UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

LINFOMA CANINO DE ESTIRPE T: DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y POSIBLES TRATAMIENTOS. PRESENTACIÓN DE UN CASO CLÍNICO

Por

María Noel CASTILLA DECHÍA

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Medicina Veterinaria

Modalidad: Estudio de caso

MONTEVIDEO

URUGUAY

2023

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: Dra. Florencia Mosquillo

Segundo miembro (Tutor): Dra. Rosina Sánchez

Tercer miembro: Dra. Alicia Decuadro

Cuarto miembro: Dra. Paula Pessina

Fecha: 14 de diciembre de 2023

Autores: María Noel Castilla

AGRADECIMIENTOS

¨Piano piano, si va lontano…¨

Paso a paso y se llega a las metas trazadas. Paso a paso y parece mentira estar escribiendo la parte final de esta tesis para poder obtener el título de esta hermosa profesión que elegí y seguiría eligiendo.

Pasos que no di sola, y por eso es necesario agradecer a los que formaron parte de este camino.

En primer lugar, a mi tutora y amiga, la Dra. Rosina Sánchez. Gracias por acompañarme, guiarme y estar presente en todo momento. Por siempre estar impulsándome a avanzar en el conocimiento científico y haberme interiorizado en este fantástico mundo de las neoplasias hematopoyéticas; pero sobre todas las cosas por ser una gran persona.

A la cotutora, la Dra. Paula Pessina, agradecerle también por estar presente en este trabajo, por sus consejos, por su tiempo y dedicación.

A mi papa, agradecerle por acompañarme en todos estos años y apoyarme en las decisiones tomadas. Siendo un ejemplo de perseverancia y determinación.

A mi hermano Máximo, a su Sra. Natalia y mis preciosos sobrinos, Isabel, Victoria y Maximito, que tanta alegría, espontaneidad e ingenuidad brindan y nos enseñan.

A mi mama, que no está físicamente, pero que yo la sentí siempre presente, acompañándome y que hoy estaría feliz de verme en esta etapa.

A Elba, muchas gracias por la ayuda incondicional y el apoyo de siempre. Por darme herramientas para poder transitar las distintas etapas de la vida que me ha tocado vivir y por acompañarme en esta etapa final y tan importante para culminar el ciclo.

A mis amigos por estar siempre.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS 3
LISTA DE TABLAS 6
LISTA DE FIGURAS 6
RESUMEN 7
SUMMARY 8
1. INTRODUCCIÓN 9
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFÍCA 10
2.1. Neoplasias hematopoyeticas 10
2.2. Linfoma canino 12
2.2.1. Características generales 12
2.2.2. Epidemiología 12
2.2.3. Etiología y factores asociados 13
2.2.4. Clasificación 14
2.2.4.1. Clasificación anatómica 14
2.2.4.2. Clasificación morfológica e histopatológica 16
2.2.4.3. Clasificación inmunofenotípica 17
2.2.5. Diagnóstico del linfoma canino 18
2.2.5.1. Diagnostico Clínico 19
2.2.5.2. Diagnóstico de laboratorio- Hematología 19
2.2.5.3. Diagnóstico de laboratorio - Bioquímica sérica **¡Error! Marcador no definido.**
2.2.5.4. Diagnóstico Imagenológico 21
2.2.5.5. Diagnóstico citológico 22
2.2.5.6. Diagnóstico Histopatológico e Imunohistoquímico 23
2.2.5.7. Mielograma 25
2.2.5.8. Inmunofenotipificación por citometría de flujo 26
2.2.5.9. Evaluación de la Clonalidad 28
2.2.6. Tratamiento 28
2.2.6.1. Quimioterapia 29
2.2.6.2. Glucocorticoides 30
2.2.6.3. Protocolos de primera línea 31
2.2.6.4. Protocolos de rescate 32
2.2.6.5. Otros tratamientos quimioterápicos 33

2.2.6.6. Radioterapia 33
2.2.6.7. Inmunoterapia 34
2.2.6.8. Nuevas opciones terapéuticas 34
2.2.6.9. Tratamientos Alternativos y/complementarios 35
2.2.7. Pronóstico 36
3. CASO CLÍNICO 38
3.1. Objetivos 38
3.2. Materiales y métodos 38
3.2.1. Caso clínico 38
3.2.2. Toma de muestras 38
3.2.3. Estudios paraclínicos 39
3.2.4. Imagenología 39
3.2.5. Inmunofenotipo por citometría de flujo 40
3.3. Resultados 40
3.3.1. Hematología y bioquímica sérica 40
3.3.2. Proteinograma electroforético 41
3.3.4. Ecografía 42
3.3.4. Citología de linfonódulo 43
3.3.5. Mielograma 43
3.3.6. Citometría de flujo 43
3.3.7. Tratamiento 44
4. DISCUSIÓN 46
5. CONCLUSIÓN 50
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Riesgo de linfoma según raza. 13
Tabla 2. Clasificación de la WHO de los estadios clínicos del linfoma multicéntrico canino 15
Tabla 3. Resumen de Linfoma Canino Revisado a partir de la Clasificación Europeo-Americana de Neoplasias Linfoides y la Clasificación de Neoplasias Linfoides de la Organización Mundial de la Salud. 17
Tabla 4. Síntomas clínicos según presentación anatómica del linfoma. 19
Tabla 5. Marcadores de leucocitos utilizados para detectar linfoma canino. ... 27
Tabla 6. Criterios para definir la respuesta en pacientes con linfoma multicéntrico sometidos a terapia. 30
Tabla 7. Análisis hematológico y bioquímica sérica. 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origen celular de las células sanguíneas. 10
Figura 2. Se muestra el abordaje a la médula ósea la cresta ilíaca anteroposterior. 39
Figura 3. Diagrama de electroforesis de proteínas capilares. Se observan las diferentes fracciones proteicas. 41
Figura 4. Estudio ecográfico de abdomen 42
Figura 5. Citología de linfonódulo poplíteo derecho obtenida por PAF y teñida con May-Grunwald Giemsa.. 43
Figura 6. Representación gráfica de la citometría de flujo realizada. 44

RESUMEN

El linfoma canino es un tumor maligno de origen linfoide que representa del 7 al 24% del total de neoplasias en caninos. En los últimos 15 años, este tipo tumoral se ha posicionado como una de las neoplasias hematológicas más frecuente, por ende, se han desarrollado distintos métodos diagnósticos para obtener un diagnóstico certero y establecer un tratamiento acorde al tipo celular que le dio origen, y así lograr una mayor sobrevida. La inmunofenotipificación por citometría de flujo se presenta como una herramienta de gran valor diagnostico que colabora con el clínico en la toma de decisiones terapéuticas, así como le permite emitir un pronóstico preciso.

El objetivo del presente trabajo fue reportar el caso de un canino macho entero, de raza Airedale Terrier, de 8 años de edad y 19 kg de peso vivo, con diagnóstico clínico y citológico de linfoma multicéntrico en subestadio b, al cual se le realizó citometría de flujo para determinar el origen celular de la neoplasia y, estudios complementarios para determinar repercusiones locales y sistémicas del proceso tumoral.

El resultado de la inmunofenotipificación evidenció la presencia de un linfoma en estadio V (leucemizado), de estirpe T (CD3+, CD45+). A nivel sistémico, el paciente con linfoma T presentó anemia leve y eosinopenia, mientras que los demás parámetros laboratoriales estudiados se encontraron dentro de los rangos de referencia para la especie. El bazo se mostró ecográficamente alterado, con un patrón conocido como “panal de abejas”. Basados en estos resultados, se discute cómo apoyados en la inmunofenotipificación tumoral, es posible profundizar el diagnóstico, emitir un pronóstico preciso y brindar al clínico tratante información que le ayude en sus decisiones terapéuticas.

En el presente caso de linfoma T leucemizado, que suele ser muy agresivo y de mal pronóstico, se logró una sobrevida de 9 meses y medio, aplicando un tratamiento poco agresivo (Prednisolona y Clorambucilo), superando la expectativa de vida descrita en la bibliografía.

Palabras clave: linfoma canino, inmunofenotipo T, citometría de flujo, terapéutica.

SUMMARY

Canine lymphoma is a malignant tumor of lymphoid origin that accounts for 7 to 24% of all neoplasms in dogs. Over the past 15 years, this type of tumor has emerged as one of the most common hematological neoplasms. Consequently, various diagnostic methods have been developed to achieve an accurate diagnosis and establish treatment tailored to the cell type of origin, aiming to enhance overall survival. Flow cytometry immunophenotyping is presented as a valuable diagnostic tool that assists clinicians in making therapeutic decisions and enables them to provide an accurate prognosis.

The objective of this study was to report the case of an intact male Airedale Terrier, 8 years old, weighing 19 kg, with a clinical and cytological diagnosis of multicentric lymphoma in substage b. Flow cytometry was performed to determine the cellular origin of the neoplasia, along with complementary studies to assess local and systemic repercussions of the tumor process.

The results of immunophenotyping revealed the presence of stage V (leukemic) lymphoma, of T lineage (CD3+, CD45+). Systemically, the T-cell lymphoma patient exhibited mild anemia and eosinopenia, while other studied laboratory parameters were within normal limits. The spleen showed ultrasound alterations with a pattern known as "honeycomb." Based on these results, the discussion focuses on how, supported by tumor immunophenotyping, it is possible to deepen the diagnosis, provide an accurate prognosis, and offer the treating clinician information to assist in therapeutic decisions.

In this case of leukemic T-cell lymphoma, which is typically aggressive with a poor prognosis, a survival period of 9 and a half months was achieved by applying appropriate treatment, surpassing the expectations described in the literature.

Keywords: canine lymphoma, T-cell immunophenotype, flow cytometry, treatment.

1. INTRODUCCIÓN

La aparición de neoplasias es un problema común en medicina veterinaria debido a la mayor longevidad de las mascotas. En caninos, el linfoma es una de las formas más comunes de neoplasias malignas, (Ratcliffe et al., 2009), representando entre el 7% y el 24% de todos los tumores (Withrow et al., 2013) y el 80% de los tumores relacionados con el sistema de producción de células sanguíneas (Aniolek et al., 2014; Meza y García, 2014). El linfoma canino muestra similitudes con el linfoma no Hodgkin humano, (morfología, genética tumoral, la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento), presentándose como una forma agresiva de linfoma multicéntrico de alto grado (Marconato et al., 2012; Seelig et al., 2016). La forma multicéntrica o generalizada es la más común en perros y se caracteriza por la presencia de nódulos linfáticos agrandados en todo el cuerpo, con o sin afectación del hígado, bazo y/o médula ósea (Marconato et al., 2012).

En cuanto al diagnóstico, aproximadamente el 90% de los caninos con linfoma se diagnostican mediante la técnica de punción aspiración con aguja fina (PAAF) de los órganos o linfonódulos afectados. Si bien la citología es una técnica sensible y específica para el diagnóstico de esta neoplasia debe complementarse con otras técnicas como la citometría de flujo, que aportará datos relevantes al momento de instaurar un tratamiento o emitir un pronóstico (Bangerter et al., 2007; Marconato et al., 2011; Comazzi y Gelain, 2011).

Utilizar la clasificación inmunofenotípica nos ayuda a determinar si las células responsables del cáncer son de tipo B o T, lo cual se correlaciona con la agresividad del tumor y nos permite mejorar el diagnóstico, el tratamiento y la calidad de vida de los pacientes, así como también evaluar el tiempo de supervivencia ya que varía según los grupos.

Si bien durante mucho tiempo se sostuvo la idea de que, tanto en humanos como en perros, la mayoría de los linfomas tenían su origen en los linfocitos B, se ha visto que la incidencia de los inmunofenotipos tiene variaciones geográficas (Howlader et al., 2009; Seelig et al., 2016). En este sentido, los estudios europeos y norteamericanos mostraron una incidencia de linfomas de células T de aproximadamente el 25-30% (Fournel-Fleury et al., 1997; Ruslander et al., 1997; Calvalido et al., 2016; Pawlak et al., 2016). Sin embargo, en nuestro país, ese porcentaje se eleva y supera el 40% (Sánchez et al., 2021). Por otro lado, estudios de varios grupos en América Latina encontraron inmunofenotipos T iguales o superiores a los reportados en nuestro país (Sánchez et al., 2021). Dentro de los linfomas T, la mayoría son de alto grado y positivos a la molécula CD45, lo que indica un curso de enfermedad agresivo. Pero también existe una minoría de linfomas T de bajo grado, también llamado linfoma de zona T, que es negativo a CD45 (Avery et al., 2014) y poseen una mejor sobrevida incluso sin tratamientos (Sánchez et al., 2021).

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFÍCA

2.1. Neoplasias hematopoyéticas

Las neoplasias del sistema hematopoyético (NH) son un grupo muy heterogéneo de tumores malignos que afectan a la médula ósea y los tejidos linfáticos, alterando la producción y la función de las células sanguíneas (Klopfleisch, 2016, p.109). Según su origen podemos dividirlas en: linfoproliferativas (derivan de series linfoides) y mieloproliferativas (línea mieloide) (Figura 1).

Las NH linfoproliferativas en el perro incluyen más de 30 entidades distintas que agrupan los distintos tipos de linfomas y leucemias, estando en algunos puntos vinculados y siendo difícil su diferenciación. Esto genera un variado comportamiento biológico debido a los diferentes tipos de linfocitos que afecte.

Las NH mieloproliferativas se refieren específicamente a un trastorno en el cual las células mieloides, que incluyen los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas, se producen de manera descontrolada y en cantidades mayores a las normales. Estas pueden manifestarse en diferentes enfermedades, como leucemia mieloide crónica con presencia de policitemia vera, la trombocitopenia esencial y la mielofibrosis primaria, entre otras (Withrow et al., 2013).

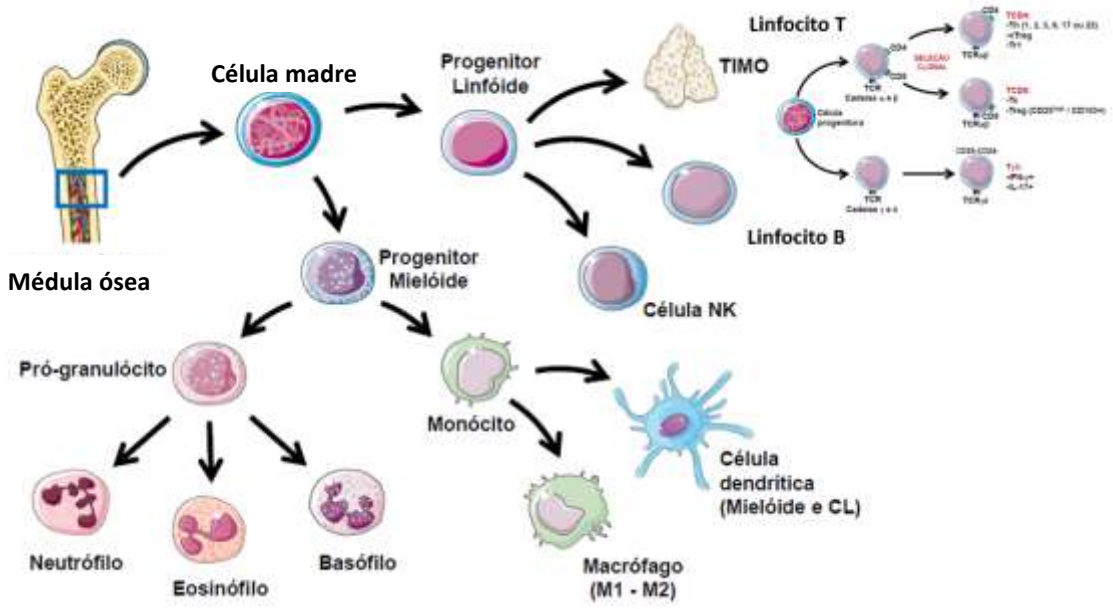

Figura 1. Origen celular de las células sanguíneas.

Neoplasias hematopoyéticas más comunes en caninos:

El linfoma es una de las neoplasias más comunes en perros y representa el 80% de las neoplasias hematopoyéticas (Aniolek et al., 2014; Meza y García, 2014). Afecta los tejidos linfoides sólidos, como los nódulos linfáticos, el bazo y la médula ósea. La descripción del linfoma se desarrollará más adelante.

La leucemia es un tipo de cáncer que afecta principalmente a las células precursoras de la sangre en la médula ósea. Se caracteriza por una proliferación descontrolada de células sanguíneas anormales, que reemplazan gradualmente a las células normales en la médula ósea. Estas células anormales pueden ingresar al torrente sanguíneo y propagarse a otras partes del organismo.

Existen diferentes tipos de leucemia, incluyendo la leucemia mieloide aguda (LMA), la leucemia mieloide crónica (LMC), la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia linfocítica crónica (LLC). Cada una se caracteriza por el tipo de célula afectada y su comportamiento.

La LLC es un tumor maligno caracterizado por una expansión de linfocitos pequeños y maduros en la médula ósea y la sangre, siendo las células morfológicamente normales, pero inmunodeficientes (Workman y Vernau, 2003). Aunque la incidencia de la leucemia en perros es desconocida hasta ahora, se sabe que la LLC es el tipo más común tanto en perros como en humanos, y es la segunda malignidad hematopoyética más diagnosticada en ambas especies, después del linfoma (Nabhan y Rosen, 2014; Rout y Avery, 2017; Avery, 2020). La causa de esta enfermedad es desconocida, pero se están estudiando los factores genéticos relacionados con su desarrollo (Rout et al., 2018; Avery, 2020).

El Mieloma múltiple es otra neoplasia hematopoyética que en este caso asienta en las células plasmáticas. Se caracteriza por la infiltración de células plasmáticas en la médula ósea y otros tejidos, y la producción excesiva de proteínas monoclonales. La incidencia exacta del mieloma múltiple en caninos no está bien documentada y es considerada relativamente rara en comparación a las otras neoplasias hematopoyéticas (Zandvliet et al., 2002).

Otro tipo de neoplasia hematopoyética son los desórdenes histiocíticos (afecta las células dendríticas y macrófagos). Existe una forma cutánea que es benigna que afecta generalmente perros jóvenes, así como también el sarcoma histiocítico que deriva de células intersticiales dendríticas, y es un tumor maligno con un pobre pronóstico y corta sobrevida (Klopfleisch, 2016, p.123).

2.2. Linfoma canino

2.2.1. Características generales

El linfoma es un tumor maligno linfoide que se origina en órganos sólidos (nódulos linfáticos, hígado y bazo) y representa una de las neoplasias malignas más comunes (Ratcliffe et al., 2009), comprendiendo del 7 al 24% del total de neoplasias caninas (Withrow et al., 2013). Es además la neoplasia hematopoyética más frecuente en esta especie (Aniolek et al., 2014; Meza y García 2014).

Teniendo en cuenta la morfología, la genética tumoral, la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, el linfoma canino muestra fuertes similitudes con el Linfoma no-Hodgkin (LNH) humano, que en el perro se presenta como una forma agresiva de linfoma multicéntrico de alto grado (Marconato et al., 2012; Seelig et al., 2016).

La incidencia del linfoma ha aumentado en las últimas décadas, tanto en caninos como en humanos (Howlader et al., 2012; Seelig et al., 2016), esto se debe en gran parte a la estrecha relación y exposición a los mismos factores de riesgo, principalmente ambientales. En humanos, el desarrollo de linfoma se relaciona a la inmunodepresión, sobre todo adquirida (trasplantes y SIDA) (Sanz, 1998), siendo el LNH el séptimo tipo de cáncer en frecuencia de aparición (4,3% de todos los nuevos casos de cáncer en humanos) (Seelig et al., 2016).

En Uruguay, los casos de LNH cada 100.000 habitantes son más frecuentes en hombres (11.04) que en mujeres (7.08) (Registro Nacional del Cáncer, Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer). En caninos, los reportes indican una incidencia del Linfoma no-Hodgkin (LNH) de 20 a 125 casos cada 100.000 perros (Dobson et al., 2002; Merlo et al., 2008). En el hospital de la facultad de Veterinaria, el linfoma canino representa aproximadamente el 3%-10 del total de consultas de oncología (Pessina, 2011; Fossati y Parodi, 2017).

2.2.2. Epidemiología

El linfoma generalmente se presenta en perros de edad media a avanzada (6-12 años de edad) y aunque puede presentarse en cualquier raza, el Bóxer, Doberman, Rottweiler y Boyero de Berna presentan un riesgo mayor (Comazzi et al., 2018). En nuestro país y en concordancia con lo descrito en la literatura internacional, los caninos de raza Rottweiler tienden a desarrollar linfomas de linfocitos B, mientras que en los Bóxer son más frecuentes los de linfocitos T (Lurie et al., 2004; Pawlak et al., 2016; Comazzi et al., 2018; Sánchez et al., 2021). Hay reportes que indican que 1 de cada 8 Golden Retriever desarrollarán linfoma a lo largo de su vida (Glickman et al., 2000), y los mayores de 10 años especialmente linfomas de zona T de bajo grado, presentando en general un buen pronóstico con una supervivencia media de 637 días (Seelig et al., 2016). Respecto a esta raza, en Uruguay, la mayoría son de inmunofenotipo T indolente (CD45-), sin embargo, hay una gran proporción de fenotipo B, e incluso se han diagnosticado LTCD45+ (Sánchez, 2023, datos no publicados).

Por otra parte, estudios actuales mostraron que la población europea de Golden Retriever no está predispuesta al linfoma en general ni a subtipos específicos (Comazzi et al., 2018).

Otras razas frecuentemente dignosticadas con linfoma multicéntrico en Uruguay son el labrador, caniche, ovejero alemán, cimarrón y cruzas (Sánchez, 2023, datos no publicados).

Si bien no existe predisposición sexual, Villamil et al., (2009) reportaron menor riesgo en hembras enteras. Según lo reportado por Torres de la Riva y col. (2013), la castración de hembras Golden Retriever menores del año, aumenta el riesgo de aparición de la enfermedad.

Tabla 1. Riesgo de linfoma acorde a la raza en caninos.

Razas de mayor riesgo	
Bóxer	4.5
Bassethound	4.1
San Bernardo	4.0
Scottis terrier	3.2
Airdale terrier	2.7
Bulldog	2.2
Labrador	1.8
Razas de menor riesgo	
Dachshund	0.1
Pomeranian	0.1
Bretón	0.1
Chicuahua	0.2
Pequinés	0.3
Poodle toy	0.3

Fuente: Bryan (2016, p. 344).

2.2.3. Etiología y factores asociados

La etiología del linfoma en caninos se considera multifactorial ya que no es posible identificar un único agente etiológico (Meza y García, 2014). No obstante, es evidente que hay un marcado componente genético, ya que las neoplasias son muy prevalentes en algunas razas y líneas genéticas de perros (Teske et al., 1994; Modiano et al., 2005).

Por otra parte, algunos virus se han asociado a dolencias del sistema inmune en distintas especies; es así que los gatos infectados con el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) o con el virus de la leucemia felina (ViLef) son más proclives a desarrollar linfomas, y en el hombre existen virus linfotropos (EBV- virus de Epstein-Barr, HTLV-1- virus linfotrófico de células T humanas) asociados al desarrollo de esta neoplasia (Muller et al., 2004).

En el perro, sin embargo, hasta el momento no se ha podido comprobar si el linfoma puede o no ser inducido por virus (Shelton et al., 1990; Sanz, 1998; Wauhg et al., 2015).

Existen, además, muchos factores ambientales asociados al linfoma en caninos; como estar expuestos a químicos del hogar como pinturas o solventes (Gavazza et al., 2001), vivir en áreas industriales o cerca de incineradores de residuos (Marconato et al., 2009b), la polución radiactiva, y/o los campos magnéticos. La exposición al humo de tabaco también ha sido estudiada en caninos (Pinello et al., 2017), y se ha encontrado un posible vínculo entre éste y el comportamiento biológico de los linfomas. Como se mencionó anteriormente, el linfoma canino muestra características histopatológicas y biológicas similares a las del linfoma no-Hodgkin (LNH) en humanos. De hecho, el linfoma canino a menudo se ha propuesto como un modelo animal de este tipo de cáncer. Debido a que, en caninos, el linfoma es un tumor espontáneo y los perros comparten un ambiente común con los humanos, el linfoma canino puede ser particularmente adecuado como un indicador de monitoreo de situaciones específicas con mayor riesgo para los humanos, teniendo la ventaja adicional la menor latencia entre la exposición y la aparición del cáncer en comparación con los humanos (Gavazza et al., 2001).

2.2.4. Clasificación

La clasificación de linfomas según la Organización Mundial de la Salud diferencia los tipos de linfoma por diversos criterios, entre estos, las características tisulares y celulares de la población linfoide atípica. Esta clasificación del linfoma es el esquema actualmente aceptado en perros, y utiliza como criterios a la morfología, el inmunofenotipo, las características moleculares y el comportamiento biológico. Sin embargo, la clasificación del linfoma requiere una revisión constante, ya que cada linfoma puede aparecer con una variedad de características morfológicas y comportamiento clínico.

2.2.4.1. Clasificación anatómica

Hay cuatro formas anatómicas de presentación del linfoma en caninos: multicéntrica, mediastínica, digestiva y extranodal (Zandvliet, 2016).

La forma multicéntrica o generalizada es la más frecuente en perros (más del 80% de los casos) y se caracteriza por linfadenopatía generalizada (linfonódulos superficiales y profundos), con o sin afectación hepática, esplénica y/o de médula ósea (Marconato et al., 2012). Los nódulos linfáticos afectados están marcadamente agrandados (de 5 a 10 veces su tamaño normal), indoloros y móviles.

En general, estos pacientes no presentan otros signos clínicos, y de presentarlos los mismos son inespecíficos, como pérdida de peso, anorexia y letargo. Si los nódulos linfáticos obstruyen el drenaje linfático se desarrolla

edema; y si comprimen un conducto de aire el principal signo es la tos (Nelson y Couto 2010).

La WHO (World Health Organization) clasifica el linfoma multicéntrico en 5 estadios definidos. El linfoma puede limitarse a un sólo linfonódulo (estadio I) o a varios en una región del cuerpo (estadío II), pero también puede generalizarse (etapa III) y afectar secundariamente el hígado y/o bazo (estadio IV) o la sangre y/o médula ósea (estadio V). Se puede agregar un subestadio “a” para indicar la ausencia de signos sistémicos, y “b” para indicar la presencia de signos sistémicos como fiebre, pérdida de peso o hipercalcemia (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la WHO de los estadios clínicos del linfoma multicéntrico canino

Estadío	
I	Un solo nódulo linfático o tejido linfoide de un solo órgano se encuentra involucrado (excepto médula ósea)
II	Cadena nodular linfática se encuentra involucrada, afectando a un solo lado del diafragma
III	Involucración generalizada de todos los nódulos linfáticos
IV	Estadíos I-III con involucración del hígado y/o bazo
V	Estadíos I-IV con involucración de la médula ósea
A	Sin signos sistémicos
B	Con signos sistémicos

Fuente: Owen (1980).

La forma *mediastínica o tímica* se presenta con linfadenopatía mediastínica con o sin infiltración de la medula ósea. La compresión de los nódulos linfáticos mediastínicos anteriores agrandados puede ocasionar tos, regurgitación, disnea, cianosis e incluso hemotórax o quilotórax. La disnea puede deberse además a efusión pleural (Zandvliet, 2016). La poliuria y polidipsia son afecciones comunes en perros con linfoma mediastínico e hipercalcemia, que en general se originan en linfocitos T (Lana et al., 2006). Algunos perros muestran un marcado edema cefálico y de cuello, producido por la compresión que ejerce el agrandamiento de los nódulos linfáticos restringiendo el retorno venoso al corazón (síndrome de la vena cava anterior).(Zandvliet,2016)

El linfoma *digestivo o alimentario* representa del 5-7% del total de linfomas en caninos y se caracteriza por una infiltración gastrointestinal (MALT) aislada, difusa o multifocal, con o sin linfadenopatía intraabdominal. Los signos clínicos en perros con linfoma digestivo suelen presentar vómitos, diarrea, anorexia y pérdida de peso. Ocasionalmente desarrollan signos compatibles con obstrucción intestinal o con peritonitis por la rotura de una masa linfomatosa. (Lana et al., 2006)

La presentación *extranodal* afecta a cualquier órgano o tejido con presencia de tejido linfoide (renal, neural, ocular, cutánea), y por tanto los signos clínicos y los hallazgos de la exploración física son extremadamente variables y dependen de la localización de la o las masas. Las formas extranodales más

comunes en los perros son los linfomas cutáneos y oculares. Este último suele estar asociado a la forma multicéntrica, existiendo estudios que reportaron hasta un 37% de manifestaciones oculares en este tipo de linfomas (Krohne et al., 1994).

2.2.4.2. Clasificación morfológica e histopatológica

Los esquemas utilizados actualmente, han tenido sucesivas modificaciones y se han adaptado de la medicina humana. Existen reportes ya desde 1942, los de Gall y Mallory en 1966, y un nuevo modelo introducido por Rappaport, que incluía el padrón de crecimiento folicular o difuso, lo cual fue de gran utilidad para medicina veterinaria.

Con el creciente conocimiento de los aspectos inmunológicos de los linfomas malignos, una mejor comprensión de la maduración y diferenciación de las células linfoides y el avance de la quimioterapia, se desarrollaron nuevos sistemas de clasificación. Casi simultáneamente, en 1970, se publicaron la clasificación de Lukes-Collins en América del Norte y la clasificación de Kiel en Europa. Ambos sistemas se basaron en conceptos inmunológicos. La clasificación de Kiel se adaptó fácilmente al linfoma maligno canino (Valli et al., 2011). Sin embargo, estaba limitada a la patología nodal, y los avances en inmunología e histoquímica indicaban la necesidad de actualizar todos los sistemas previos. Esto dio lugar a la formación del Grupo de Estudio Internacional de Linfomas (ILSG), que propuso una Clasificación Revisada Europeo-Americana de Neoplasias Linfoides (REAL).

Los objetivos eran diseñar un sistema que no estuviera vinculado a ningún país o región de manera evidente y ampliar en gran medida los criterios para el reconocimiento de enfermedades.

Las características únicas de la propuesta del ILSG fueron que las neoplasias se identificaban como enfermedades y no como tipos celulares, y los criterios de diagnóstico incluían toda la información relevante: morfología celular y línea celular, así como la topografía y la biología general de cada neoplasia que la definía como una entidad de enfermedad específica. El sistema REAL se adoptó en gran medida al sistema de clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud). Incluso existieron trabajos tales como el de Valli et al. (2011), que tuvo el propósito de probar la aplicación del sistema de la OMS para la clasificación de linfomas malignos en perros por diagnósticos veterinarios con experiencia, pero no expertos en hematopatología, obteniendo un resultado de 83% de precisión. Es así que actualmente esta clasificación sirve como base para elaborar la descripción y clasificación del linfoma (Tabla 3).

Los linfomas se clasifican esencialmente en función de la morfología celular y las características inmunológicas y se subtitulan de acuerdo con la distinción fundamental entre fenotipos (B o T) y grados de malignidad (bajo o alto), permitiendo tales evaluaciones una caracterización precisa en el 90% de los casos (Martini et al., 2015).

Tabla 3. Resumen de Linfoma Canino Revisado a partir de la Clasificación Europeo-Americana de Neoplasias Linfoides y la Clasificación de Neoplasias Linfoides de la Organización Mundial de la Salud.

Neoplasias de células B
Neoplasias de células B precursoras
Leucemia/linfoma linfoblástico precursor B
Neoplasias de células B maduras (periféricas)
Leucemia linfocítica crónica/prolinfocítica de células B
Leucemia/linfoma linfocítico pequeño
Leucemia prolinfocítica de células B
Linfoma linfoplasmocítico
Linfoma de células B de la zona marginal esplénica
Mieloma de células plasmáticas/plasmocitoma
Linfoma extranodal de células B de la zona marginal de tejido linfoide asociado a mucosas
Linfoma nodal de la zona marginal
Linfoma folicular
Linfoma de células del manto
Linfoma difuso de células B grandes
Linfoma mediastínico de células B grandes
Linfoma de Burkitt/leucemia de células de Burkitt
Entidad provisional: linfoma de células B de alto grado tipo Burkitt[a]
Efusión primaria-Linfoma
Neoplasias de células T y asesinas naturales (NK)
Neoplasia de células T precursoras
Linfoma/leucemia Linfoblástico T precursor
Neoplasias de células T maduras (periféricas) y de células asesinas naturales
Leucemia prolinfocítica de células T
Leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL)
Leucemia agresiva de células asesinas naturales (NK)
Linfomas periféricos de células T no especificados
Linfoma/leucemia de células T
Linfoma intestinal de células T (± asociado a enteropatía)
Linfoma hepatoesplénico de células T δγ
Linfoma de células T subcutáneo similar a paniculitis
Micosis fungoide/síndrome de Sézary
Linfoma cutaneo primario T o nulo anaplásico de células grandes
Linfoma periférico de células T no especificado (TNOS)
Linfoma angioinmunoblástico de células T
Linfoma angiocéntrico de células T

Fuente: Valli et al. (2013).

2.2.4.3. Clasificación inmunofenotípica

La inmunotipificación de linfomas en caninos ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico a través de identificación de marcadores específicos en las líneas celulares, además ha permitido en muchos casos la aproximación entre el

diagnóstico y el pronóstico, facilitando las decisiones clínicas de tratamiento. Cada estirpe celular se caracteriza por presentar distintos antígenos de membrana o intracelulares relacionados con la diferenciación de los leucocitos, denominados con la sigla CD (clusters de diferenciación). Los principales biomarcadores presentes en subpoblaciones de linfocitos T son el CD3, CD4, CD5, CD8 y en los linfocitos B el CD19, CD20, CD21, CD79a; permitiendo así su identificación mediante técnicas como la innmunohistoquímica o citometría de flujo (Aresu et al., 2013; Martini et al., 2015; Aniolek et al., 2014, Pawlak et al., 2016).

En general, la información disponible, tanto en humanos como en caninos, muestra que la incidencia del linfoma B es ampliamente superior a los linfomas T, reportándose aproximadamente el 80% de los casos como linfomas B en ambas especies y se caracterizan por la expresión de CD21 y CD79a (Anoliek et al., 2014, Seelig et al., 2016).

Dentro de los linfomas T, la mayoría son CD4+ CD45+, de alto grado, con un curso de enfermedad agresivo; mientras que una minoría se caracteriza por ser CD4+ CD45- y están caracterizados por ser de bajo grado y presentar un mejor pronóstico (Avery et al., 2014). Es importante mencionar que el porcentaje informado de linfomas de células T en caninos difiere entre regiones, explicado posiblemente por antecedentes genéticos de las poblaciones de perros y factores ambientales (Modiano et al., 2005). En este sentido, estudios europeos y norteamericanos mostraron que la incidencia de linfomas de células T es de aproximadamente el 30 % (Fournel-Fleury et al., 1997; Ruslander et al., 1997; Calvalido et al., 2016; Pawlak et al., 2016). Por otro lado, estudios de varios grupos en América Latina encontraron inmunofenotipos T iguales o superiores a los reportados en nuestro país, donde el 42,5% de los linfomas son de origen T (10,64% TZL y 31,9% T agresivos) (Neuwald et al., 2014; Sánchez et al., 2021).

2.2.5. Diagnóstico del linfoma canino

El diagnóstico preciso del linfoma es de suma importancia en el manejo y tratamiento. Identificar el subtipo específico de linfoma no sólo proporciona información sobre el comportamiento y la agresividad de la enfermedad, sino que también puede guiar el enfoque terapéutico adecuado.

Se ha demostrado que diferentes subtipos de linfoma tienen diferentes pronósticos y respuestas al tratamiento. Esto ha llevado al desarrollo de terapias específicas dirigidas a subtipos particulares de linfoma, lo que ha mejorado significativamente las tasas de supervivencia en los pacientes (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

Además, el diagnóstico temprano y preciso del linfoma permite iniciar el tratamiento adecuado lo antes posible, lo que puede mejorar las posibilidades de éxito y prolongar la vida del perro. También es importante tener un diagnóstico específico para poder monitorear adecuadamente la respuesta terapéutica y ajustar la terapia según sea necesario.

El diagnóstico es un aspecto crucial en el manejo integral de esta enfermedad y puede marcar la diferencia en la calidad y duración de vida de los pacientes caninos afectados por el linfoma. (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

2.2.5.1. Diagnóstico Clínico

Los síntomas clínicos dependen del tipo anatómico de linfoma y en general están relacionados a la obstrucción o compresión de tejidos circundantes, por agrandamiento de los linfonódulos; así como también por el desplazamiento de las células parenquimatosas normales en el órgano afectado (Tabla 4).

La exploración clínica del linfoma mediastínico suele revelar una o más masas intraabdominales (nódulos mesentéricos o ileocecocólicos agrandados) y asas intestinales engrosadas (linfoma difuso de intestino delgado).

Tabla 4. Síntomas clínicos según presentación anatómica del linfoma.

MULTICÉNTRICO	MEDIASTÍNICO	GASTROINTESTINAL	EXTRANODAL CUTÁNEO	EXTRANODAL OCULAR
Pérdida de peso	Tos	Vómitos	"Donut"	Fotofobia
Anorexia	Disnea	Diarrea	Lesiones mucosas y mucocutáneas	blefarospasmo
Letargo	Edema cefálico y de cuello (sindrome de vena cava anterior)	Anorexia	Lesiones similares a afecciónes cutáneas primarias o secunadrias	Epífora, Hifema, Hipopión
Edema	Regurgitación	Pérdida de peso		Masas oculares
Tos	Poliuria/Polidipsia	Linfonódulos mesentéricos ↑ tamaño		Infiltración tercer párpado
Linfonódulos ↑↑↑ tamaño, indoloros y móviles	Hipercalcemia	Linfonódulos ileocecocólicos ↑ tamaño		Uveítis anterior

Fuente: Sánchez et al. (2019)

2.2.5.2. Diagnóstico de laboratorio- Hematología

Además de la evaluación clínica, es importante determinar la extensión de la enfermedad en los distintos órganos e identificar padecimientos secundarios o no relacionados que necesiten ser tratados o controlados antes de instituir un tratamiento o durante el mismo. Las alteraciones surgen por la infiltración de la médula ósea con células neoplásicas, por el hipo/hiperfunción esplénica (por los infiltrados neoplásicos), o alteraciones paraneoplásicas inmunomediadas (Vail et al., 2013).

Los resultados del hemograma y la bioquímica sérica pueden variar considerablemente, pudiendo incluso ser normal en algunos pacientes con linfoma (Gavazza et al., 2008). Sin embargo, se han observado casos de anemia y trombocitopenia como parte del síndrome paraneoplásico asociado al linfoma y como un pobre factor pronóstico (Abbo y Lucroy 2007).

En cuanto a la presencia de anemia, siempre se debe buscar la causa subyacente. Las anemias arregenerativas generalmente se asocian a enfermedades crónicas (anemia del dolor), hipoplasia medular inducida por fármacos, radiaciones; así como también una causa es la mieloptisis (causada por leucemias, linfoma en estadio V y mieloma múltiple). Las anemias regenerativas, son causadas principalmente por hemólisis, ya sea inmunomediadas por distintos agentes, incluido el linfoma, o no inmunomediadas. También pueden suceder por hemorragias agudas, por ejemplo, ruptura de bazo a causa de una neoplasia (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

En cuanto a la serie blanca, la neutrofilia, definida como el aumento absoluto del número de neutrófilos circulantes es la principal causa de leucocitosis en caninos. Si bien la principal causa está relacionada a infecciones, en algunas situaciones puede estar relacionada a procesos inflamatorios o neoplásicos. Los reportes indican neutrofilia en el 25% al 40% de los perros con linfoma, que puede deberse a la estimulación de la médula ósea por la presencia de masas necróticas, ulceradas o infectadas o a una respuesta a factores estimuladores de colonias granulocíticas (CSF) producidos o inducidos por células neoplásicas (Jark y De Sá Rodrigues, 2022, p.295). Se encontró que los animales con linfoma y neutrofilia al momento del diagnóstico tuvieron una menor supervivencia en comparación con aquellos sin esta alteración hematológica (Curran et al., 2015).

Se han observado diferencias entre los subtipos de linfoma T (Sánchez et al., 2021). Si bien en el linfoma de alto grado el recuento de los linfocitos puede ser extremadamente variable, los pacientes con linfoma de zona T (LTCD45-) suelen presentar linfocitosis (Seelig et al., 2016; Martini et al., 2015). La linfopenia se encuentra en muchas neoplasias, incluido el linfoma, y puede ser un marcador de inmunidad deteriorada (Feng et al., 2012). Hallazgos en caninos muestran que aquellos pacientes con linfoma de células T tienen recuentos de linfocitos periféricos más bajos (Calvalido et al., 2016), sin embargo, en el estudio reciente de Sánchez et al. (2021), se observa que el 20% de los perros presentaba linfopenia, y esta distribución era similar entre los grupos (LB, LCD45+/-). En los humanos con linfoma, la linfopenia en el momento del diagnóstico es un factor de pronóstico pobre (Feng et al., 2012).

La relación neutrófilos/monocitos y el recuento de linfocitos como factor pronóstico es controvertida. Algunos estudios han demostrado que un aumento en los neutrófilos o monocitos y una disminución en los linfocitos se asocian con un peor pronóstico (Veluvolu et al., 2021). En cuanto los eosinófilos, se ha reportado tanto la eosinofilia como la eosinopenia (Sánchez et al., 2021).

2.2.5.3. Diagnóstico de laboratorio - Bioquímica sérica

Las principales alteraciones séricas reportadas en perros con linfoma son las gammapatías y la hipercalcemia. Las alteraciones séricas surgen de la producción de sustancias bioactivas por las células tumorales (paraneoplasia), o bien por el fallo orgánico secundario a la infiltración neoplásica. La hipercalcemia se observa en aproximadamente el 20-40% de los pacientes, siendo más prevalente en los perros con linfoma mediastínico (Nelson y Couto, 2010) y linfomas de células T (Aresu et al., 2013; Zandvliet, 2016; Sánchez et al., 2021). El mecanismo propuesto en perros con linfoma es una hipercalcemia humoral maligna secundaria a la producción de un péptido tumoral, relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP) que estimula la resorción ósea por parte de los osteoclastos (Goldner, 2016).
En ocasiones los perros con linfoma presentan otros síndromes paraneoplásicos que incluyen gammapatías monoclonales y policlonales, citopenias inmunes, polineuropatía e hipoglucemia (Sánchez et al., 2021).

Además, puede evaluarse la actividad sérica de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Esta enzima citoplasmática es inespecífica ya que está compuesta por 2 subunidades, que combinadas entre sí dan lugar a 5 isoenzimas, que se encuentran en células del hígado, corazón, músculo esquelético, riñón, páncreas, pulmón, intestino delgado, y células hematopoyéticas (Henry, 1996). La función de la LDH es catalizar el último paso de la glucólisis, convirtiendo el lactato en piruvato, vía metabólica con actividad aumentada en el linfoma canino (Marconato et al., 2009a). Si bien su uso como screening en la detección del linfoma es controversial (Zanatta et al., 2003; Marconato et al., 2009a), es considerada útil para distinguir el linfoma de la Erlichiosis y la Leishmaniosis, 3 dolencias con presentación clínica similar (Marconato et al., 2009a).

También ha demostrado ser útil para anticipar las recaídas del linfoma en perros (Marconato et al., 2010). Para ello es necesario realizar mediciones seriadas de la LDH post-tratamiento; los perros con un aumento en la actividad de LDH al finalizar la quimioterapia y un mes después de la finalización de la misma están más propensos a tener recurrencia de linfoma dentro de los 45 días sucesivos, inclusive si no presentan signos clínicos aparentes (Marconato et al., 2010). En estudio realizado en Uruguay se encontró un aumento de la actividad de la LDH en el 74.4% de los pacientes con linfoma, reportándose los valores más altos en el inmunofenotipo B (Sánchez et al., 2021).

2.2.5.4. Diagnóstico Imagenológico

Las alteraciones radiográficas en general, son secundarias a linfadenopatía u organomegalia y pueden revelar un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos esternales o traqueobronquiales, infiltrados pulmonares, nódulos mediastínicos y/o efusión pleural.

La ecografía permite detectar cambios en la ecogenicidad que reflejan modificaciones en la textura de los órganos parenquimatosos, secundarios a la

infiltración neoplásica. También es posible determinar el engrosamiento y pérdida de la arquitectura de las paredes gastrointestinales, así como también es útil para evaluar afectación hepática y/o esplénica (Crabtree et al., 2010). Si bien en el linfoma gastrointestinal los nódulos linfáticos mesentéricos y sublumbares u órganos agrandados pueden detectarse fácilmente, esta técnica no es adecuada para diagnosticar o excluir el linfoma gastrointestinal, ya que los hallazgos no son específicos o pueden estar ausentes en hasta el 25% de los perros (Frances et al., 2013).

La ecografía abdominal puede ser importante para obtener muestras intraabdominales guiadas por ultrasonido para el diagnóstico. También puede ser útil para el diagnóstico de linfoma gastrointestinal, nodal abdominal y hepatoesplénico (Kinns y Mai 2007).

2.2.5.5. Diagnóstico citológico

La citología de los linfonódulos es un método confirmatorio, especialmente en casos de linfomas de alto grado. Tiene alta sensibilidad y especificidad, entorno al 90% (Martini et al, 2017). Esta técnica se caracteriza por ser mínimamente invasiva, no requiere sedación del paciente y se realiza rápidamente. Debido a que la mayoría de los linfomas caninos son difusos, la muestra obtenida mediante PAAF es representativa de toda la población neoplásica (Marconato et al., 2011) y permite diagnosticar la mayoría de los linfomas de alto grado. Sin embargo, para diagnosticar los linfomas de bajo grado se requiere un examen histológico adicional donde la evaluación de la arquitectura del linfonódulo es indispensable (Marconato et al., 2011; Zandvliet, 2016).

La citología permite definir el grado de los linfomas basándose en varios criterios:

- Tamaño de los linfocitos.

- Patrón cromatínico.

- Número y ubicación del nucléolo.

- Índice mitótico (contando en 5 campos a 500x de aumento): bajo (0-1), medio (2-4), alto (≥5).

Estos criterios permiten clasificar por citología el grado del linfoma, siendo de grado intermedio y alto aquellas muestras que se caracteriza por la presencia de células grandes o intermedias y un índice mitótico elevado. Estos son los más comunes en perros y representan aproximadamente el 80% al 90% de los casos y se caracterizan por tener células tumorales de rápido crecimiento. El tratamiento recomendado es la quimioterapia agresiva. Sin embargo, el pronóstico suele ser inferior en comparación con los linfomas de bajo grado (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

Por otra parte, en los linfomas de grado bajo se observan células pequeñas y un índice mitótico bajo. Los linfomas de bajo grado son menos comunes en perros y representan aproximadamente el 10% al 20% de los casos.

El tratamiento y el pronóstico pueden variar en función de la ubicación y el comportamiento específico de cada linfoma (Valli et al., 2006).

En algunos casos, los resultados pueden ser inconclusos debido a la baja celularidad, o dificultad para distinguir entre linfomas de bajo grado e hiperplasia. Además, es importante tener precaución al interpretar los resultados de la citología en casos donde se haya administrado corticosteroides, ya que pueden afectar los hallazgos citológicos (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

Un linfonodo con linfoma se caracteriza por la infiltración de una población homogénea de linfoblastos, que reemplazan a las células normales de los linfonódulos y otros órganos (Nelson y Couto, 2010). La citología del linfoma pone en evidencia numerosos prolinfocitos o linfoblastos, que llegan a constituir más del 50% de la población celular (normalmente no exceden el 20%). También se observa con frecuencia, fragmentos citoplasmáticos de tamaños variables llamados cuerpos linfoglandulares, que también se evidencian en casos de hiperplasia benigna y linfadenitis (Meza y García, 2014).

Si bien la citología es una técnica sensible y específica para el diagnóstico de esta neoplasia debe complementarse con otras técnicas como la citometría de flujo la que aportará datos relevantes al momento de instaurar un tratamiento o emitir un pronóstico (Bangerter et al., 2007; Marconato 2011; Comazzi y Gelain, 2011).

2.2.5.6. Diagnóstico histopatológico e inmunohistquímico

La histopatología es la técnica *estándar de oro* para el diagnóstico del linfoma. Consiste en el examen microscópico detallado de muestras de tejido obtenidas mediante una biopsia. El análisis histopatológico permite una evaluación detallada de la arquitectura del tejido linfático, así como la identificación de las características celulares específicas del linfoma. El patólogo busca signos de malignidad, como la proliferación anormal de células linfoides y la destrucción de la estructura normal del tejido linfático (Valli et al., 2011).

Además, el análisis histopatológico puede ayudar a determinar el subtipo exacto de linfoma canino, si se acompaña de inmunohistoquimica, y proporcionar información sobre el grado de malignidad y otros factores pronósticos (Jark y De Sá Rodrigues, 2022). La inmunohistoquímica es una técnica que tiene como objetivo detectar antígenos mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos. Estos antígenos son el CD79a, CD20 y PAX5, para linfomas de tipo B; y CD3 y CD5 en el caso de los linfomas T.

Dentro de las ventajas de estas técnicas se destaca que proporciona información sobre el tamaño de las células, la arquitectura del linfonodo, el índice mitótico y el inmunofenotipo. A su vez, permite una correcta clasificación según los criterios de la OMS y también contribuye a la oncología comparada, es decir, la comparación de los linfomas entre diferentes especies. Tiene la ventaja añadida de que puede ser utilizada en tejidos previamente fijados e incluidos en parafina con las técnicas habituales (Valli et al., 2011). A pesar de estas ventajas, no se realizan rutinariamente en nuestro país ya que hay otras técnicas

complementarias que pueden tener una aproximación al diagnóstico sin ser invasivas.

A continuación, se describe brevemente los linfomas T, que es el tipo que nos compete en nuestro caso clínico.

LINFOMA T DE ALTO GRADO

*Linfomas T periférico no específico: son una categoría de linfomas con una clasificación no específica. Normalmente, son linfomas de alto grado y los más comunes. Histopatológicamente, se espera encontrar un patrón difuso con células grandes y un índice mitótico intermedio. Los linfomas T periféricos no específicos son difíciles de distinguir de los linfomas difusos de células grandes B. Por lo tanto, se requiere el uso de técnicas de inmunohistoquímica y/o citometría de flujo para realizar una correcta identificación y clasificación.

*Los linfomas linfoblásticos T: son una forma de linfoma agresivo caracterizado por la presencia de células intermedias y un alto índice mitótico. En comparación con otras formas de linfoma de alto grado, los linfomas linfoblásticos T están asociados con un pronóstico inferior. Es importante destacar que el término "linfoblástico" se utiliza de manera imprecisa por parte de patólogos veterinarios no especializados en hematopatología para referirse a linfocitos grandes e inmaduros, con núcleos grandes y nucléolos evidentes. Sin embargo, los linfomas compuestos por células grandes son distintos y no deben ser considerados como linfomas linfoblásticos.

*Los linfomas de grandes linfocitos granulares, anaplásicos y angiogénicos: son formas de linfomas raramente descritas en perros y representan menos del 1% de los casos. Este puede originarse a partir de linfocitos NK (células nulas - negativas para CD3, CD4, CD8 y CD79a) o de linfocitos T citotóxicos (positivos para CD3 y CD8), y pueden ser positivos para la enzima granzima. Estos linfomas suelen involucrar el hígado, el bazo y la médula ósea. (Jark y De Sá Rodrigues, 2022)

LINFOMA T DE BAJO GRADO

*Linfoma T indolentes. El linfoma de zona T (TZL) es la principal forma de linfoma indolente multicéntrico en perros. Histopatologicamente se caracteriza por linfocitos neoplásicos que se expanden en el paracórtex y cordones medulares, sin alterar la arquitectura nodular (Ponce et al., 2010). Existe una fuerte correlación racial con las razas Golden Retriever y Shih Tzu. En la citología, se observan linfocitos pequeños que se asemejan a un "espejo de mano". La pérdida de CD45 es su característica distintiva. Los signos clínicos pueden ser asintomáticos o presentar síntomas leves. El linfoma puede afectar un solo nódulo linfático, una región específica o estar generalizado. Estos signos clínicos tienden a tener una evolución lenta y en general es menos agresivo que los demás subtipos de linfoma (Martini et al., 2015; Seelig et al., 2016; Mizutani et al., 2016). En un estudio realizado en Brasil (Jark y De Sá Rodrigues, 2020) que incluyó un total de 203 casos de linfoma multicéntrico, se identificaron 24 casos de linfomas indolentes, lo que representa el 11,82% del total de casos; dentro de esos un 8,87% de los casos correspondieron a linfoma de zona T. En

nuestro país, los TZL representan un 10.6% del total de linfomas (Sánchez et al., 2021).

2.2.5.7. Mielograma

El mielograma es un procedimiento diagnóstico utilizado para evaluar alteraciones numéricas y morfológicas de las células sanguíneas (Jark y De Sá Rodrigues, 2020). Puede ser útil para el diagnóstico del linfoma ya que se pueden observar cambios en la composición celular de la sangre periférica, cuyo origen es la invasión de la médula ósea por linfocitos neoplásicos (Vail et al, 2007). Algunos autores mencionan que el mielograma presenta especial utilidad en linfomas de células T, ya que se ha demostrado que la médula ósea (MO) está más comúnmente afectada en los LT (indolentes y agresivos) que en los LB agresivos (Fournel-Fleury y Ponce, et al., 2004; Aresu et al., 2013).

Existe controversia sobre la punción de médula ósea (MO), algunos oncólogos afirman que la implicación de la MO no afecta las decisiones terapéuticas y que la evaluación de la misma, junto con un frotis de sangre periférica, no influye significativamente en la modificación de la etapa.

En casos raros, la infiltración de la MO puede no estar relacionada con anomalías hematológicas, ya que como ha sido sugerido, la linfocitosis presente en perros con linfoma de zona T, podría deberse al desbordamiento de linfocitos ganglionares al torrente sanguíneo (Seelig et al., 2014; Martini et al., 2016).

Cuando se examina un mielograma de un perro con linfoma, se espera encontrar una infiltración anormal de células linfoides en la médula ósea, ya que estas presentan la característica de recircular. Las células linfoides anormales pueden estar presentes de forma difusa o focal, lo que puede indicar el grado de infiltración de las células cancerosas. Además de las células linfoides anormales, también se puede observar una disminución en la producción normal de células sanguíneas en la médula ósea, debido a la infiltración lo que se conoce como mieloptisis y tiene como consecuencia una mielosupresión.(Withrow 2013).

Las complicaciones asociadas con un mielograma son bajos. De todas maneras, es importante que se discutan con el propietario antes de someter al perro al procedimiento. Puede requerir sedación o anestesia general, ya que se realiza una punción en el hueso para obtener una muestra de médula ósea. Por lo tanto, siempre existe un riesgo asociado con la sedación o la anestesia general, especialmente en perros mayores o en perros con afecciones médicas preexistentes (Aceña et al.,1992). Además, existe un pequeño riesgo de complicaciones relacionadas con la punción de la médula ósea, como sangrado excesivo, infección o daño a las estructuras cercanas (Aceña et al., 1992).

2.2.5.8. Inmunofenotipificación por citometría de flujo

La citometría de flujo permite una evaluación cuantitativa y cualitativa rápida de la población celular, evaluando el tamaño de las células, la expresión simultánea de diferentes antígenos en la misma población, así como la evaluación cuantitativa de cada marcador de forma individual (Gelain et al., 2008; Martini et al., 2015). La identificación de antígenos de superficie en los linfocitos (clusters de diferenciación o CD) permite su clasificación y determinar el grado de maduración celular (Aniolek et al., 2014; Aresu et al., 2013; Martini et al., 2015).

La técnica consiste en tomar una muestra de células tumorales, ya sea de un nódulo linfático y/o de la sangre del animal, y marcarlas con anticuerpos específicos que se unen a los antígenos presentes. Estos anticuerpos están conjugados con fluorocromos que emiten una señal fluorescente cuando se exponen a un rayo láser en el citómetro de flujo. Los linfocitos marcados con anticuerpos se pasan a través del citómetro de flujo, que es capaz de detectar la señal fluorescente y clasificar las células según su tamaño, forma y fluorescencia (Comazzi et al, 2011).

La citometría de flujo puede ayudar a distinguir entre un proceso reactivo de uno neoplásico. En el caso de un proceso reactivo, se observa una población heterogénea con diferentes inmunofenotipos distribuidos en la población celular. Por otro lado, en un proceso neoplásico, se observa una población homogénea con un inmunofenotipo común que además puede acompañarse de un perfil de marcado aberrante (pseudoclonalidad). (Martini y et al., 2013).

La inmunofenotipificación por citometría de flujo es una herramienta poderosa en el diagnóstico y clasificación del linfoma canino ya que permite identificar diferentes subpoblaciones de células linfáticas según los antígenos que expresan tanto intracelularmente como en su superficie. El inmunofenotipo es además un factor pronóstico muy importante en los linfomas de alto grado (Alvarez et al., 2009). Algunos CD están presentes en todas las células linfáticas, como ser el CD18 y CD45; otros están presentes en subpoblaciones de linfocitos T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8) y otros en linfocitos B (CD19, CD20, CD21, CD22, CD79a) (Aresu et al., 2013; Comazzi y Riondato 2021).

En el caso de los linfomas caninos, la mayoría de los casos son de tipo células B, y al igual que en humanos, esta es la variante más común de la enfermedad. También existen linfomas de tipo T, en los cuales el CD4+ es el subtipo más común. Sin embargo, algunos tumores no muestran la expresión de ninguno de los marcadores que definen su conexión a la línea de linfocitos T o B, y otros poseen marcadores característicos de ambos tipos de linfocitos (Comazzi y Gelain, 2011; Avery et al., 2014).

La citometría de flujo tiene varias ventajas, entre ellas; proporciona información sobre el tamaño celular y el inmunofenotipo. Es menos invasiva y no requiere anestesia. Tiene un costo intermedio en comparación con otras técnicas. Y es excelente para el diagnóstico de linfoma de zona T con perfil clásico (CD45-).

A diferencia de la histopatología, que requiere la obtención de una muestra de tejido para su análisis microscópico, la citometría de flujo puede realizar un análisis en tiempo real de las células suspendidas en una solución, sin necesidad de secciones de tejido. Esto permite una evaluación más rápida y más detallada de las características celulares.

Además, la citometría de flujo puede ser útil en la monitorización de la enfermedad a lo largo del tiempo, evaluando la respuesta al tratamiento y detectando posibles recaídas. Permite un análisis más rápido y repetido de las células circulantes en el torrente sanguíneo.

Sin embargo, también presenta algunas desventajas, como no permitir una clasificación exacta según la clasificación de la OMS al no aportar información sobre la arquitectura tisular. Se requiere el envío de la muestra en un plazo máximo de 48 horas para un procesamiento adecuado.
Y otra desventaja es que según investigaciones realizadas por Aniolek y sus colegas en 2014, los linfocitos neoplásicos pueden no tener el mismo perfil de marcadores de superficie que sus contrapartes no neoplásicas. Esto significa que las células tumorales pueden mostrar marcadores inapropiados para su nivel de diferenciación o incluso pueden presentar marcadores adicionales que no están asociados con células neoplásicas. Sin embargo, otros autores consideran que esto podría ser una ventaja ya que las aberraciones pueden ayudar a clasificar como células neoplásicas en casos ambiguos (Avery et al., 2014)

Tabla 5. Marcadores de leucocitos utilizados para detectar linfoma canino.

Anticuerpo	Especificidad
CD3	Timocitos y linfocitos T maduros
CD4	Neutrofilos y linfocitos T helper
CD5	Timocitos y linfocitos T
CD8	Linfocitos T citotóxicos
CD25	Linfocitos T activados IL-2Rα
CD21	Linfocitos B maduros
CD79a	Linfocitos B en todos los estadios madurativos (early pre-B cell stage-plasma cells)
CD14	Monocitos y macrófagos
CD18	Todos los leucocitos (más en monocitos y granulocitos que en linfocitos)
MPO	Neutrófilos (granulocitos)
CD34	Células madres hematopoyéticas
CD44	Leucocitos, surface receptor for hyaluronic acid
CD45	Panleucocitario
CD235a	Eritrocitos (erythroid precursors-mature erythrocyte)
KI-67	Células en división-Prolifercación celular
MHCII	Celulas mononucleares

Fuente: Sánchez et al. (2019)

2.2.5.9. Evaluación de la Clonalidad

La evaluación de la clonalidad es una técnica que se utiliza para determinar si una población de células proviene de una única célula clonal, lo que sugiere una neoplasia, o si es una población policlonal, lo que sugiere una respuesta inmunitaria normal o una inflamación crónica (Lana et al., 2006; Comazzi y Gelain, 2011). El PCR-PARR (Reordenamiento de genes de inmunoglobulina o TCR por la reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica utilizada en el diagnóstico molecular de enfermedades hematológicas, especialmente en el estudio de linfomas y leucemias. Permite la detección de clones de células neoplásicas en muestras de tejido o fluidos corporales, mediante la amplificación de regiones específicas del ADN que se encuentran en los receptores de células B y T.

A diferencia de lo que ocurre en humanos, en caninos no es posible evaluar la clonalidad por citometría de flujo, ya sea por falta de expresión de marcadores de células T o B, o por la presencia de poblaciones mixtas de células neoplásicas y normales. En estos casos, la PCR-PARR, cobra utilidad para determinar la clonalidad, y también puede utilizarse para la evaluación de la enfermedad mínima residual después del tratamiento, así como también para la detección de recurrencia de la enfermedad (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

Ya que el PCR-PARR se basa en la detección de reordenamientos genéticos en los genes del receptor de células B o T, algunos linfomas caninos pueden no ser tan comunes o pueden ser difíciles de detectar debido a su variabilidad genética. Si bien el PARR puede ser útil en ciertos casos de linfoma canino, su uso generalizado puede verse limitado debido a que no proporciona información sobre el tamaño de las células y su proliferación, no evalúa la morfología, por lo tanto, no permite diferenciar entre alto y bajo grado de malignidad. Es una técnica con una sensibilidad del 85% y especificidad del 94% (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

2.2.6. Tratamiento

El tratamiento del linfoma canino es importante no sólo para prolongar la vida del animal, sino que se busca aliviar los síntomas asociados a la enfermedad, la pérdida de apetito, la fatiga y la pérdida de peso. Instaurar un tratamiento temprano puede evitar la propagación a otros órganos y tejidos. Puede mejorar la respuesta inmunológica y prevenir la recurrencia, todas estas razones nos llevan a una mejora en la calidad de vida, permitiendo que el perro continúe realizando sus actividades normales. (Jark y De Sá Rodrigues, 2022)

Los tratamientos son variados y dependen del tipo del linfoma presente, la localización, evolución y condición del paciente. Se utilizan con frecuencia numerosos protocolos quimioterápicos, así como también, radioterapia e inmunoterapia. La cirugía suele ser usada en los linfomas en estadío I o en los linfomas extranodales solitarios. Otro tratamiento disponible es el transplante autólogo de médula ósea (North y Banks, 2009). Sea cual sea el tratamiento de elección, se instaura con el fin de obtener el máximo efecto, es decir, lograr una alta tasa de respuesta completa con larga duración de respuesta, con un mínimo de consultas (reduciendo el estrés y las molestias tanto para el animal como para el dueño). A pesar de esto, la expectativa de vida en caninos no supera los 12 a 18 meses (Alvarez, 2001), aunque los perros no tratados no viven más de 4 a 6 semanas (Withrow y Macewen, 2001).

2.2.6.1. Quimioterapia

En la mayoría de los casos, el tratamiento de elección es la quimioterapia, ya que puede aliviar los síntomas y prolongar la vida del perro por varios meses. El objetivo de esta terapia es llevar el linfoma a remisión y mantenerla por el mayor tiempo posible, lo que puede lograrse mediante un protocolo compuesto de una fase inicial (inducción de remisión) y una fase de mantenimiento. Durante la fase de inducción, los fármacos se administran semanalmente, y en la fase de mantenimiento, se espacian los intervalos entre tratamientos. Si la respuesta a la fase de inducción es incompleta, se puede agregar fármacos al protocolo inicial para intensificar la remisión. La quimioterapia se utiliza principalmente para tratar el linfoma multicéntrico de grado intermedio o alto, siendo escasa la información sobre los de bajo grado o formas extranodales (Zandvliet, 2016).

Es importante utilizar fármacos con mecanismos de acción diferentes desde el inicio de la quimioterapia para evitar la resistencia farmacológica (Frimberger, 2007).

Si el linfoma tiene una localización extranodal solitaria, se puede realizar un tratamiento local sin la necesidad de quimioterapia sistémica (Vail y Thamm, 2007).

Se ha reportado que los pacientes con linfoma T de grado intermedio a alto tratados con protocolos quimioterápicos preestablecidos tienen peor pronóstico, en comparación con los linfomas de células B, asociado con tiempos de remisión y supervivencia significativamente más cortos (Teske et al., 1994; Valli et al., 2013). Si bien no existe un tratamiento específico para tratar los linfomas T, se sabe que éstos presentan una tasa de respuesta relativamente baja a la administración de una dosis única de doxorrubicina (Beaver et al., 2010). La doxorrubicina se considera el fármaco más eficaz contra el linfoma en perros, con tasas de respuesta a su administración como monoagente que oscilan entre el 59 % y el 81 % (Vail et al, 2007; Hosoya et al., 2007).

Sin embargo, ese porcentaje puede ser menor en los linfomas de células T. Tal es así que Beaver et al. (2010) reportaron que sólo el 50% de los perros con linfoma de células T responde a la administración de este citostático y solamente 2 de 12 perros de ese fenotipo tumoral incluidos sus trabajos lograron

una respuesta completa. Una explicación a este fenómeno podría ser la alta expresión del gen que codifica a la glicoproteína P (MDR-1) en las células T, la cual disminuye drásticamente la concentración intracelular de fármacos como la doxorrubicina o la vincristina (Klimecki et al., 1994). La gp-P es un factor pronóstico independiente en varias neoplasias malignas humanas (Gottesman et al., 2002), y varios estudios sugieren que influye en el resultado del tratamiento del cáncer canino, incluidos los tumores de mastocitos (Teng et al., 2012), los tumores mamarios (Kim et al., 2012), el carcinoma pulmonar (Hifumi et al., 2010) y linfoma (Lee et al., 1996; Dhaliwal et al., 2013; Zandvliet et al., 2014; Sokołowska et al., 2015).

Después de la selección de un protocolo y su siguiente aplicación, tenemos criterios para observar de una manera objetiva la respuesta a ese tratamiento. Obteniendo una remisión completa o parcial, tal como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Criterios para definir la respuesta en pacientes con linfoma multicéntrico sometidos a terapia.

Estado de respuesta	Criterio
Remisión completa	Desaparición de toda evidencia de la enfermedad; todos los linfonodos deben estar de tamaño normal según la valoración del medico veterinario y todas las lesiones medidas al inicio del estudio no pueden estar presentes ni pueden haber aparecido lesiones nuevas.
Remisión parcial	Disminución de al menos un 30% en la suma media del diámetro mayor de los nódulos linfáticos diana evaluados al inicio del estudio.
Enfermedad estable	Disminución de menos del 30 % o aumento del 20 % en la suma promedio del diámetro mayor de los nódulos linfáticos objetivo evaluados al inicio del estudio.
Enfermedad progresiva	Aumento de al menos un 20 % en la suma media del diámetro mmayor de los nódulos linfáticos diana evaluados al inicio del estudio. El diámetro más grande de al menos un linfonodo debe demostrar un aumento de por lo menos 5 mm en comparación con el valor inicial. Aumento considerable de una lesión no diana a criterio del evaluador o aparición de nuevas lesiones medibles y no medibles.

Fuente: Jark y De Sá Rodrigues (2022, p. 419).

Cuando termina el protocolo, surge la pregunta de si se debe realizar un mantenimiento adicional. Estudios realizados hasta ahora muestran resultados contradictorios en relación al beneficio del mantenimiento, se plantea que existe la posibilidad de que se desarrolle resistencia a los medicamentos en los protocolos de rescate si se continúa con el mantenimiento. Y también conlleva a un aumento significativo en los costos asociados al tratamiento. (Jark y De Sá Rodrigues, 2022)

2.2.6.2. Glucocorticoides

Los glucocorticoides son utilizados habitualmente en el tratamiento del linfoma en caninos. Éstos actúan induciendo la apoptosis de linfocitos y

linfoblastos (Smith y Cidlowski, 2010), experimentando la mayoría de los perros tratados una buena respuesta parcial a completa que dura de 60 a 90 días (Squire et al., 1973; Young y Rickinson, 2004) y que debe complementarse con tratamiento paliativo.

Debe tenerse en cuenta, además, que tal como ha sido demostrado el tratamiento con glucocorticoides previo al comienzo de la quimioterapia produce tasas de respuesta más bajas y períodos de remisión más cortos, así como también se lo ha asociado con resistencia a múltiples agentes (Teske et al., 1994; Gavazza et al., 2008; Marconato et al., 2011).

2.2.6.3. Protocolos de primera línea

Los protocolos son guías para dirigir el tratamiento, pero van a variar en cada caso particular. Se evalúan las tasas de respuesta, los efectos adversos y las comorbilidades. Se evalúa la localización y el tipo histológico del linfoma, algunos protocolos pueden ser más apropiados para ciertos subtipos de linfoma que otros, como ya se ha mencionado. Debe considerarse la condición financiera y la disponibilidad del propietario.

Hay varios protocolos de quimioterapia de primera línea, cada uno con sus propias ventajas y desventajas. Los protocolos más comunes incluyen las monoagentes y los multiagentes. De los que utilizan un sólo, la doxorrubicina parece ser el más efectivo (Higginbotham et al., 2013). El tratamiento con esta droga usualmente consta de 5 aplicaciones, con 3 semanas de intervalo entre ellas, y el tiempo medio de sobrevida es de 8 a 10 meses (Vail y Young, 2007; Young y Rickinson, 2004).

El protocolo COP incluye ciclofosfamida, vincristina y prednisolona, pero excluye la doxorrubicina. Se administra cada 3 semanas durante 6 ciclos. La tasa de respuesta completa a COP varía del 60% al 90%, de los casos y luego de 3 a 6 meses de tratamiento con un tiempo de sobrevida medio de 6 a 12 meses (Vail y Young, 2007; Young y Rickinson, 2004).

El protocolo Madison Wisconsin utilizan las siguientes 5 fármacos: ciclofosfamida, vincristina, prednisolona, doxorrubicina y L-Asparaginasa. Este protocolo proporciona una remisión del 80 a 90% y una sobrevida de 12 meses, observándose en el 25% pacientes sobrevidas de hasta 2 años (Hosoya et al., 2007).

El protocolo CHOP es uno de los más utilizados y está compuesto por cuatro fármacos quimioterápicos: ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona. Suele ser la primera opción en los linfomas agresivos, y dan como resultado la tasa de respuesta más alta y las duraciones de respuesta más largas, si lo comparamos con los antes descritos, produciendo una respuesta completa en el 60 a 90% de los casos, una remisión de aproximadamente 9 meses, y tiempo de supervivencia aproximado de 1 año (Simon et al., 2006), mientras que un 20-25% de los perros sobreviven 2 años o más (Withrow y Macewen, 2001). Además, forman la base para la mayoría de los protocolos actuales que se utilizan para tratar el linfoma de alto grado.

Actualmente, existe una búsqueda para la disminución de la duración del protocolo CHOP sin afectar las tasas de remisión y sobrevida de los pacientes, intentando disminuir el número de visitas a la clínica y por ende disminuyendo los costos (Rebhun et al., 2010; Curran y Thamm, 2016). Se han publicado trabajos utilizando CHOP de 19,15 y 12 semanas de duración, dado que tienen distintas metodologías no se podrían comparar entre sí. A pesar de eso y tomando algunas variables, tanto el protocolo de 15 como de 12 semanas tienen una tasa de remisión menor al CHOP de 19 semanas, pero lo que disminuye aún más son los días de sobrevida global, (contando los días de sobrevida libre de progresión).

Se debe tener presente que la respuesta y la sobrevida de los linfomas T de alto grado son normalmente inferiores a otros tipos de linfomas, por ese motivo es que se continua en la búsqueda y en el desarrollo de alternativas de tratamientos. En este sentido, Rebhun et al., 2011) sumó al protocolo CHOP la L-asparginasa, obteniendo una tasa de remisión completa del 88%, con una sobrevida de 235 días. En comparación con sólo CHOP que tuvo un 16% de remisión completa. Morgan et al., 2018 presenta el protocolo LOPP (lomustina, vincritina, procarbazina y prednisona) obteniendo una remisión completa de 82.8%, con una sobrevida de 500 días. A pesar de obtener resultados promisorios también se le asociaron efectos adversos tales como la mielosupresión en más de la mitad de los casos.

2.2.6.4. Protocolos de rescate

Los protocolos de rescate son tratamientos de segunda línea o posteriores que se administran a perros con linfoma que han recaído después de recibir un tratamiento de primera línea. Se utilizan para tratar tumores que son resistentes a los medicamentos utilizados en los protocolos de primera línea o para tratar tumores que han vuelto a aparecer después de la remisión (Frimberger, 2007; Vail y Thamm, 2007).

Es importante tener en cuenta que estos protocolos suelen tener más efectos secundarios y toxicidad que los protocolos de primera línea. Además, los perros que recaen después de un tratamiento de primera línea pueden tener un pronóstico menos favorable, se mencionan tasas de respuesta más cortas (2-3 meses) (Rassnick et al., 2002). Por lo tanto, la elección del protocolo de rescate dependerá del estado general de salud del perro, de la respuesta previa al tratamiento y de la presencia de cualquier enfermedad concurrente.

Los protocolos de rescate deben ofrecerse al momento de la enfermedad mínima residual y no durante una recaída clínicamente manifiesta (Marconato et al., 2011), por lo que la detección de células malignas a nivel molecular anticiparía una intervención terapéutica y conduciría a una mayor supervivencia a largo plazo. Estos métodos moleculares para detectar células malignas ya se han utilizado en oncología veterinaria (Lana et al., 2006).

Hay varios protocolos de rescate disponibles, pero a menudo se basan en el uso de medicamentos que no se utilizaron en el tratamiento de primera línea o en el uso de dosis más altas de medicamentos utilizados en el tratamiento de

primera línea. Algunos de los protocolos de rescate más comunes incluyen el uso de un agente único como la Lomustina, (70-80mg/m2; vía oral cada 21 días), Actinomicina D (0.6-0.7mg/m2; intravenoso cada 21 días), o la Mitoxantrona (5-7 mg/m2, intravenosa lenta de 10 a 20 minutos cada 21 días), (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

Existe también el uso de poliquimioterapia o múltiples agentes, como el caso de Lomustina (70/80 mg/m2. VO) + L-asparginasa (400 UI/kg S/C) + prednisolona (1mg/kg, VO); DMAC (Dexametasona, melfalano, actinomicina de citarabina); el MOPP (mecloretamina, vincristina, procarbazina, prednisona). Sin embargo, ninguno de estos protocolos ha demostrado una ganancia significativa en relación al tiempo libre de la enfermedad y a las tasas de remisión parciales y completas. Por lo que muchas veces se descarta la utilización de la poliquimioterapia, utilizando agentes disponibles comercialmente, menos costosos y con intervalos de administración más espaciados (Jark y De Sá Rodrigues, 2022, p.421).

2.2.6.5. Otros tratamientos quimioterápicos

Existen diferentes protocolos de tratamiento para el linfoma canino, especialmente para aquellos de células T de alto grado, que incluyen fármacos no dependientes de MDR1 como la lomustina, L-asparaginasa, procarbacina o mecloretamina, los cuales han demostrado ser superiores al protocolo clásico basado en CHOP (Brodsky et al., 2009; Morgan et al., 2018). Sin embargo, estudios han demostrado que un protocolo CHOP regular puede ser igualmente efectivo en perros con linfoma multicéntrico de células T. Para los perros en etapa V, se ha sugerido prolongar la fase de mantenimiento o incluir otros agentes, como el arabinósido de citosina, para mejorar la supervivencia, cualquier sea su fenotipo (Marconato et al., 2008).

En los linfomas de grado bajo o indolentes, que tienen una proliferación más lenta, no hay evidencia sólida de que la quimioterapia ofrezca beneficios significativos en términos de supervivencia (Valli et al., 2006; Seelig et al., 2014). En medicina humana, estos linfomas a menudo no se tratan inicialmente y el tratamiento sólo se recomienda en etapas avanzadas de la enfermedad. En el caso de los perros con linfomas de bajo grado, se ha demostrado que tienen un buen pronóstico a largo plazo y que los protocolos basados en CHOP no ofrecen beneficios significativos de supervivencia. Por lo tanto, se recomienda controlar los linfomas nodales indolentes y no tratarlos, o tratarlos con un protocolo de baja intensidad como el clorambucilo y la prednisolona (Mizutani et al., 2016; Moore, 2016). En el caso de la variante esplénica, se recomienda restringir el tratamiento a la esplenectomía.

2.2.6.6. Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento en el que se utiliza radiación para destruir células cancerosas. En el caso del linfoma, las células neoplásicas son

sensibles a la radiación, sin embargo, debido a que el linfoma es una enfermedad sistémica, el uso de la radioterapia está limitado. En algunos casos, se puede utilizar radiacíon en una sola sesión de cuerpo entero o en dos sesiones separadas de medio cuerpo junto con quimioterapia sistémica para el tratamiento del linfoma multicéntrico. La prioridad en este tratamiento es reducir la mielosupresión y los efectos gastrointestinales, por lo que se prefiere el tratamiento en dos sesiones de medio cuerpo (Zandvliet, 2016).

2.2.6.7. Inmunoterapia

La inmunoterapia es un enfoque de tratamiento del cáncer en el cual se utiliza el sistema inmunológico del paciente para combatir las células tumorales. Aunque la inmunoterapia ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de muchas neoplasias malignas de células B humanas, su uso en caninos es limitado (Winter y Hancock, 2009).

Uno de los tratamientos de inmunoterapia más utilizados en humanos es el anticuerpo monoclonal Rituximab, que se dirige al receptor CD20. Este anticuerpo actúa selectivamente sobre los pre-linfocitos y linfocitos B maduros, lo que ha demostrado mejorar significativamente el período libre de enfermedad y la supervivencia general en el linfoma no Hodgkin de células B humanas. Sin embargo, en caninos, aunque se ha demostrado la presencia de CD20 en los linfomas, Rituximab no ha sido efectivo y continúa la búsqueda de nuevos anticuerpos monoclonales efectivos (Impellizeri et al., 2006).

Otro enfoque de la inmunoterapia del cáncer en caninos es la vacunación contra el tumor, que tiene como objetivo estimular la respuesta inmune del cuerpo contra las células neoplásicas. Este enfoque se basa en la idea de que el sistema inmunológico del cuerpo puede reconocer y atacar células tumorales. La vacunación contra el tumor puede ser utilizada en combinación con otros tratamientos, como la quimioterapia o la radioterapia, para mejorar la eficacia del tratamiento (Cartagena y Romairone, 2018).

2.2.6.8. Nuevas opciones terapéuticas

El uso del Rabacfosadine, (Tanovea) ha demostrado su eficacia en perros que no han recibido tratamiento previo y en aquellos que han sufrido una recaída. Actúa inhibiendo las polimerasas α, δ y ε del ADN, lo que resulta en la detención de la síntesis del ADN y la inducción de la muerte celular y ese mecanismo de acción único tiene el potencial de superar la resistencia que puede surgir después del tratamiento con agentes previos (Elanco Laboratorio). En un estudio donde 17 canes fueron sometidos a esta droga como primera línea, se obtuvo una respuesta completa del 76%, con una media de 142 días sin remisión.

Está indicado principalmente para linfomas multicéntricos de alto grado, linfoma cutáneo, y también para el mieloma múltiple (Jark y De Sá Rodrigues, 2022, p. 413).

VERDINEXOR-LAVERDIA® es un medicamento en estudio para el tratamiento de linfomas, que funciona como un inhibidor de la proteína transportadora EXPORTIN 1 (XPO1), lo que mantiene activadas las vías de supresión y ayuda a controlar el crecimiento tumoral. Su mecanismo de acción es distinto al de los quimioterapéuticos convencionales (Dechra Laboratorio). Es un medicamento de fácil administración y los efectos adversos son generalmente de grado I y II, (anorexia, pérdida de peso, vómitos, letargia, diarrea). Sin embargo, la tasa de respuesta a este medicamento es baja y su duración es corta. Se necesitan más estudios, especialmente para evaluar la combinación de Verdinexor-Laverdia con otros fármacos (Jark y De Sá Rodrigues, 2022, p.413).

Estos medicamentos no se encuentran en nuestro país, ya fueron aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y se está realizando estudios para obtener más información.

2.2.6.9. Tratamientos Alternativos y/o complementarios

Si bien los siguientes tratamientos pueden ser prometedores, la evidencia científica sobre su eficacia específica en el linfoma canino puede ser limitada.

Hay casos de la utilización de algunas hierbas y suplementos. Por ejemplo, se ha estudiado el uso de la Artemisia annua (hierba de ajenjo dulce) y otros compuestos naturales como posibles agentes antitumorales (Efferth et al., 2008). La acupuntura y terapias complementarias, como la medicina tradicional china, la homeopatía y la terapia con campos electromagnéticos pulsados, se han utilizado para mejorar la calidad de vida y aliviar los síntomas asociados con el cáncer en perros. (Efferth et al., 2008)

La alimentación adecuada y el uso de suplementos específicos pueden desempeñar un papel importante en el apoyo al sistema inmunológico del perro y su bienestar general durante el tratamiento del linfoma. La dieta debe proporcionar una nutrición equilibrada que cumpla con las necesidades nutricionales específicas del perro. Debe incluir una combinación adecuada de proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales. Es importante asegurarse de que la dieta contenga proteínas de alta calidad para ayudar a mantener la masa muscular y promover una buena función inmunológica. Las fuentes de proteínas de calidad pueden incluir carnes magras, pescado y huevos (Bryan, 2016).

En cuanto a las grasas saludables, como los ácidos grasos omega-3, pueden tener efectos beneficiosos en perros con cáncer. Pueden encontrarse en el pescado graso (salmón, sardinas) y en algunos aceites vegetales, como el aceite de pescado o el aceite de krill. Suplementar con estos nutrientes mejoran los parámetros metabólicos y lo más importante, se mejoraron los tiempos de supervivencia y el intervalo libre de enfermedad. Los carbohidratos pueden proporcionar energía al perro, pero es importante elegir carbohidratos de calidad, como granos enteros (arroz integral, avena) y vegetales, en lugar de fuentes de carbohidratos refinados. Los antioxidantes, presentes en frutas y verduras, pueden ayudar a proteger las células del daño causado por los radicales libres. Se ha sugerido que pueden tener beneficios en perros con cáncer. Algunas

opciones de alimentos ricos en antioxidantes incluyen, las espinacas y las zanahorias (Bryan, 2016).

Debemos tener en cuenta que cada paciente es único, y las necesidades nutricionales pueden variar según su estado de salud, etapa del linfoma y otros factores.

2.2.7. Pronóstico

El pronóstico para los perros con linfoma es altamente variable y depende de una amplia variedad de factores documentados o supuestos que afectan la respuesta al tratamiento: tipo histológico, índice de proliferación, inmunofenotipo, estadificación y subestadificación, respuesta a las terapias utilizadas, presencia de neutropenia durante la quimioterapia, alteraciones hematológicas, la utilización de corticoides previo al tratamiento, presencia de enfermedad residual mínima (DRM) (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

La respuesta del paciente al tratamiento es un factor clave en el pronóstico. Aunque rara vez es curable (<10% de los casos), la obtención de remisiones completas y una buena calidad de vida durante las remisiones prolongadas y la supervivencia son esperables. La supervivencia media con tratamiento es de 12 meses y la tasa de supervivencia es de 2 años en el 25% de los caninos con linfoma (Vail y Young, 2007). Animales que entran en remisión completa en las primeras semanas del tratamiento, presentan tiempos de sobrevida más largos si los comparamos con animales que tuvieron una remisión parcial o se mantuvieron estables (Jark y De Sá Rodrigues, 2022, p. 429). Por otra parte, una respuesta pobre o una recaída pueden indicar un pronóstico menos favorable. Como se mencionó anteriormente, el protocolo CHOP que suele ser estándar para los linfomas de células B, tiene menor éxito en linfomas de células T (Beaver et al., 2010; Marconato et al., 2011).

En cuanto a la localización anatómica, por ejemplo, los linfomas primarios difusos, cutáneos, gastrointestinal y mediastínicos, se han asociado con un pronóstico menos favorables en relación a otros subtipos de linfoma (Vali et al., 2013).

La estadificación clínica, es otro factor pronóstico importante, presentando el peor pronóstico los pacientes en estadio V, en los cuales el linfoma se ha diseminado a múltiples sitios del organismo (Vail y Young, 2007). La subestadificación clínica también presenta valor pronóstico ya que los pacientes asintomáticos (subestadio a) suelen tener tasas de sobrevida mejores en comparación con los que tienen síntomas (subestadío b) (Thamm et al., 2017).

El tipo de células y la apariencia histológica del linfoma pueden afectar el pronóstico. Algunos tipos de linfoma tienen una mayor tasa de crecimiento y pueden ser más agresivos. Aquellos linfomas, clasificados como de grado intermedio o alto (células grandes, centroblásticas e inmunoblásticas) tienden a responder a la quimioterapia, pero pueden recaer tempranamente. Los perros con linfomas de bajo grado (linfocítico pequeño o centrocítico) tienen una tasa de respuesta más pobre a la quimioterapia, pero tienen una ventaja en cuanto a la supervivencia en comparación con los perros con linfomas de grado intermedio y alto. (Jark y De Sá Rodrigues, 2022)

El fenotipo tumoral es un factor muy importante. Tanto en las personas, como en los perros se ha reconocido durante mucho tiempo que los linfomas agresivos de células T tienen peor pronóstico que aquellos de células B, atribuible a características clínicas adversas más frecuentes en el momento del diagnóstico y una mayor incidencia de recaída (Teske et al., 1994; Milanovic et al., 2012; Frantz et al., 2013). A su vez, se ha observado que los perros con linfomas de células T presentan una tasa de respuesta completa significativamente menor que aquellos con linfoma de células B administrados con el mismo tratamiento (Aresu et al., 2013).

Varias recopilaciones de casos han documentado que los perros con linfoma indolente (por ejemplo, MZL, MCL, zona T) experimentan supervivencias prolongadas, a menudo en ausencia de quimioterapia o con tratamientos menos agresivos (Vail y Young, 2013). Según el estudio realizado por Valli et al., (2013), los perros con linfomas de alto grado tuvieron tasas de mortalidad significativamente más altas, que los perros con linfomas de células T de bajo grado.

Si bien la mayoría de los linfomas de células T son CD4+ CD45+, de alto grado, con un curso de enfermedad agresivo; existe una minoría que se caracteriza por ser CD45- y mostrar alta expresión de MHC de clase II. Estos últimos se caracterizan por ser de bajo grado y se asocian con el linfoma de zona T (Martini et al., 2017; Avery et al., 2014). Resultados similares fueron reportados por Valli et al. (2013), quienes hallaron que los caninos con linfomas de células T de bajo grado (zona T) tuvieron la mediana de supervivencia más larga (622 días), mientras que la mediana de supervivencia más corta fue en perros con el subtipo de células T de alto grado (células T periféricas) (162 días).

Las alteraciones laboratoriales son otro factor pronóstico. La hipercalcemia es una de las alteraciones paraneoplásicas más comunes y se presenta casi exclusivamente en linfomas de fenotipo T (Zandvliet, 2016). Si bien algunos investigadores sostienen que la hipercalcemia está asociada con un pronóstico pobre (Weller et al., 1982; Marconato et al., 2011), otros han demostrado que la presencia de hipercalcemia en los linfomas de células T no tiene ningún efecto negativo adicional en la respuesta al tratamiento o la supervivencia (Rebhun et al., 2011). También puede utilizarse la enzima LDH como marcador pronóstico, siendo la información en caninos controversial. En el estudio de Sánchez et al. (2021) se evidenció una relación directa entre valores altos de LDH (superiores a 500 UI/l) y una menor sobrevida en linfomas TCD45+.

3. CASO CLÍNICO

3.1. Objetivos

1. Describir el linfoma canino.
2. Reportar un caso clínico para mostrar como la inmunofenotipificación del linfoma en caninos a través de la citometría de flujo, permite dirigir el tratamiento según la estirpe celular que da origen al tumor y emitir un pronóstico certero.
3. Clasificar dicho caso desde un punto de vista anatómico e inmunofenotípico. Estadificarlo acorde a los estadios de la OMS.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Caso clínico

Se describe el caso clínico de un canino macho entero, de raza Airedale Terrier, de 8 años de edad y 19 kg de peso vivo, con diagnóstico clínico y citológico de linfoma. El mismo fue derivado de una clínica veterinaria particular al Hospital Escuela de la Facultad de Veterinaria (UdelaR) para complementar el diagnóstico e implementar un tratamiento acorde al inmunofenotipo.

Al examen clínico realizado evidenció que todos los nódulos linfáticos periféricos superficiales estaban aumentados de tamaño (linfadenopatía generalizada), presentaban movilidad y no mostraban dolor a la palpación. No se observaron particularidades en la coloración de las mucosas, temperatura corporal (38.3ºC), así como tampoco en la frecuencia cardíaca (84 LPM) y respiratoria (32 RPM). La tenedora comentó que su perro está decaído, ha perdido peso en las últimas semanas y que no recibió tratamiento previo a la consulta.

3.2.2. Toma de muestras

Se extrajeron 5 ml de sangre de la vena cefálica del paciente, con agujas hipodérmicas 21G y se dividieron en 2 submuestras. Una de ellas se colocó en un tubo con EDTA para la realización de un hemograma completo, e inmunofenotipificación por citometría de flujo y la otra en un tubo sin anticoagulante para la determinación de la calcemia, actividad sérica de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y la realización de un proteinograma electroforético.

Por medio de la técnica punción aspiración con aguja fina (PAAF), se extrajeron muestras del linfonodo poplíteo derecho para repetir la citología y realizar la citometría de flujo, utilizando una jeringa de 5 ml y una aguja hipodérmica de 21G. Para el estudio del inmunofenotipo el contenido extraído se colocó en un tubo eppendorf con EDTA y 1 ml de PBS (buffer fosfato salino, pH 7.4).

Además, para realizar el mielograma y evaluar la médula ósea por citometría de flujo, se realizó una punción en la cresta ilíaca anteroposterior, utilizando un spinocan 19G x 1 ½. El contenido extraído se colocó en un tubo con EDTA hasta su posterior evaluación en el laboratorio.

Figura 2. Se muestra el abordaje a la médula ósea la cresta ilíaca anteroposterior.

3.2.3. Estudios paraclínicos

El hemograma se realizó en un contador hematológico (Orphée, Mythic 18 Vet, Ginebra, Suiza). Para el recuento diferencial de los leucocitos y valoración de la morfología celular se realizó un frotis sanguíneo teñido con May Grunwald – Giemsa.

La calcemia y la actividad de la enzima LDH se determinaron en un equipo semiautomático, CB 350i (Wiener lab Group, Rosario, Argentina). Para asegurarse de que la hipercalcemia no se deba a lipemia o hemólisis, se interpretó en relación con el nivel de albúmina en suero, utilizando una fórmula de corrección sugerida por Bergman (2012): calcio corregido (mg/dl) = [calcio (mg/dl) - albúmina (g/dl)] + 3.5. Los rangos de referencia utilizados para estas variables fueron los de la Universidad Estatal de Oregón.

En una submuestra de suero se realizó el proteinograma electroforético capilar en un equipo automático (Minicap, Sebia, Barcelona, España). Las fracciones proteicas fueron albúmina y alfa 1, alfa 2, beta y gamma globulinas.

3.2.4. Imagenología

Al momento de la consulta el paciente ya contaba con ecografía de abdomen realizada en la clínica particular que lo derivo.

3.2.5. Inmunofenotipo por citometría de flujo

Una vez recibidas las muestras, se evaluó la calidad de las mismas en cuanto a cantidad de células obtenidas y viabilidad mediante citometría de flujo (Accuri C6, BD BIOSCIENCES, California, EEUU). Las muestras obtenidas fueron satisfactorias, presentando entre 500.000 a 1.000.000 de células totales y una viabilidad superior al 80% determinada con tinción con Ioduro de propidio (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU).

Para la inmunofenotipificación se utilizaron anticuerpos primarios específicos para la especie canina (BIO-RAD, USA) dirigidos contra antígenos de diferenciación celular CD34, CD45, CD3 y CD5, CD4, CD8, CD21. La incubación de todos los anticuerpos se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante, en un ambiente oscuro durante 45 minutos y a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a lisar los glóbulos rojos, utilizando 1 ml de buffer de lisis (Quicklysis, Visur, Salamanca, España), en oscuridad durante 10 minutos. Una vez completada la lisis, las células nucleadas estuvieron prontas para ser adquiridas en el citómetro de flujo.

Se adquirieron un mínimo de 5000 linfocitos y las muestras se analizaron siempre en duplicado. Como control negativo se incluyó un tubo con el mismo tipo de muestra y tratado bajo las mismas condiciones, pero al que no se le añadió anticuerpos. Para la interpretación de los resultados, se consideró un mínimo de 65% de positividad o negatividad a cada marcador para considerar la población positiva o negativa, respectivamente. Cuando más del 20% y menos del 65% de las células neoplásicas fueron positivas a un marcador, se interpretó como que lo “expresó”.

3.3. Resultados

3.3.1. Hematología y bioquímica sérica

El hemograma evidenció que el recuento total de glóbulos blancos estaba sobre el límite inferior de referencia para la especie canina y se acompañaba de eosinopenia. Por otro lado, los recuentos absolutos de neutrófilos, monocitos y linfocitos se mantuvieron dentro de los parámetros normales (Tabla 7). En la línea roja, los datos muestran una anemia normocítica leve, con anisocitosis. El estudio de la morfología celular evidenció la presencia de equinocitos, blastos circulantes correspondientes tanto a la serie eritroide como a la linfoide, así como también la presencia de agregados plaquetarios.

En cuanto a la bioquímica sérica, los parámetros evaluados (calcemia, actividad sérica de LDH) se encontraron dentro del rango de referencia para la especie (Tabla 7).

3.3.2. Proteinograma electroforético

El proteinograma electroforético capilar, descarto la presencia de gammapatías, manteniendo los valores de cada fracción dentro de los valores de referencia, sin embargo, reveló hipoproteinemia e hipoalbuminemia (Figura 3, Tabla 7).

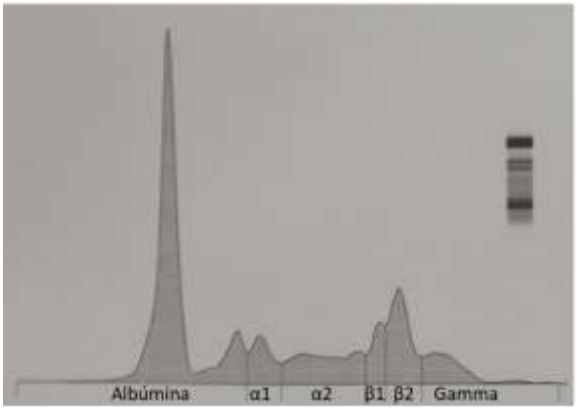

Figura 3. Diagrama de electroforesis de proteínas capilares. Se observan las diferentes fracciones proteicas.

Tabla 7. Análisis hematológico y bioquímica sérica.

HEMOGRAMA			
	VALOR	UNIDAD	VALORES DE REFERENCIA
LEUCOCITOS	6200.0	/mm3	6000 -17000
LINFOCITOS	2356.0	/mm3	1000 – 4800
NEUTROFILOS	3472.0	/mm3	3000 -11400
MONOCITOS	372.0	/ul	150 – 1350
EOSINOFILOS	0.0	/ul	100 – 750
BASOFILOS	0.0	/ul	0.0 – 0.0
LINFOCITOS %	38.0	%	12.0 - 30.0
NEUTROFILOS %	56.0	%	60.0 - 77.0
MONOCITOS %	6	%	3 – 10
EOSINOFILOS %	0	%	2 – 10
BASOFILOS %	0	%	0 – 0
ERITROCITOS	5.10	mill/ul	5.50 - 8.52
HEMOGLOBINA	12.2	g/dl	12.0 - 18.0

HEMATOCRITO	32.1	%	37.0 - 55.0
MCV	62.9	Fl	60.0 - 77.0
CHCM	23.9	Pg	19.5 - 24.5
CHCH	38.0	g/dl	33.0 - 36.0
RDW-CV	18.2	%	10.6 - 14.3
PLAQUETAS	115000.0	/ul	200000.0 – 900000.0
MPV	7.8	Fl	
BIOQUÍMICA SÉRICA			
LDH	149	UI/l	30 – 236
Calcio	9.53	mg/dl	8.0 – 11.4
PROTEINOGRAMA ELECTROFORÉTICO			
PROTEÍNAS TOTALES	4	g/dl	5.4-7.6
ALBÚMINA	2.1	g/dl	3.1-4.2
ALFA 1	0.3	g/dl	0.2-0.5
ALFA 2	0.6	g/dl	0.4-1.0
BETA 1	0.2	g/dl	0.2-0.8
BETA 2	0.5	g/dl	0.4-1.6
GAMMA	0.3	g/dl	0.3-1.2

3.3.4. Ecografía

En el estudio ecográfico realizado, el informe detalla que el hígado está homogéneo, con leve disminución de ecogenicidad global. La vesícula biliar presenta la pared engrosada. La pared de la vejiga se encuentra levemente engrosada. Se evidencia prostatomegalia (4.7 x 5 cm), levemente irregular, lo que puede ser compatible con hiperplasia y prostatitis. Se observan 3 linfonodulos iliacos internos agrandados hipoecoicos e irregulares, compatibles con proceso reactivo infiltrativo. En cuanto al bazo, presenta una leve esplenomegalia, con leve puntillado hipoecoico (Figura 4). Los riñones y testículos no presentaban anormalidades al momento del estudio.

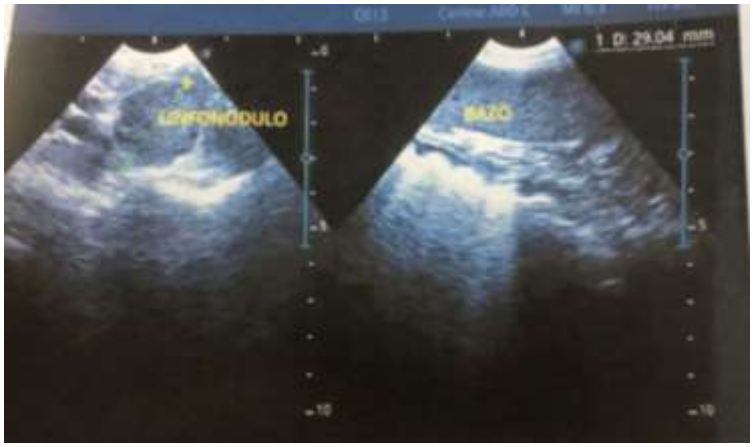

Figura 4. Estudio ecográfico. A la izquierda de la imagen se observan linfonodos hipoecoicos e irregulares. Derecha, esplenomegalia, con puntillado hipoecoico.

3.3.4. Citología de linfonódulo

El examen citológico confirmó el diagnóstico clínico presuntivo de linfoma. A la observación de la muestra de linfonodo poplíteo derecho, se describe; abundante población linfoide homogénea, corresponden a población linfoide inmadura en un 80%. Presentan tamaño mediano, cromatina nuclear laxa. Presencia de nucléolos evidentes, escasas figuras mitóticas. Estudio compatible con Linfoma.(Figura 5)

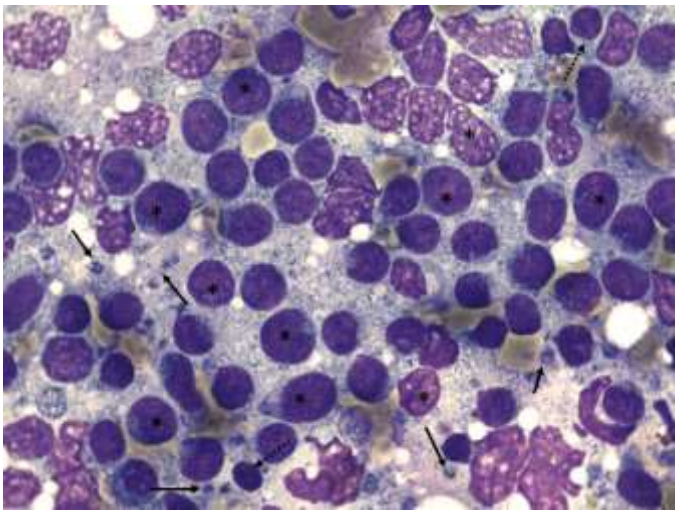

Figura 5. Citología de linfonódulo poplíteo derecho obtenida por PAAF y teñida con May-Grunwald Giemsa. La población celular está mayoritariamente compuesta por linfoblastos (*) y se observan cuerpos linfoglandulares de tamaños variables (flecha sólida) y linfocitos normales (flecha punteada).

3.3.5. Mielograma

Se informa una médula ósea de celularidad global conservada con presencia de escasos megacariocitos. Se destaca la presencia de elementos linfoides que conforman el 70% de la población nucleada medular. El parénquima mieloide remanente se encuentra en una relación G/E=1/1.5, a expensas de un descenso porcentual de la serie granulocitaria. En la zona puncionada no se observaron elementos de origen extrahematopoyético.
En suma: mielograma compatible con síndrome linfoproliferativo.

3.3.6. Citometría de flujo

La inmunofenotipificación por citometría de flujo fue realizada en nódulo linfático, medula ósea y sangre, resultando compatible con linfoma originado en linfocitos T caracterizados por presentar marcación positiva a los antígenos de superficie CD45+, CD3+, y CD21-, en las tres muestras. El CD5 se expresó en sangre y punción de linfonodo pero fue positivo en MO. Sin embargo, no se pudo constatar el subtipo de linfocitos T, por presentar marcación negativa al antígeno CD8 (T citotóxico) los 3 tejidos. Respecto al CD4, fue negativo en sangre, expresó marcación en el linfonodo y fue positivo en médula ósea (Figura 5).

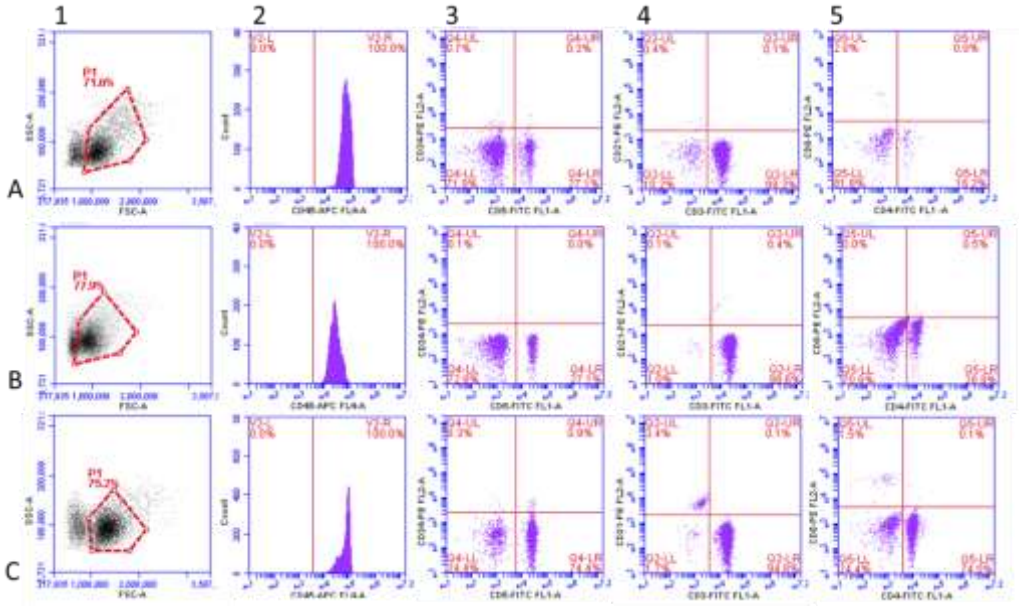

Figura 5. Representación gráfica de la citometría de flujo realizada (A, sangre; B, linfonódulo; C, médula ósea). Diagrama de dispersión morfológica (dispersión frontal, FSC; dispersión lateral, SSC), (A.1, B.1, C1) donde se selecciona la población linfoide a ser estudiada (P1). Los histogramas muestran que la población de linfocitos fue positiva para CD45 (A.2, B.2, C.2). Diagnóstico de Linfoma T; positivo a CD3 (A.4, B.4, C.4), y negativo para CD21 (A.4, B.4, C.4), CD34 (A.3, B.3, C.3) y CD8 (A.5, B.5, C.5). Se observa expresión de CD5 en sangre y linfonódulo (A.3, B3) y marcación positiva a CD5 y CD4 y en MO (C.3, C5). La sangre fue negativa a CD4 (A.5), mientras que se expresó dicho marcador en linfonódo (B.5).

3.3.7. Tratamiento

A partir de los resultados obtenidos en los estudios realizados se decide instaurar un tratamiento. El hecho de ser un linfoma de inmunofenotipo T (CD3+, CD45+) y estar en estadio V (infiltración de médula ósea y sangre periférica), plantea un panorama complejo dada la agresividad de este fenotipo y la sintomatología clínica del paciente (subestadio b).

El tratamiento inicial fue con prednisolona (1 mg/kg/dia/PO) y clorambucilo (durante el primer mes se administró por día 2mg y luego se administro cada 48hrs, recién allí nos acercamos a los 20 mg/m^2/PO). Durante los primeros meses de tratamiento los propietarios y la oncóloga tratante notaron una mejoría

tanto en el estado de ánimo como desde el punto de vista físico. Se realizó un hemograma de control, el cual estaba dentro de los parámetros normales.

Luego de 6 meses de instaurado el tratamiento, comenzó a notarse una desmejora en el estado general del paciente, disminuyendo 4 kilos. Se notaba con mucosas pálidas y muy decaído.

Se realizó un cambio en el tratamiento, sustituyendo la prednisona y clorambucilo por Lomustina (75mg/m^2/PO), medicamento que fue administrado por única vez.

El paciente fue eutanasiado luego de haber perdido la remisión y debido a un cuadro respiratorio, que complicó su situación. La sobrevida desde el diagnóstico confirmatorio hasta el día de la eutanasia fue de 290 días.

4. DISCUSIÓN

Esta tesis describe un caso de linfoma multicéntrico, en estadio V, de subestadio b, originado en linfocitos T aberrantes (CD3+, CD45+, CD8-, con expresión de CD4 y CD5). De acuerdo con los datos de la bibliografía, el linfoma multicéntrico se presenta mayormente en perros de edad media a avanzada y es el tipo anatómico que se diagnostica con mayor frecuencia acompañándose de linfadenopatía generalizada (Nelson y Couto 2010; Marconato et al., 2012). La raza de nuestro paciente (Airdaile Terrier) ha sido descrita como una raza de riesgo, particularmente predispuesta a desarrollar linfoma de fenotipo T (Modiano et al., 2005).

El diagnóstico clínico de linfoma multicéntrico se confirmó mediante PAAF de nódulos linfáticos por citología. Se debe tener en cuenta que esta técnica permite arribar al diagnóstico en el 90% de los linfomas de alto grado, pero no sustituye la histopatología e inmunohistoquímica (Gold standar) (Marconato et al., 2011; Valli et al., 2013). Dichas técnicas no se realizaron en este caso por contar con métodos menos invasivos que si bien no permiten evaluar la arquitectura tisular, complementan el diagnóstico obteniendo el resultado en pocas horas luego de extraída la muestra. En este sentido, el tipo celular que dio origen al tumor (inmunofenotipificar) se evaluó mediante citometría de flujo, permitiendo además identificar aberraciones en linfocitos neoplásicos. La marcación positiva a los antígenos de superficie CD45 y CD3 en las tres muestras evaluadas permitió concluir que el linfoma se originó en linfocitos T.

Sin embargo, los demás marcadores estudiados mostraron variaciones. La citometria de flujo, además de auxiliar en la clasificación del linfoma, tiene la capacidad de suministrar valores pronósticos según la cuantificación de los antígenos presentes (Jark y De Sá Rodrigues, 2022). El marcador CD45 se considera un indicador clave en el diagnóstico de la enfermedad ya que la pérdida de la expresión del mismo se asocia al subtipo T indolente con excelente pronóstico (Martini et al., 2015 y 2017).

Sin embargo, la expresión del antígeno CD45+, tiene gran repercusión clínica, al asociarse a los linfomas T agresivos de alto grado (Valli et al., 2013; Avery et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, nuestro paciente mostró un fenotipo aberrante caracterizado por la falta de positividad a CD5 y CD4 en sangre y linfonodo. El antígeno CD5 es específico de linaje T, al igual que el CD3, y por lo tanto era de esperar una marcación positiva al mismo. Sin embargo, la falta de expresión de CD5 en los linfomas de células T es una de las aberraciones observadas con más frecuencia, pudiendo considerarse útil como marcador de neoplasia, aunque no tiene relación con el pronóstico. (Avery et al., 2014; Pawlak et al., 2014; Harris et al., 2019).

Teniendo en cuenta la ontogenia de los linfocitos T, esperábamos que la marcación positiva a CD4 observada en la MO, se vea reflejada en el linfonodo y la sangre. Cabe destacar que el proceso de selección, diferenciación y maduración de linfocitos T dentro del timo, culmina con la producción de distintas

subpoblaciones de linfocitos T que se especializan en funciones diferentes (T colaboradores CD4+ ó T citotóxicos CD8+) (Abbas et al., 2008), pasando por estadios intermedios que son en primer lugar negativo a ambos marcadores y luego positivos a los 2 finalizando con una marcación simple (CD4 o CD8). Sin embargo, dentro de las aberraciones descritas en el linfoma T se encuentran la coexpresión de 2 subtipos de linfocitos T colaboradores (CD4) y T citotóxico (CD8) en la misma población celular, o la ausencia de ambos (Comazzi y Gelain, 2011; Martini et al., 2013; Pawlak et al., 2014; Martini et al., 2015; Sánchez et al., 2021).

En cuanto al mielograma se destaca el 70% de la población celular correspondiente a la serie linfoide, cuando se espera entre un 5 a 10%. Dicha hiperplasia linfoide debe ser diferenciada de procesos reaccionales por medio de inmunofenotipaje, estudio que se realizó y se concluye que dentro de la población linfocitaria existe un marcado recuento de CD3+ y CD45+, ambos en un 99%, lo que implica pensar en una proliferación linfoide de tipo T. Dada esta infiltración o sustitución del tejido normal por tejido neoplásico en la médula ósea (mieloptisis) se puede estadificar al linfoma como grado V, y por tanto podemos decir que el linfoma se ha leucemizado. Además, en el mielograma se observó un descenso porcentual de la serie granulocitaria, en una relación G/E=1/1.5, cuando lo normal es una relación 1:1. Si bien la celularidad de la médula disminuye con la edad, en nuestra muestra existe una normocelularidad y el índice EM o GM estaría sobre el límite inferior según lo descrito por Jark y De Sá Rodrigues, (2022); considerándose una hipoplasia mieloide y/o hiperplasia eritroide.

Dado el gran aumento de la población linfoide del mielograma se justifica realizar un diferencial con leucemia linfocítica crónica (LLC), además de que es la segunda neoplasia hematopoyética maligna más diagnosticadas, después del linfoma (Nabhan y Rosen, 2014; Rout y Avery, 2017; Avery, 2020). La LLC es causada por la proliferación anormal de pequeños linfocitos que experimentan una maduración completa y ordenada en la médula ósea. Dicho diagnóstico pudo descartarse gracias a los estudios realizados. Uno de los datos más consistentes con LLC y que no estuvo presente en nuestro paciente es la linfocitosis absoluta persistente, con recuentos de linfocitos que oscilan entre 30.000 y 100.000 linfocitos pequeños/µl (Leifer y Matus, 1986), e incluso pueden existir recuentos que superan el millón de linfocitos/µl de sangre (Vernau y Moore, 1999). También debemos agregar que las LLC son originadas en linfocitos pequeños T CD8+, en la mayoría de los casos, datos que tampoco coinciden con nuestro reporte. Además, también muestran muchas diferencias desde el punto de visto clínico, ya que las LLC son de curso lento e insidioso, sin mostrar signos evidentes, mientras que el linfoma T suele ser muy agresivo (Vernau y Moore, 1999; Nelson y Couto, 2010).

El perfil hematológico y la bioquímica sanguínea en caninos diagnosticados con linfoma presentan una variedad de alteraciones, si bien todas ellas carecen de especificidad (Gavazza et al., 2008). Estudios previos han demostrado que más del 30% de los perros con cáncer, incluyendo el linfoma en

estadio V, presentan anemia (Madewell & Feldman, 1980). La anemia observada en nuestro paciente es también consistente con Tasca et al. (2009), quienes consideran esta alteración hematológica como una complicación frecuente en pacientes caninos oncológicos. Además de ser uno de los trastornos más frecuentemente asociados al linfoma, la anemia se considera un factor pronóstico negativo (tanto en humanos como en caninos con linfoma), (Abbo y Lucroy, 2007; Miller et al., 2009).

Sin embargo, los mecanismos subyacentes aún no están completamente elucidados. Estos pueden relacionarse con inflamación o con la producción de sustancias inductoras de anemia por parte de las células tumorales (Honda et al., 1995; Birgegard et al., 2005). En el caso de caninos con linfoma, se han considerado causas potenciales como anemia hemolítica autoinmune, aplasia de la línea roja, hiperesplenismo e infiltración de la médula ósea por linfocitos malignos (Lucroy et al., 1998). Otro aspecto relacionado a la anemia que no fue evaluado en este paciente, es la evaluación de la regeneración medular mediante el recuento absoluto de reticulocitos. Sin embargo, el hecho de que no se haya observado policromasia en el frotis, sugiere falta de regeneración. Esta sospecha se vio acompañada por los índices hematimétricos, que en caso de regeneración estaría aumentado el volumen corpuscular medio (VCM, reticulocitos son más grandes que los eritrocitos maduros) y disminuida la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM, menor contenido de hemoglobina). También ayuda a definir la anemia no regenerativa, el mielograma realizado, el cual tenía una sustitución de tejido hemático por linfoide, ocasionada por la mieloptisis.

Del mismo modo, la presencia de eosinopenia puede deberse a un mecanismo mediado por el sistema inmunitario, así como también por el involucramiento de la médula ósea (Keller, 1992; Neuwald et al., 2014). En este mismo sentido, Dipaolo et al. (2005), sugirieron que, durante la proliferación neoplásica, las células T pueden perder sus funciones supresoras contra las células propias, conduciendo a citopenias periféricas inmunomediadas. Esta alteración hematológica fue previamente informada por nuestro grupo de trabajo en el 37% de los pacientes con linfoma, aunque la mayoría de ellos pertenecían al linfoma T indolente (Sánchez eet al., 2021).

En caninos con linfoma, los biomarcadores séricos (sustancias biológicas producidas por células neoplásicas o por el huésped en respuesta al cáncer), han tomado importancia clínica en los últimos años, ya sea para el diagnóstico, pronóstico y/o monitoreo de los tratamientos (Bryan, 2016). Los valores de la actividad sérica de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) del paciente se encontraron dentro del rango de referencia, valor que no esperábamos encontrar al tratarse de un paciente con linfoma T agresivo, CD45+. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo, hallaron que valores de actividad sérica de esta enzima superiores a 500UI/L en linfomas de inmunofenotipo T, se asociaban a menores tiempos de sobrevida y, por lo tanto, peor pronóstico (Sánchez et al., 2021).

En cuanto a los valores de calcemia, también se encontraron dentro del rango de referencia para la especie, aún utilizando la fórmula de corrección mencionada ut supra. Sin embargo, existen reportes que indican que la hipercalcemia es uno de los síndromes paraneoplásicos más comunes en perros

con linfoma, específicamente en aquellos de inmunofenotipo T (Aresu et al., 2013; Zandvliet, 2016).

El proteinograma electroforético puede proporcionar información útil para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la enfermedad. En nuestro caso, se descartaron las gammapatías, mostrándose cada fracción dentro del rango esperado, aunque existió una disminución en la concentración proteínas totales acompañada de hipoalbuminemia. La hipoproteinemia puede deberse a varios factores relacionados con la enfermedad en sí y los efectos secundarios del tratamiento, aunque esta última causa se puede descartar por no haberlo iniciado (Withrow y MacEwen's 2012). La pérdida de apetito en nuestro caso, puede llevar a una reducción en la absorción intestinal de proteínas. La albumina es una proteína de fase aguda (PFA) negativa, es decir que disminuye ante respuestas inflamatorias. La hipoalbuminemia presente en nuestro caso puede entonces atribuirse a un estado inflamatorio, así como también a un estado de inmunosupresión, una respuesta inflamatoria atenuada o una enfermedad subyacente que afectó la producción de estas proteínas (Jark y De Sá Rodrigues, 2022).

La evaluación de radiografías torácicas y abdominales, así como la ecografía abdominal pueden ser importantes para determinar la extensión de la afectación interna. En el informe ecográfico de nuestra paciente se detallan una serie de hallazgos en diferentes órganos, pero en particular, destaca la presencia de linfonodos iliacos internos agrandados e hipoecoicos, y una afección del bazo, por lo que podemos inferir que resultan de una infiltración neoplásica, lo que nos da información de la extensión de la enfermedad.

Lamentablemente, es una limitante para nuestro trabajo no contar con las radiografías y por ende no poder concluir si el paciente se ajustaba a lo descrito por la bibliografía que menciona que aproximadamente el 60% al 75% de los perros con linfoma multicéntrico presentan anomalías en las radiografías torácicas, siendo un tercio de ellos con evidencia de infiltrados pulmonares y dos tercios con linfadenopatía torácica (nódulos linfáticos esternales y traqueobronquiales y ensanchamiento del mediastino craneal), (Hamilton et al.,1994). Para los casos típicos de linfoma multicéntrico canino, la imagen se limita a radiografías torácicas, ya que no hay diferencia pronóstica entre los perros con enfermedad en etapa III y IV (es decir, afectación de hígado/bazo), mientras que la presencia de linfadenopatía mediastinal craneal tiene significado pronóstico (Vail et al., 2013)

De todo lo descrito hasta el momento se desprende el comportamiento agresivo del linfoma presente en nuestro paciente, lo que requirió un enfoque terapéutico acorde. El tratamiento de linfoma tiene por finalidad dar al paciente una mejor calidad de vida y buscar la remisión de la enfermedad por el mayor tiempo posible. La quimioterapia es el tratamiento principal utilizado para tratar este tipo de linfoma, aunque la respuesta al tratamiento y la supervivencia pueden variar según el caso individual. La mayoría de los estudios muestran que los linfomas de células T y en estadio V tienen un pronóstico más pobre y, como resultado, se han sugerido protocolos alternativos, que incluyen fármacos no dependientes de MDR1 como la lomustina, L-asparaginasa, procarbacina o mecloretamina, los cuales han demostrado ser superiores al protocolo clásico basado en CHOP (Brodsky et al., 2009; Morgan et al., 2018). Para los perros en

etapa V, se ha sugerido prolongar la fase de mantenimiento o incluir otros medicamentos, como el arabinósido de citosina, para mejorar la supervivencia, cualquier sea su fenotipo (Marconato et al., 2008).

El tratamiento elegido en el paciente, como protocolo de primera línea fue (prednisolona y clorambucilo), con el cual se observaron mejorías. Sin embargo, 6 meses luego de iniciado el mismo, tuvo una recaída, y se optó por la Lomustina como protocolo de rescate. El protocolo de primera línea utilizado se considera de baja intensidad, incluso se plantea su uso para linfomas T indolentes (Mizutani et al., 2016; Moore, 2016). Pero como se ha aclarado reiteradamente, a veces la mejor opción terapéutica para el paciente y su tipo de enfermedad, no es la ideal para los tutores de la mascota, ya sea económicamente, por temas de logística, tiempos o incluso la forma de administración de la quimioterapia. Con respecto al agente utilizado en el protocolo de rescate, la Lomustina, es una de las indicadas para tratar el inmunofenotipo T y se administra por vía oral cada 21 días (Moore, 2016). En este caso se administró una única vez.

Consideramos que la sobrevida de nuestro paciente fue buena (aproximadamente 9 meses y medio), a pesar de todos los factores pronósticos negativos antes mencionados, y sabiendo que los linfomas T de alto grado tienen peor pronóstico (Frantz et al., 2013; Milanovic et al., 2012; Teske et al., 1994).

5. CONCLUSIÓN

Este caso resalta la importancia de combinar la citología, el inmunofenotipado, el mielograma y el perfil hematológico y bioquímico en el complejo proceso de diagnóstico del linfoma multicéntrico canino. La citometría de flujo, cada vez más utilizada en medicina veterinaria representó un paso fundamental, permitiendo confirmar rápidamente el diagnóstico de linfoma leucemizado. El empleo de esta técnica constituye una herramienta diagnóstica de gran valor en la toma de decisiones terapéuticas, así como también al momento de emitir el pronóstico de pacientes caninos con linfoma.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology, 8 ed, Editora Saunders, 2008.

Abbo, A.H., y Lucroy, M.D. (2007). Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). *J Am Vet Med Assoc*.,*231*(12),1836-1842.

Aceña, M.C., Liste, E., y Gascón, E.M. (1992). Biopsia de médula ósea en perro: técnica y utilidad diagnóstica. *Clinica veterinaria de pequeños animales, 12*(2), 177-182.

Alvarez, F. (2001). *Curso de oncología en pequeñas especies*. Asociaciones de médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies y Colegios Médicos Veterinarios Zootecnistas. Área Metropolitana de la Ciudad de México.

Aniolek, O., Gajewski, Z., y Ginzinski, S. (2014). Application of flow cytometry in diagnosing lymphomas in dogs and cats. *Centr Eur J Immunol*, *39*(3), 327-330.

Aresu, L., Arico, A., Comazzi, S., Gelain, M.E., Riondato, F., Mortarino, M., Morello, E., Stefanello, D., y Castagnaro, M. (2012). VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma. *Vet Comp Onco, 12*, 29-36.

Aresu, L., Martini, V., Rossi, F., Vignoli, M., Sampaolo, M., Arico, A., Laganga, P., Pierini, A., Frayssinet, P., Mantovani, R., y Marconato L. (2013). Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. *Vet Vomp Onco.* https://10.1111/vco.12048

Avery, P.R., Burton, J., Bromberek, J.L., Seelig, D.M., Elmslie, R., Correa, S., Ehrhart, E.J., Morley, P.S., y Avery, A.C. (2014). Flow cytometric characterization and clinical outcome of CD4+ T-cell lymphoma in dogs: 67 Cases. *J Vet Intern Med, 28* (538-546).

Avery, A.C. (2020). The genetic and molecular basis for canine models of human leukemia and lymphoma. *Front. Oncol. 10* (23).

Bangerter, M., Brudler, O., Heinrich, B., y Griesshamnuer, M. (2007). Fine needle aspiration cytology and flow cytometry in the diagnosis and subclassification of non-Hodgkin's lymphoma based on the World Health Organization classification. *Acta Cytologica, 51*, 390–398.

Beaver, L.M., Strottner, G., y Klein, M.K. (2010). Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association, 237*, 1052–1055.

Birgegard, G., Aapro, M,, Bokemeyer C., et al.(2005). Cancer-related anemia: Pathogenesis, prevalence and treatment. *Oncology, 68*, 3–11.

Brodsky, E.M., Maudlin, G.N., Lachowicz, J.L., y Post, G.S. (2009). Asparaginase and MOPP treatment of dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med. 23*, 578-584.

Bryan, J.N. (2016). The current state of clinical application of serum biomarkers for canine Lymphoma. *Front. Vet. Sci. 3* (87). https://10.3389/fvets.2016.00087

Bryan, J.N. (2010). Tumors of the Hematopoietic System. En Carolyn J. Henry y Mary Lynn Higginbotham (Eds.), *Cancer Management in Small Animal Practice,* (pp. 343-356). Saunders.https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3183-3.10025-0

Calvalido, J., Wood, G., Mutsaers, A., Wood, D., Sears, W., y Wood, J.P. (2016). Comparison of serum cytokine levels between dogs with multicentric lymphoma and healthy dogs. *Vet Inmunol Inmunopathol, 182*, 106-112.

Cartagena, J., y Romairone, A. 2019 *Oncología en animales geriátricos con casos clínicos*. Servet.

Comazzi, S., y Gelain, M.E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal*, 149-155.

Comazzi, S., Martini, V., Riondato, F., Poggi, A., Stefanello, D., Marconato, L., y Gelain, M.E. (2015). Chronic lymphocytic leukemia transformation into high-grade lymphoma: a description of Richter's syndrome in eight dogs. *Veterinary and Comparative Oncology, 15*(2), 366–373. https://doi:10.1111/vco.12172

Comazzi, S.; Marelli, S., Cozzi, M., Rizzi, R., Finotello, R., Henriques, J., Pastor, J. , Ponce, F., Rohrer-Bley, C., Rütgen, B., y Teske, E. (2018). Breed-associated risks for developing canine lymphoma differ among countries: an European canine lymphoma network study. *BMC Veterinary Research 14*. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1557-2

Comazzi, S., y Riondato, F. (2021). Flow Cytometry in the Diagnosis of Canine T-Cell Lymphoma. *Front. Vet. Sci*. https://10.3389/fvets.2021.600963

Crabtree, A.C., Spangler, E., Beard, D., y Smith, A. (2010). Diagnostic accuracy of gray-scale ultrasonography for the detection of hepatic and splenic lymphoma in dogs. *Vet Radiol Ultrasound., 51*, 661-664.

Curran, K., y Thamm, D.H.(2016). Retrospective analysis for treatment of naïve canine multicentric lymphoma with a 15-week, maintenance-free CHOP protocol. *Vet. Comp. Oncol. 14*(1), 147–155.

DiPaolo, R.J,, Glass, D.D., Bijwaard, K.E., y Shevach, E.M. (2005). CD41CD251Tcells prevent the development of organspecific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells. *JImmunol., 175*, 7135–7142.

Dachra Laboratorio. https://dachra.com.uy

Dhaliwal, R.S.,Kitchell, B.E., Ehrhart, E., Valli, V.E., y Dervisis, N.G. (2013). Clinicopathologic significance of histologic grade, P-gp, and p53 expression in canine lymphoma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 49,* 175–184.

Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., y Wood, J.L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice, 43*, 240–246.

Efferth, T., y Oesch, F. (2021). La actividad inmunosupresora de los fármacos de tipo artemisinina frente a enfermedades inflamatorias y autoinmunes. *Med Res Rev. 41*(6), 3023-3061. https://10.1002/med.21842

Elanco Laboratorio. https://.my.elanco.com

Feng, J., Wang, Z., Guo, X., Chen, Y., Cheng, Y., y Tang, Y. (2012). Prognostic significance of absolute lymphocyte count at diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *Int. J. Hematol., 95*, 143–148.

Fossati,P., y Parodi P., (2017). *Descripcion epidemiológica en pacientes oncologicos del hospital de pequeños animales en el periodo 2010-2017*. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica.

Fournel-Fleury, C., Magnol, J.P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., Bryon, P.A., y Felman, P. (1997). Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human nonHodgkin's lymphomas. *J. Comp. Pathol. 117*(1), 35–59.

Fournel-fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, l., et al. (2002). Canine T cell lymphomas: A morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Veterinary Pathology 39*, 92-109.

Frances, M., Lane, A.E., y Lenard, Z.M. (2013). Sonographic features of gastrointestinal lymphoma in 15 dogs. *J Small Anim Pract., 54*, 468-474.

Frantz, A.M., Sarver, A.L., Ito, D., Phang, T.L., Karimpour-Fard, A., Scott, M.C., Valli, V.O, Lindblad-Toh, K., Burgess, K.E., Husbands, B.D., Henson, M.S., Borgatti, A., Kisseberth, W.C., Hunter, L.E., Breen, M., O'Brien, T.D., y Modiano, J.F. (2013). Molecular Profiling Reveals Prognostically Significant Subtypes of Canine Lymphomas. *Veterinary Pathology*. https://doi:10.1177/0300985812465325

Frimberger, A. (2007). Principios de quimioterapia. En S. Ettinger, y E. Feldman, *Tratado de Medicina Interna veterinaria, enfermedades del perro y el gato* (pp.708-790). Elsevier Company.

Flood-Knapik, K.E., Durham, A.C., Gregor, T.P., Sánchez, M.D., Durney, M.E., y Sorenmo, K.U. (2013). Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Vet Comp Oncol. 11*:272–86. https://10.1111/j.1476-5829.2011.00317

Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G., y Gugliucci, B. (2001). Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *JVet Intern Med., 15*, 190-195.

Gavazza, A., Lubas, G., Valori, E., y Gugliucci, B. (2008). Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. *Vet Res Commun., 32*, 291-293.

Gelain, M.E., Mazzilli, M., Riondato, F., Marconato, L., y Comazzi, S. (2008). Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 121*, 179–188.

Glickman, L., Glickman, N., y Thorpe, R. (2000). The Golden Retriever Club of America National Health Survey. http://www.grca.org/healthsurvey.pdf

Goldner, W. (2016). Cancer-Related Hypercalcemia. *J Oncol Pract, 12*, 426-435. http://10.1200/JOP.2016.011155

Gottesman, M., Fojo, T., y Bates, S. (2002). Multidrug resistance in cancer: Role of ATP–dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer, 2*, 48–58.

Harris, L.J., Rout, E.D., Labadie, J.D., Avery, P.R., Fernandez, M., Yoshimoto, J., y Avery, A.C. (2020). Clinical features of canine nodal T-cell lymphomas classified as CD8+ or CD4− CD8− by flow cytometry. *Vet. Comp. Oncol. 18*(3), 416–427

Henry, J.B. (1996). Clinical enzymology. En J.B. Henry (ed.), *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, (pp.281–284). Saunders.

Hifumi, T., Miyoshi, N., Kawaguchi, H., Nomura, K., y Yasuda, N. (2010). Immunohistochemical detection of proteins associated with multidrug resistance to anti-cancer drugs in canine and feline primary pulmonary carcinoma. *J. Vet. Med. Sci, 72*, 665–668.

Higginbotham, M.L., McCaw,D.L, Roush, J.K., Nitfeld, J.C., Wilkerson, M.J., Re eds, K., y Burr D. (2013). Intermittent single-agent doxorubicin for the treatment of canine B-cell lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc., 49*, 357–362.

Honda, K., Ishiko, O., Tatsuta, I., et al. (1995). Anemia-inducing substance from plasma of patients with advanced malignant neoplasms. *Cancer Res,55,* 3623–3628.

Hosoya, K., Kisseberth, W.C., Lord, L.K.,Alvarez, F.J., Lara-García, A., Kosarek, C.E., London, Ch.A., y Couto, G. (2007). COAP or UW-19 Treatment of dogs with multicentric lymphoma. *J Vet Intern Med, 21*, 1355-1361.

Hosoya, K., Honda, K., Ishiko, O., Tatsuta, I., et al. (2007). Anemia-inducing substance from plasma of patients with advanced malignant neoplasms.*Cancer Res, 55*, 3623–3628.

Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Eisner, M.P., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J., Cronin, K.A., y Bethesda, M.D. (212). National Cancer Institute. *SEER Cancer Statistics Review*, 1975–2009.

Huang, S., Kozak, P. J., Kim, J., Habineza-Ndikuyeze, G., Meade, C., Guarnier-Hausser, A., Patel. R., Robertson, E., y Mason, G. (2012). Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology, 427*, 107-117.

Impellizeri JA, Howell K, McKeever KP, Crow SE. 2006. The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an exvivo evaluation. Vet J. 171:556_558.

Jark, P.C., y De Sá Rodrigues, L.C. (2022). *Neoplasias hematopoiéticas en caes e gatos*. MedVet.

Keller, E.T. (1992). Immune-mediated disease as risk factor for canine lymphoma. *Cancer, 70*, 2334–2337.

Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., y Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature, 362*, 841–844.

Kinns, J., y Mai, W. (2007). Association between malignancy and sonographic heterogeneity in canine and feline abdominal lymph nodes. *Vet Radiol Ultrasound 48*, 565–569.

Klimecki, W.T., Futscher, B.W., Grogan, T.M., y Dalton, W.S. (1994). P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood, 83*(9), 2451-2458.

Klopfleisch, R. (2016). *Hematopoietic Tumors*. Springer.

Krohne, S., Henderson, N., y Richardson, R. (1994). Prevalence of ocularinvolvement in dogs with multicentric lymphoma: prospective evaluation of 94 cases. *Vet Comp Ophthamol, 4*, 127–135.

Lana, S.E., Jackson, T.L., Burnett, R.C., Morley, P.S., y Avery, A.C. (2006). Utility of polimerase chain reaction for analysis of antigen receptor rerrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med, 20*, 329-336.

Lee, J.J., Hughes, C.S., Fine, R.L., y Page, R.L. (1996). P-glycoprotein expression in canine lymphoma: A relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer, 77*, 1892–1898.

Leifer, C.E, y Matus, R.E. (1986). Chronic lymphocytic leukemia in the dog: 22 cases (1974–1984). *J Am Vet Med Assoc 189*(2), 214–217.

Lucroy, M.D., Christopher, M.M., Kraegel, S.A., et al. (1998). Anaemia associated with canine lymphoma. *Comp Haematol Int, 8,* 1–6.

Lurie, D.M., Lucroy, M.D., Griffey, S.M., Simonson, E., y Madwell, B.R. (2004). T-cell derived malignant lymphoma in the Boxer breed. *Veterinary and Comparative Oncology, 2*, 171–175.

Madewell, B.R., y Feldman, B.F. (1980). Characterization of anemias associated with neoplasia in small animals. *J Am Vet Med Assoc, 176*, 419–425.

Marconato, L., Bonfanti, U., Stefanello, D., Lorenzo, M.R., Romanelli, G., Comazzi, S., y Zini E. (2008). Cytosine arabinoside in addition to VCAA-

based protocols for the treatment of canine lymphoma with bone marrow involvement: does it make the difference? *Vet Comp Oncol., 6*, 80-89.

Marconato, L., Crispino, G., Finotello, R., Mazzotti, S., Salerni, F., y Zini, E. (2009a). Serum lactate dehydrogenase activity in canine malignancies. *Vet Comp Oncol, 7*(4), 236–43. http://10.1111/j.1476-5829.2009.00196.x

Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., Comazzi, S., Nardi, P., Albanese, F., y Zini, E. (2009b). Association between waste management and cancer in companion animals. *J Vet Intern Med., 23*, 564-569.

Marconato, L., Crispino, G., Finotello, R., Mazzotti, S., y Zini, E. (2010). Clinical relevance of serial determinations of lactate dehydrogenase activity used to predict recurrence in dogs with lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 236*, 969–974.

Marconato, L. (2011). The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: A review of recent developments and future prospects. *Vet J, 188,* 34–38.

Marconato, L., Stefanello, D., Valenti, P., Bonfanti, U., Comazzi, S., Roccabianca, P., Caniatti, M., Romanelli, G., Massari, F., y Zini, E. (2011). Predictors of long-term survival in dogs with high grade multicentric lymphoma. *J Am Vet Med Assoc., 238*, 480-485.

Marconato, L., Gelain, M.E., y Comazzi, S.(2012). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol*.

Marconato, L., Martini, V., Aresu, L., Sampaolo, M., Valentini, F., Rinaldi, V., y Comazzi, S. et al. (2013). Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: Prognostic significance and proposal of a cut-off value. *The Veterinary Journal*.

Marconato, L., Comazzi, S., Aresu, L., Riondato, F., Stefanello, D., Ferrari, R., y Martini, V. (2019). Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow infiltration in newly-diagnosed canine nodal marginal zone lymphoma. *The Veterinary Journal, 246*, 78–84.

Martini, V., Poggi, A., Riondato, F., Gelain, M. E., Aresu, L., y Comazzi, S. (2015). Flow-cytometric detection of phenotypic aberrancies in canine small clear cell lymphoma. *Vet. Comp. Oncol. 13*(3), 281–287.

Martini, V., Marconato, L., Poggi, A., Riondato, F., Aresu, L., Cozzi, M., y Comazzi, S. (2016). Canine small clear cell/T-zone lymphoma: clinical presentation and outcome in a retrospective case series. *Vet. Comp. Oncol. 14*(1), 117–126.

Martini, V., Cozzi, M., Aricò, A., Dalla Rovere, G., Poggi, A., Albonico, F., Mortarino, M., Ciusani, E., Aresu, L., y Comazzi, S. (2017). Loss of CD45 cell surface expression in canine T-zone lymphoma results from reduced gene expression. *Vet. Immunol. Immunopathol. 187*, 14–19.

Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi,M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P.L., Sestito, V., Tanara,G., y Bocchini, V. (2008). Cancer

Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med, 22,* 976–984.

Meza, A.B., y García, L.E. (2014). Citología de linfonódulos. En N. de Buen de Arguero, *Atlas de citopatología veterinaria,* (pp. 313-329).

Milanovic, N., Matkovic, S., Ristic, D., Jelic, S., y Petrovic, M. (2012). Significance of tumor burden, vascular endothelial growth factor, lactate dehydrogenase and beta-2 microglobulin serum levels in advanced diffuse large B cell lymphoma. *Journal of the Balkan Union of Oncology, 17*, 497–501.

Miller, A.G., Morley, P.S., Rapo, S., Avery, A.C., Lana, S.E., y Olver, C.S. (2009). Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *Journal veterinary Internal Medicine, 23*, 116-122. https://10.1111/j.1939-1676.2008.0210.x

Modiano, J.F., Breen, M., Avery, A.C., y London, C.A. (2005). Breed-specific canine lymphoproliferative diseases. En E.A. Ostrander, U. Giger, y K. Lindblad-Toh (Eds.), *The Dog and its Genome* (pp. 439–450). Cold Spring HarborLaboratory Press.

Moore, P., Olivry, T., y Naydan, D. (1994). Canine cutaneous epitheliotropic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T cells. *American Journal of Pathology, 144*, 421-429.

Morgan, E., O'Connell, K., Thomson, M., y Griffin, A. (2018). Canine T cell lymphoma treated with lomustine, vincristine, procarbazine, and *prednisolone chemotherapy in 35 dogs. Veterinary* and Comparative Oncology, 16(4), 622-629.

Mizutani, N., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Uchida, K., y Tsujimoto, H. (2016). Clinical and histopathological evaluation of 16 dogs with T-zone lymphoma. *J Vet Med Sci. 78*, 1237–44. https://10.1292/jvms.15-0688

Nabhan, C., y Rosen, S. (2014). Chronic lymphocytic leukemia a clinical review. *JAMA. 312*(21), 2265– 2276.

Nelson, R.W., y Couto, C.G. (2010). Linfoma en perros y gatos. En R.W. Nelson, y C.G. Couto, *Medicina Interna de pequeños animales* (pp. 1174-1186). Elsevier.

Neuwald, E.B., Teixeira, L.V., Conrado, F.O., Da Silva, M.O., Hlavac, N.R.C., y González, F.H.D. (2014). Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. *Pesq. Vet. Bras., 34*(4), 349-354.

North, S., y Banks, T. (2009). Introduction to small animal oncology. Saunders Elsevier; p 225-229.

Owen LN, editor. 1980. TNM classification of tumours in domestic animals. 1 st. ed Geneva: Wold Health Oranization.

Pawlak, A., Ziolo, J., Kutkowska, A., Blazejczyk, J., Wietrzyk, A., Krupa, W., Hildebrand, P., Dziegiel, S., Dzimira, B., Obminska-Mrukowicz, L., y

Strzadala, A. (2016). A novel canine B-cell leukaemia cell line. Establishment, characterisation and sensitivity to chemotherapeutics. *Veterinary and Comparative Oncology*.

Pessina, P. (2011). *Carcinoma tiroideo en perros: aspectos moleculares*. Tesis Maestría. Facultad de Veterinaria. Universidad de la republica

Pinello, K.C., Santos, M., Leite-Martins, L., Niza-Ribeiro, J., y de Matos, A.J. (2017). Immunocytochemical study of canine lymphomas and its correlation with exposure to tobacco smoke. *Veterinary World, 10*(11), 1307-1313.

Ponce, F., Magnol, J.P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K., y Fournel-Fleury, C. (2004). Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *The Veterinary Journal 167*, 158–166.

Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J.P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M.L. and Fournel-Fleury, C. 2010. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. Vet. Pathol. 47(3), 414–433.

Rassnick, K.M., Mauldin, G.E., Al-Sarraf, R., Mauldin, G.N., Moore, A.S., y Mooney, S.C. (2002). MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989–2000). *Journal of Veterinary Internal Medicine 16*, 576–580.

Ratcliffe, L., Mian, S., Slater, K., King, H., Napolitano, M., Aucoin, D., et al. (2009). Proteomic identification and profiling of canine lymphoma patients. *Veterinary and Comparative Oncology, 7*, 92–105.

Rebhun, R.B., Kent, M.S., Borrofka, S.A., Frazier, S., Skorupski, K., y Rodriguez, C.O. (2011). CHOP chemotherapy for the treatment of canine multicentric T-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol., 9*, 38-44.

Rout, E.D., y Avery, P.R. (2017). Lymphoid neoplasia: correlations between morphology and flow cytometry. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 47*(1), 53–70.

Ruslander, D.A., Gebhard, D.H., Tompkins, M.B., Grindem, C.B., y Page, R.L. (1997). Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo, 11*(2), 169–172.

Sánchez-Solé, R. (2019). *Linfoma canino: clasificación inmunofenotípica y su relación con patrones hematológicos, bioquímicos y moleculares*. Tesis. Universidad de la República

Sánchez-Solé, R., Mosquillo, F., Jark, P., Breijo, M., y Pessina, P. (2021). Hematological and biochemical profiles of canine CD45- T lymphomas are different from other immunophenotypes. *Open. Vet. J. 11*(4), 734–746.

Sánchez-Solé, R., Pedreira, J.M., Venzal, C., Fonseca-Alves, y Pessina, P. (2022). The use of flow cytometry for diagnosis and immunophenotyping in chronic lymphocytic leukemia in a dog: Clinical case report.

Sanz Rivas, C. (1998). Linfomas caninos: Estudio óptico, electrónico e inmunohistoquímico. Proliferación y ploidía. Tesis doctoral.

Seelig, D.M, Avery ,A.N., Ehrhart, E.J., y Linden, M.A. (2016).The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma. *Vet sci* 3020011

Seelig, D.M., Avery, P., Webb, T., Yoshimoto, J., Bromberek, J., Ehrhart, E.J., y Avery, A.C. (2014). Canine T-zone lymphoma: unique immunophenotypic features, outcome, and population characteristics. *Journal of Veterinary Internal Medicine, 28*, 878-886

Shelton, G.H., Grant, C.K., Cotter, S.M., Gardner, M.B., Hardy, W.D., y Digiacomo, R.F. (1990). Feline inmunodeficiency virus and feline leukemia virus infection and their relationship to lymphoid malignancies in cats: a retrospective study. *J AIDS 3*, pg 623

Simon, D., Nolte, I., Eberle, N.,Abbrederis, N. ,Killich, M., y Hirschberger, J. (2006). Treatment of dogs with lymphoma using a 12-week, maintenance-free combination chemotherapy protocol. *JVet Intern Med, 20*(4), 948-954.

Smith, L.K., y Cidlowski, J.A. (2010). Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog Brain Res. 182*, 1-30.

Sokołowska, J., Urbanska, K., Gizinski, S., Zabielska, K., y Lechowski, R. (2015). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in various subtypes of canine lymphomas. *Pol. J. Vet. Sci., 18*, 123–130.

Squire, R.A., Bush, R., Mitchell, M., Edward C., Neeley, R., Lena, M., and Yarbrough, B. (1973). Clinical and Pathologic Study of Canine Lymphoma: Clinical Staging, Cell Classification, and Therapy. *Journal of the National Cancer Institute, 51* (2), 565–574.

Thamm, D.H., y Vail, D.M. (2007). Aftershocks of cancer chemotherapy: managing adverse effects. *Journal of the American Animal Hospital Association, 43*, 1–7.

Tasca, S., Carli, E., Caldin, M., Menegazzo, L., Furlanello, T., y Gallego, L.S. (2009). Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). *Vet Clin Pathol., 38*(1), 2-12. https://10.1111/j.1939 65X.2008.00099

Teng, S.P., Hsu, W.L., Chiu, C.Y., Wong, M.L., y Chang, S.C. (2012). Overexpression of P-glycoprotein, STAT3, phospho-STAT3 and KIT in spontaneous canine cutaneous mast cell tumours before and after prednisolone treatment. *Vet. J., 193*, 551–556.

Teske, E. (1994). Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet. Quart., 16*, 209–219.

Teske, E., de Vos, J.P., Egberink, H.F., y Vos, J.H. (1994). Clustering in canine malignant lymphoma. *Vet. Quart., 16*, 134–136.

Torres de la Riva, G., Hart, B.L., Farver, T.B., Oberbauer, A.M., Messam, L.L., Willits, N., y Hart, L.A. (2013). Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers. *PLoS One.8*:e55937.

Vail, D., y Thamm, D. (2007). Tumores hematopoyéticos. En S. Ettinger, y E. Feldman, *Tratado de Medicina Interna veterinaria, enfermedades del perro y el gato* (pp. 732-790). Elsevier Company.

Vail, D. y Young, K. (2007). Hematopoietic Tumors. En S. Withrow y D. Vail, Small Animal Clinical Oncology (4ª ed., pp. 699-709). St. Louis: Elsevier.

Vail, D.M., Pinkerton, M.E. y Young, K.M. (2013). Hematopoietic tumors. En S.J. Withrow, D.M. Vail, R.L. Page (Eds.), Small Animal Clinical Oncology (5ª ed. pp. 608-688). St. Louis: Elsevier.

Valli, V.E., San Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F…Vernau, W. (2011). Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organ

Valli, V.E., Vernau, W., de Lorimier, L.P., Graham, P.S., y Moore, P.F. (2006). Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol 2006, 43*, 241–256.

Valli, V.E., Kass, P.H., Myint, M.S., y Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary Pathology*. http://10.1177/0300985813478210

Veluvolu, S., Pellin, M., y Vos, N. (2021). Evaluation of neutrophilia as a prognostic factor in dogs with multicentric lymphoma treated with a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone-based chemotherapy protocol. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 259*(5), 494–502. https://doi.org/10.2460/javma.259.5.494

Vernau, W., y Moore, P.F.(1999). An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 69*, 145–164.

Villamil, J.A., Henry, C.J., Hahn, A.W., Bryan, J.N., Tyler, J.W., y Caldwell, C.W. (2009). Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol*. http://10.1155/2009/591753

Waugh, E., Gallagher, A., McAulay, A. K., Henriques, J., Alves, M., Bell, A.J., Morris, J.S., y Jarrett, R.F. (2015). Gammaherpesvirusses and canine lymphoma: no evidence for direct involvement in commonly occurring lymphomas. *J Gen Virol, 96*, 1863-1872. http://10.1099/vir.0.000106

Weller, R.E., Theilen, G.H., y Madewell, B.R. (1982). Chemotherapeutic responses in dogs with lymphosarcoma and hypercalcemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 181*, 891–893.

Winter, M.C., y Hancock, B.W.(2009). Ten years of rituximab in NHL. *Expert Opinion on Drug Safety, 8*, 223–235.

Withrow, S.J., y Macewen, E.G. (2001). *Small Animal clinical oncology*. WB Saunders Company.

Withrow, S.J., y Vail, D.M. (2007). *Oncología clínica de pequeños animales*. Elsevier.

Withrow, S.J., Vail, D.M., y Page, R.L. (2013). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier/Saunders.

Workman, H.C., y Vernau, W. (2003). Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 33*(6), 1379–1399.

Young, L.S., y Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer,4* (10), 757-768.

Zanatta, R., Abate, O., D'Angelo, A., Miniscalco, B., y Mannelli, A. (2003). Diagnostic and prognostic value of serum lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes in canine lymphoma. *Veterinary Research Communications, 27*, 449–452.

Zandvliet, M. (2016). Linfoma canino: una revisión. *Veterinary Quarterly, 36*(2), 76-104. http://10.1080/01652176.2016.1152633

Zandvliet, M.,Teske, E., y Schrickx, J.A. (2014). Multi-drug resistance in a canine lymphoid cell line due to increased P-glycoprotein expression, a potential model for drug-resistant canine lymphoma. *Toxicol. In Vitro, 28*, 1498–1506.