada (submandibulares y poplíticos aumentados de tamaño). Se realiza una citología (*Imágenes 9 y 10*), la cual es compatible con un linfoma de bajo grado. Posteriormente, se propone a los propietarios la realización de una citometría de flujo (21/06/2017). Para ello, se obtiene una muestra por punción con aguja fina (PAF) del ganglio. Los resultados de la prueba muestran que se trata de un linfoma de bajo grado de células T. (*Imágenes 11 y 12*). Al tratarse de un linfoma indolente que muestra signos clínicos se decide empezar a tratar con prednisona y clorambucilo (28/06/2017). El 26/05/2018 muere en UCI debido a una insuficiencia respiratoria asociada a colapso traqueal.

**Imágenes 9 y 10.** Las citologías provienen de los ganglios submandibular y poplíteo derecho. Podemos observar abundante celularidad formada por una población homogénea de células linfoides de pequeño tamaño (*Imagen izquierda*), de las cuales, muchas de ellas presentan la típica imagen de “espejo de mano” (*flechas negras*). Este hallazgo hace que sea compatible con un linfoma de células T de bajo grado.



**Imágenes 11 y 12.** Resultados obtenidos en la citometría de flujo donde se muestra que la población celular predominante en el ganglio de Noly son linfoblastos tipo T helper ( $CD45^+/CD21^-/CD3^+/CD4^+$ ).



A la hora de abordar ambos casos, tanto el protocolo de actuación como el diagnóstico son similares. Gracias a la citología podemos establecer el grado del linfoma evaluando el tamaño celular, basofilia citoplasmática, presencia de nucléolos evidentes y de mitosis. En el *Caso 1* podemos observar que los núcleos de las células son más grandes que un glóbulo rojo ( $>2-3$  veces) y encontramos abundantes mitosis ( $> 3$  por campo) por lo que es compatible con un linfoma de alto grado mientras que en el *Caso 2*, el tamaño de los núcleos es pequeño (solo  $1-1,5$  veces más grandes que un glóbulo rojo) y no se observan apenas mitosis ( $<1$  por campo) siendo compatible con un linfoma de bajo grado.

Además, la citología puede ayudar a orientar el inmunofenotipo, en el *Caso 1* se observan gran cantidad de células linfoglandulares, basofilia y presencia de nucléolos evidentes lo cual es típico en un linfoma de células B mientras que en el *Caso 2* aparecen células con la imagen de “espejo de mano” lo cual es frecuente en un linfoma de células T. La citometría de flujo nos confirma el inmunofenotipo, puesto que en el *Caso 1* se representa la marcación en el eje vertical para CD21 y en el eje horizontal para CD5, siendo la mayoría de las células positivas a CD21 (marcador de células B) mientras que en el *Caso 2*, la mayoría de las células son positivas para el marcador CD4 (marcador de células T). Una vez conocido tanto el inmunofenotipo como el grado del linfoma, es necesario elegir el tratamiento más adecuado en función a estas características.

En el *Caso 1* (linfoma de alto grado de células B) el tratamiento de elección es un protocolo CHOP que se empezó a aplicar el día 11/01/2018 y hasta hoy (05/09/2018) continúa en remisión completa con un tiempo de supervivencia de 230 días sin sintomatología y ninguna recaída. En el *Caso 2* (linfoma de bajo grado de células T) se decide realizar un protocolo a base de clorambucilo y prednisona (CP) que se empieza el 28/06/2017 llegando a estar en remisión completa hasta que fallece (26/05/2018) alcanzando un tiempo de supervivencia de 333 días. La causa de la muerte, es ajena al linfoma puesto que se debió a una insuficiencia respiratoria asociada a un colapso traqueal.

En ambos casos, el uso combinado de la citología y la citometría de flujo permitieron elegir el protocolo más eficaz para cada paciente. Por este motivo, el conocer el inmunofenotipo y el grado del tumor es importante a la hora de decidir el tratamiento, a la vez que se consigue establecer un pronóstico más fiable.

## **13. CONCLUSIONES.**

- 1) El linfoma canino no es una entidad única si no que se trata de un grupo de enfermedades con diferente pronóstico incluso con diferente tratamiento.
- 2) La Citometría de Flujo se ha convertido en una importante herramienta de diagnóstico en medicina veterinaria como método mínimamente invasivo utilizado para apoyar un diagnóstico citológico de linfoma y para determinar el inmunofenotipo a la hora de establecer el pronóstico.
- 3) La técnica PARR se utiliza principalmente para diferenciar entre proliferaciones linfoides reactivas y neoplásicas cuando el examen citológico y/o histológico no es concluyente.
- 4) Las técnicas moleculares han demostrado tener un gran potencial para ayudar en el diagnóstico y caracterización del linfoma, permitiendo al veterinario proporcionar una estimación de la supervivencia y un pronóstico más precisos.
- 5) El linfoma B de alto/intermedio grado suele responder mejor a la quimioterapia, mientras que el linfoma T de bajo grado puede tener supervivencias medias más largas sin necesidad de tratamientos quimioterapicos agresivos.

- 6) Los dos factores más fiables a la hora de establecer el pronóstico en el linfoma canino son el grado histológico y el inmunofenotipo. Esto confirma que ambos factores se deben tener en cuenta de forma conjunta.

## **CONCLUSIONS.**

- 1) Canine lymphoma is not a single entity but it is a group of diseases with different prognosis, even with different treatment.
- 2) Flow Cytometry has become an important diagnostic tool in veterinary medicine as a minimally invasive method used to support a cytological diagnosis of lymphoma and to determine the immunophenotype when establishing the prognosis.
- 3) The PARR technique is used mainly to differentiate between reactive and neoplastic lymphoid proliferations when cytological and / or histological examination is inconclusive.
- 4) Molecular techniques have been shown to have great potential to aid in the diagnosis and characterization of lymphoma, allowing the veterinarian to provide a more accurate estimate of survival and prognosis.
- 5) High / intermediate grade B lymphoma usually responds better to chemotherapy, while low grade T lymphoma may have longer average survival without the need for aggressive chemotherapy treatments.
- 6) The two most reliable factors when establishing the prognosis in canine lymphoma are the histological grade and the immunophenotype. This confirms that both factors must be taken into account jointly.

## **14. VALORACIÓN PERSONAL.**

Elegí el linfoma canino para realizar mi trabajo de fin de grado porque la oncología es una de las especialidades que más me interesa y quería profundizar en él, más allá de lo que se da en el grado.

Llevar a cabo este trabajo me ha ayudado a conocer más profundamente lo que es el linfoma canino y todos los aspectos que le rodean, a su vez me ha servido para darme cuenta de que no existe un diagnóstico y tratamiento perfectos, si no que es necesario evaluar cada paciente y en función de eso escoger el más indicado para ese caso en concreto.

A su vez, he podido profundizar en otros temas como la citología para ser capaz de distinguir las diferentes células que podemos encontrar así como su morfología. También describir los resultados que podemos obtener en la citometría de flujo y PARR e interpretarlos. Por último, me ha servido para saber moverme a la hora de buscar en bases de datos y a citar correctamente la bibliografía.

## **15. BIBLIOGRAFÍA.**

- [1] Valli V.E., San Myint M, Barthel A, et al. (2011). '*Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria*'. Veterinary Pathology, 48, 198-211.
- [2] Flores S., Del Riego H. (2012). '*Update of therapy of the canine patient with lymphoma*'. Hospitales Veterinarios, 4, 3.
- [3] Moore A. (2016). '*Treatment of T cell lymphoma in dogs*'. Veterinary Record, 179, 277-281.
- [4] Takashima-Uebelhoer B., Barber L., Zagarins S., et al. (2012). '*Household Chemical Exposures and the Risk of Canine Malignant Lymphoma, a Model for Human Non-Hodgkin's Lymphoma*'. Environ Res, 112, 171-176.
- [5] Barber L.G., Weishaar K.M. (2016). '*Criteria for designation of clinical substage in canine lymphoma: a survey of veterinary oncologists*'. Veterinary and Comparative Oncology, 14, 32-39.
- [6] Gavazza A., Lubas G., Valori E., Gugliucci B. (2008). '*Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features*'. Veterinary Research Communications, 32, 291-293.
- [7] Regan R.C., Kaplan M.S.W, Bailey D.B. (2012). '*Diagnostic evaluation and treatment recommendations for dogs with substage-a high-grade multicentric lymphoma: results of a survey of veterinarians*'. Veterinary and Comparative Oncology, 11, 287-295.
- [8] Zandvliet M. (2016). '*Canine Lymphoma: a review*'. Veterinary Quarterly, 36, 2.
- [9] Valli V.E., Kass P.H., San Myint M. and Scott F. (2013). '*Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival*'. Veterinary Pathology, 50, 738-748.
- [10] Sozmen M., Tasca S., Carli E., et al. (2005). '*Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas*'. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17, 323-329. Veterinary Immunology and Immunopathology, 168, 242-248.
- [11] Fogle J.E., Tarigo J.L., Thalheim L. et al. (2015). '*CD45+ and CD45- lymphocyte populations identified by flow cytometry from dogs with lymphoma exhibit similar morphology and the same clonal (B cell or T cell) lineage*'. Veterinary Immunology and Immunopathology, 168, 242-248.
- [12] Comazzi S., Gelain M.E., Riondato F. and Paltrinieri S. (2006). '*Flow cytometric expression of common antigens CD18/CD45 in blood from dogs with lymphoid malignancies: A semi-quantitative study*'. Veterinary Immunology and Immunopathology, 112, 243-252.
- [13] Thamm D.H. Vail D.M., Post G.S., et al. (2017). '*Alternating Rabacfosadine/Doxorubicin: Efficacy and Tolerability in Naïve Canine Multicentric Lymphoma*'. Journal of Veterinary Internal Medicine, 31, 872-878.
- [14] Berent L.M. (2005). '*Molecular Tests for the Diagnosis and Classification of Canine Lymphoma*'.
- [15] Williams L., Johnson J., Hauck M., et al. (2004). '*Chemotherapy followed by half-body radiation therapy for canine lymphoma*'. Journal of Veterinary Internal Medicine, 18, 703-709.

- [16] Gustafson N.R., Lana S.E., Mayer M.N., LaRue S.M. (2004). '*A preliminary assessment of whole-body radiotherapy interposed within a chemotherapy protocol for canine lymphoma*'. Veterinary and Comparative Oncology, 2, 125-131.
- [17] Henry C., Higginbotham M. (2010). '*Cancer Management in Small Animal Practice*'. Maryland Heights, Missouri, USA: Elsevier Company.
- [18] Brown P.M., Tzannes S., Nguyen S., et al. (2017). '*LOPP chemotherapy as a first-line treatment for dogs with T-cell lymphoma*'. Veterinary and Comparative Oncology, 16, 108-113.
- [19] Withrow S.J., Vail D.M. (2007). '*Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*'. St Louis, Missouri, USA: Elsevier Company.
- [20] Meléndez A., Pastor J. (2017). '*Nuevas herramientas para el diagnóstico de linfoma canino*'. Consulta de Difusión Veterinaria, 246, 39-45.
- [21] Wang S.L., Lee J.J., Liao A.T. (2015). '*Chemotherapy-induced neutropenia is associated with prolonged remission duration and survival time in canine lymphoma*'. The Veterinary Journal, 205, 69-73.
- [22] Villamil J.A., Henry C.J., Hahn A.W., et al. (2009). '*Hormonal and sex impacto on the epidemiology of canine lymphoma*'. Journal of Cancer Epidemiology, 2009, 1-7.
- [23] Torres de la Riva G., Hart B.L., Farver T.B. et al. (2013). '*Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers*'. Plos One, 8, e55937.
- [24] Zink M.C., Farhoody P., Elser S.E., et al. (2014). '*Evaluation of the risk and age of onset of cancer and behavioral disorders in gonadectomized vizslas*'. Journal of the American Veterinary Medical Association, 244, 309-319.
- [25] Comazzi S., Gelain M.E. (2011). '*Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma*'. The Veterinary Journal, 188, 149-155.
- [26] Di Bella A., Maurella C., Cuavin A. et al. (2013). '*Proteinuria in canine patients with lymphoma*'. Journal of Small Animal Practice, 54, 28-32.
- [27] Devitt J.J., Maranon D.G., Ehrhart E.J. et al. (2009). '*Correlaciones between numerical chromosomal aberrations in the tumor and peripheral blood in canine lymphoma*'. Cytogenetic and Genome Research, 124, 12-18.
- [28] Tomiyasu H., Goto-Koshino Y., Takahashi M. et al. (2010). '*Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma*'. Journal of Veterinary Medical Science, 72, 1165-1172.
- [29] Huang S.H., Kozak P.J., Kim J. et al. (2012). '*Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs*'. Virology, 427, 107-117.
- [30] Ferraresto S., Bresolin S., Arico A. et al. (2014). '*Epigenetic silencing of TFPI-2 in canine diffuse large B-cell lymphoma*'. PLoS One, 9, e92707.

- [31] Martini V., Melzi E., Comazzi S., Gelain M.E. (2013). '*Peripheral blood abnormalities and bone marrow infiltration in canine large B-cell lymphoma: is there a link?*'. Veterinary Comparative Oncology, 13, 117-123.
- [32] Aubry O.A., Spangler E.A., Schleis S.E., Smith A.N. (2014). '*Evaluation of bone marrow aspirates from multiple sites for staging of canine lymphoma and mast cell tumours*'. Veterinary Comparative Oncology, 12, 58-66.
- [33] Warry E., Bohn A., Emanuelli M., et al. (2013). '*Disease distribution in canine patients with acanthocytosis: 123 cases*'. Veterinary Clinical Pathology, 42, 465-470.
- [34] Keller S.M., Vernau W., Moore P.F. (2016). '*Clonality testing in veterinary medicine: a review with diagnostic guidelines*'. Veterinary Pathology, 53, 711-725.
- [35] Thalheim L., Williams L.E., Borst L.B. et al. (2013). '*Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements*'. Journal of Veterinary Internal Medicine, 27, 1509-1516.
- [36] Seelig D.M., Avery P., Webb T. et al. (2014). '*Canine T-zone lymphoma: unique immunophenotypic features, outcome, and population characteristics*'. Journal Veterinary Internal Medicine, 28, 878-886.
- [37] Rebhun R.B., Kent M.S., Frazier S. et al. (2011). '*CHOP chemotherapy for the treatment of canine multicentric T-cell lymphoma*'. Veterinary and Comparative Oncology, 9, 38-44.
- [38] Marconato L., Stefanello D., Valenti P. et al. (2011). '*Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma*'. Journal of the American Veterinary Medical Association, 238, 480-485.
- [39] Poggy A., Miniscalco B., Morello E. et al. (2015). '*Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma*'. Veterinary and Comparative Oncology, 13, 475-480.
- [40] Clemente M. (2017). '*Linfoma canino: presentación, estadificación clínica y recomendaciones prácticas de tratamiento*'. AVEPA Aula E-learning.
- [41] Poggy A., Miniscalco B., Morello E. et al. (2016). '*Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma*'. Veterinary and Comparative Oncology, 15, 431-440.



