

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**LINFOMA CANINO T INDOLENTE: CLÍNICA, DIAGNÓSTICO Y  
PRONÓSTICO.**

POR

Mathias YANES

Francisco VICO

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

Modalidad: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO**

**URUGUAY**

**2024**

Tesis de grado aprobada por:

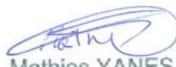
Presidente de mesa:   
Patricia Lindiman

Segundo miembro (Tutor):   
Rosina Sánchez Solé

Tercer miembro:   
Agustina Algorta

Cuarto miembro (Co-tutor):   
Florencia Mosquillo

Quinto miembro (Co-tutor):   
Paula Pessina

Autores:   
Mathias YANES

Francisco VICO  


## **AGRADECIMIENTOS**

Fue largo el camino y sin duda alguna repleto de nuevas experiencias, las mismas que nos enseñaron a apreciar, utilizar y sobre todo admirar a los profesionales que nos preceden. Como dijo Isaac Newton “Si he visto más, es porque me he parado sobre los hombros de Gigantes” Queremos agradecer a nuestras respectivas familias por estar cuando la frustración y el cansancio se hacían presentes, gracias a Melisa y Romi por comprender y apoyarnos cuando en el proceso de realización de esta tesis, el tiempo parecía escurrirse entre los dedos con reuniones largas y levemente tediosas.

Especialmente queremos agradecerle a Rosina (nuestra tutora) por la disposición, estar siempre presente, incluso cuando la vida te puso un hermoso niño en tu camino y tus prioridades estaban en ello, nunca dejaste de apoyarnos y estar ahí para nosotros, sabemos que no fue tarea fácil y de cierta manera eso (si es posible) le agrega más valor al esfuerzo brindado, gracias por compartir con nosotros tu conocimiento, experiencia, por ser paciente y no dejarnos perder el entusiasmo, por esto y más te decimos mil gracias!

También queremos agradecer a Flo en principio por tu tiempo pero también por su invaluable contribución/consejos en cuanto al proceso de redacción de esta tesis sin los cuales culminar no hubiese sido tan ameno como lo fue.

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>LISTADO DE FIGURAS</b>	5
<b>RESUMEN</b>	6
<b>SUMMARY</b>	8
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	10
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	12
2.1 Cáncer en caninos	12
2.2 Características generales del linfoma canino	13
2.3 Linfoma T indolente	17
2.4 Epidemiología	17
2.5 Diagnóstico clínico	18
2.6 Diagnóstico citológico	18
2.7 Diagnóstico por citometría de flujo	19
2.8 Histopatología e inmunohistoquímica	20
2.9 Diagnóstico paraclínico	22
2.10 Terapéutica	23
2.11 Pronóstico	24
<b>3. HIPÓTESIS</b>	26
<b>4. OBJETIVOS</b>	26
4.1 Objetivo General	26
4.2 Objetivos Específicos	26
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	27
5.1 Animales	27
5.2 Diseño experimental	27
5.3 Procesamiento de las muestras por citometría de flujo	28
5.4 Análisis hematológico	31
5.5 Bioquímica sérica	32
<b>6. RESULTADOS</b>	34
6.1 Análisis descriptivo de los datos	34
6.2 Citometría de flujo	34
6.3 Hematología	37
6.4 Bioquímica sérica	38
6.5 Proteinograma electroforético	40
<b>7. DISCUSIÓN</b>	42
<b>8. CONCLUSIONES</b>	48
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	48

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Linfonodo submandibular marcadamente aumentado de tamaño en un Golden Retriever diagnosticado con TZL.

Figura 2. Citología de linfonodo obtenida por PAF y teñida con May Grunwald-Giemsa. La población celular está compuesta mayoritariamente por linfocitos con forma de “espejo de mano”.

Figura 3. Imagen de un corte de linfonódulo normal, morfológicamente dividido en tres áreas corteza, paracorteza y médula.

Figura 4. Representación gráfica de la electroforesis capilar de proteínas de un paciente con TZL. Las diferentes fracciones proteicas (albúminas; alfa 1 globulinas, alfa 2 globulinas; beta globulinas, gamma globulinas). Una gammapatía policlonal es distinguido, caracterizado por la presencia de un pico beta-gamma de base amplia (\*).

Figura 5. Esquema del diseño experimental, donde se muestran los tipos de muestra utilizados y los estudios realizados.

Figura 6. Estrategia de gate en muestra de punción de linfonódulo. A la derecha se observa un gráfico de puntos de dispersión morfológica (dispersión frontal, FSC vs dispersión lateral, SSC) donde se encuentra seleccionada la población linfocitaria. Al medio se observa la selección de singuletes en el gráfico de puntos De FSC-A vs FSC-H. A la izquierda se observa un histograma representativo, en este caso para el marcador CD45-APC.

Figura 7. Representación gráfica de la citometría de flujo realizadas en punciones de linfonodos. (1) Gráfico de dispersión morfológica (FSC vs SSC). (2, 3) Los histogramas muestran que la población de linfocitos estudiada en todos casos fue negativa para CD45 y positiva a CD5. (4) Los *dotplot* muestran que los pacientes fueron positivos a CD3 y negativos a CD21. (5) Se observa una expresión variable respecto a los marcadores CD4 y CD8. Interpretaciones: (A) Linfoma T CD4/CD8, (B) Linfoma TCD4+, (C) Linfoma T CD8+, (D) Linfoma T CD4/CD8++.

## RESUMEN

El linfoma canino es un tumor linfoide maligno que representa del 7 al 24% del total de neoplasias en caninos y el 80% de los tumores hematopoyéticos. En los últimos años se han desarrollado distintos métodos diagnósticos para obtener un diagnóstico certero y establecer un tratamiento acorde al tipo celular que le da origen, y así lograr una mejor calidad de vida. La inmunofenotipificación por citometría de flujo se presenta como una herramienta de gran valor que colabora con el clínico en la toma de decisiones terapéuticas, así como le permite emitir un pronóstico preciso. En este sentido, el linfoma de zona T que tiene un curso clínico indolente, es el tipo de linfoma de bajo grado más común en caninos, y está caracterizado fenotípicamente por la ausencia del marcador CD45. Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la frecuencia de presentación del linfoma T indolente en los pacientes que acudieron a consulta al Hospital Escuela de la Facultad de Veterinaria entre enero del 2018 y enero del 2022. A su vez, a dichos animales se les realizaron análisis colaterales (hemograma completo, calcemia y actividad sérica de LDH, perfil renal y funcional hepático) con el fin de evaluar aspectos hematológicos y bioquímicos de esta patología. Pudimos constatar que el linfoma T indolente representó un 13% del total de los linfomas multicéntricos, con una media de edad de 9,1 años y que la raza Golden Retriever estaba sobrerrepresentada. Se observaron algunas aberraciones fenotípicas descritas en la bibliografía internacional, como la coexpresión de CD4 y CD8, así como la ausencia de expresión de ambos marcadores. Respecto a los hallazgos hematológicos, el 30% de los pacientes presentó anemia moderada normocítica-normocrómica, representando la misma una complicación frecuente en pacientes oncológicos humanos y caninos. En la serie blanca, los hallazgos más llamativos fueron leucocitosis, linfocitosis y eosinopenia (38%, 53%, y 30% de los pacientes, respectivamente). La linfocitosis es una alteración frecuentemente encontrada en perros con este fenotipo tumoral y se debe al desbordamiento de linfocitos desde el linfonodo al torrente sanguíneo. En cuanto a las alteraciones bioquímicas el 89% de los pacientes presentó valores aumentados de la enzima fosfatasa alcalina sérica, y se observaron gammapatías en 3 pacientes. A su vez, ninguno de los pacientes estudiados presentó hipercalcemia y el 38% presentó un aumento de la actividad sérica de la enzima lactato deshidrogenasa.

Este trabajo buscó contribuir con información del estado fisiológico de los pacientes que presentan TZL, ya que esta información es escasa en la bibliografía internacional.

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

## SUMMARY

Canine lymphoma is a malignant lymphoid tumor that represents 7 to 24% of all neoplasms in canines and 80% of hematopoietic tumors. In recent years, different diagnostic methods have been developed to obtain an accurate diagnosis and establish a treatment according to the cell type that gives rise to it, and thus achieve a better quality of life. Immunophenotyping by flow cytometry is presented as a highly valuable tool that collaborates with the clinician in making therapeutic decisions, as well as allowing him to issue an accurate prognosis. In this sense, T-zone lymphoma, which has an indolent clinical course, is the most common type of low-grade lymphoma in canines, and is phenotypically characterized by the absence of the CD45 marker. One of the objectives of this work was to evaluate the frequency of presentation of indolent T lymphoma in patients who attended the Teaching Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine between January 2018 and January 2022. In turn, collateral analyzes were performed on these animals (complete blood count, calcemia and serum LDH activity, renal and hepatic functional profile) in order to evaluate hematological and biochemical aspects of this pathology. We were able to confirm that indolent T lymphoma represented 13% of all multicentric lymphomas, with a mean age of 9.1 years and that the Golden Retriever breed was overrepresented. Some phenotypic aberrations described in the international literature were observed, such as the co-expression of CD4 and CD8, as well as the absence of expression of both markers. Regarding the hematological findings, 30% of the patients presented moderate normocytic-normochromic anemia, representing a frequent complication in human and canine oncology patients. In white blood cell count the most remarkable findings were leukocytosis, lymphocytosis, and eosinopenia (38%, 53%, and 30% of patients, respectively). Lymphocytosis is an alteration frequently found in dogs with this tumor phenotype and is due to the overflow of lymphocytes from the lymph node into the bloodstream. Regarding biochemical alterations, 89% of the patients presented increased values of the serum alkaline phosphatase enzyme, and gammopathies were observed in 3 patients. In turn, none of the patients studied presented hypercalcemia and 38% presented an increase in the serum activity of the lactate dehydrogenase enzyme.

This work sought to contribute with information on the physiological status of patients with TZL, since this information is scarce in the international literature.

Keywords: canine lymphoma, indolent T immunophenotype, flow cytometry, diagnosis.

## 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, Vail y Page, 2013) y el 80% de los tumores relacionados con el sistema de producción de células sanguíneas (Aniolek, Gajewski, y Ginzinski, 2014; Meza y García, 2014; Ratcliffe et al., 2009; Withrow et al., 2013). 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, Gelain y Comazzi, 2012; Seelig, Avery, Ehrhart y Linden, 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).

La clasificación inmunofenotípica usada para determinar el tipo celular responsable de la enfermedad (células B, TCD45+, o TCD45-) se correlaciona con la malignidad 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, explicado posiblemente por antecedentes genéticos de las poblaciones de perros y factores ambientales (Modiano et al., 2005; Howlader et al., 2012; Pastor et al., 2009; Ruple, Avery y Morley, 2017). 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, Gebhard, Tompkins, Grindem y Page, 1997; Calvalido et al., 2016; Pawlak et al., 2016). Sin embargo, en nuestro país, ese porcentaje se eleva y supera el 40% (Sánchez, Mosquillo, Jark, Breijo y Pessina, 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). En un estudio realizado en nuestro país, los linfomas T agresivos (CD45+) presentaron un diagnóstico más frecuente (75%), sin embargo, la importancia del diagnóstico de linfoma TCD45- se basa en su mejor pronóstico y curso clínico menos agresivo (subtipo indolente) (Ponce et al., 2004; Valli et al., 2006; Valli, Kass, Myint y Scott, 2013; Avery et al., 2014; Sánchez et al., 2021).

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Cáncer en caninos**

Los tumores o neoplasias son proliferaciones anormales de los tejidos que se inician de manera aparentemente espontánea, de crecimiento progresivo, sin capacidad de llegar a un límite definido, carente de finalidad y regulado por leyes propias más o menos independientes del organismo (Withrow y Vail, 2007). Las neoplasias pueden desarrollarse a partir de cualquier sitio anatómico y tejido del cuerpo y pueden comprometer cualquier tipo de célula (Schreiderman y Levin, 1980).

Desde el punto de vista epidemiológico el cáncer no puede considerarse como una simple enfermedad, sino más bien como una familia de desórdenes relacionados con ciertas características biológicas comunes, a saber: una población de células transformadas, con crecimiento relativamente incontrolado, invasión de tejidos normales adyacentes y diseminación a otras partes del organismo (Vogelstein y Kinzler, 2004), definen al cáncer como una enfermedad de origen genético. Si bien el proceso de oncogénesis es complejo, se ha demostrado que se produce por la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores y alteraciones en la expresión génica. Todos los genotipos tumorales comparten disfunciones de la fisiología celular que conducen a la malignidad: autosuficiencia en generar sus propios factores de crecimiento, insensibilidad a los factores inhibitorios de crecimiento, resistencia a la apoptosis, capacidad replicativa ilimitada e inmortalización, angiogénesis continua, e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000).

El cáncer es una de las causas de muerte más comunes en perros geriátricos y desafortunadamente la casuística sigue aumentando (Adams, Evans, Sampson y Wood, 2010). Hay estudios que revelan que un 45% de los perros que vivieron 10 años o más, murieron de cáncer (Bronson, 1982). El riesgo de morbilidad debido a neoplasias en caninos es de un 2,1% (Egenvall, Bonnett, Olson y Hedhammar, 2000). En nuestro país, un estudio realizado en la Facultad de Veterinaria reportó que los animales de mediana edad a viejos fueron los más afectados, siendo la

glándula mamaria el órgano más afectado seguido de la piel (Pessina, 2011). El género es otro factor a tener en cuenta. Si bien algunos autores afirman que el riesgo tumoral es similar en hembras y machos (Flores, 1986; Pessina, 2011) reveló que las hembras con cáncer están sobrerrepresentadas en Uruguay.

La predisposición genética del cáncer está modulada claramente por factores hereditarios, como lo demuestra la existencia de síndromes tumorales hereditarios bien definidos (Fearon, 1997). En perros se ha descrito al menos un síndrome de cáncer hereditario, el carcinoma renal y la dermatofibrosis nodular del Pastor Alemán (Lingaas et al., 2003).

La raza es otro factor genético vinculado a la aparición de cáncer. Existen razas de alto riesgo frente a ciertos tumores; la raza Bóxer presenta predisposición a todo tipo de tumores, así como la raza Beagle es la menos afectada por neoplasias (Withrow y Vail, 2007). Se deben considerar también factores como falta de pigmentación (carcinoma espino celular) y el tamaño y peso corporal (osteosarcoma en Gran Danés) que predispondrían a la aparición de neoplasias en caninos (Flores, 1986). Otro tipo de factores de riesgo son los de tipo extrínseco, todos aquellos que se encuentran en el medio ambiente y que podrían tener un efecto cancerígeno. En caninos, varios de estos factores ambientales han sido vinculados al desarrollo del linfoma; como estar expuestos a químicos del hogar como pinturas o solventes (Gavazza, Presciuttini, Barale, Lubas y Gugliucci., 2001), vivir en áreas industriales o cerca de incineradores de residuos (Marconato et al., 2009), la polución radiactiva, y/o los campos magnéticos. La exposición al humo de tabaco también ha sido estudiada en caninos (Pinello, Santos, Martins, Ribeiro y de Matos, 2017), y se ha encontrado un posible vínculo entre este y el comportamiento biológico de los linfomas.

## **2.2 Características generales del linfoma canino**

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), siendo 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). Debido a que, en caninos, el linfoma es un tumor espontáneo y los perros comparten un ambiente común con los humanos, exponiéndose a los mismos factores de riesgo, 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). En ambas especies la incidencia de esta neoplasia ha aumentado significativamente en las últimas décadas, por lo que se han puesto mayores esfuerzos vinculados a su diagnóstico y tratamiento (Seelig et al., 2016). La etiología del linfoma en caninos se considera multifactorial ya que no es posible identificar un único agente etiológico (Meza y García, 2014), sin embargo, además del marcado componente genético, se hace evidente la importancia de los factores ambientales antes mencionados. Hasta el momento, en los perros no se ha relacionado el desarrollo de linfoma con causas infecciosas, como ocurre en otras especies, incluido el ser humano (Müller, Ihorst, Mertelsmann y Engelhardt; 2004). En este sentido, en humanos, el desarrollo de linfoma se relaciona a la inmunodepresión, sobre todo adquirida (trasplantes y SIDA) (Sanz Rivas, 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 caninos, (Merlo et al., 2008) reportaron una incidencia del Linfoma no-Hodgkin (LNH) de 20 a 107 casos cada 100.000 perros. En el hospital de la facultad de Veterinaria, el linfoma canino representa aproximadamente el 3% del total de consultas de oncología (Pessina, 2011). El linfoma canino 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).

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 (Nelson y Couto 2010; Marconato et al., 2012). Los nódulos linfáticos afectados están marcadamente agrandados (de 5 a 10 veces su tamaño normal), indoloros y móviles. La Organización Mundial de la Salud (OMS) 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 (estadio 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 1).

Tabla 1. Clasificación de la OMS de los estadios clínicos del linfoma multicéntrico en perros (Owen, 1980).

Estadio	
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	Estadios I-III con involucración del hígado y/o bazo
V	Estadios I-IV con involucración de la médula ósea
a	Sin signos sistémicos
b	Con signos sistémicos

Otra forma de clasificar el linfoma es acorde a la velocidad con que se propaga, pudiéndose ver LNH de bajo grado, LNH de grado intermedio y LNH de alto grado (MD Anderson Cancer Center). A su vez, desde el punto de vista clínico se distribuyen en tres grupos: linfomas indolentes, linfomas agresivos y linfomas de alta agresividad, tanto para los subtipos B como T (Moreno, Casas y Moreno, 2009). En relación a la forma multicéntrica, los linfomas indolentes comprenden en torno al 10-20% de los casos, siendo el linfoma de zona T el tipo histológico más común (Valli et al., 2013; Jark et al., 2020). Los demás linfomas indolentes descritos se asocian a linfocitos B, siendo el linfoma de zona marginal el principal linfoma indolente esplénico, aunque también puede afectar los linfonódulos o el

tejido linfoide asociado a mucosas (Valli, Vernau, Lorimier, Graham y Moore, 2006; Stefanello et al., 2011). El linfoma de células del manto y el folicular presentan baja incidencia. Es bastante común que los linfomas de bajo grado se comporten de manera indolente y progresan lentamente, sin mostrar síntomas hasta que se encuentren en etapas avanzadas (Valli et al., 2006; Stefanello et al., 2011, Valli et al., 2013; Aresu et al., 2014). Este tipo de linfoma no es curable, y en caso de tratarse casi siempre recurre (Piccaluga et al., 2009).

Existen muchos tipos y subtipos histológicos de linfoma relacionados con cada fase de la ontogenia de los linfocitos T y B que da lugar a la clasificación inmunofenotípica. Cada estirpe celular se caracteriza por presentar distintos antígenos 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, CD79; permitiendo así su identificación (Aniolek et al., 2014; Aresu et al., 2014; Pawlak et al., 2016). Las herramientas para llevar a cabo la fenotipificación, son variadas e incluyen la inmunohistoquímica, la citometría de flujo y el PCR-PARR (Pawlak et al., 2014; Pinello et al., 2017). 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 (Aniolek 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; Pastor et al., 2009; Ruple et al., 2017). 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) (Moreno y Bracarense, 2007; Álvarez-Berger, Aburto, Aristi y Chávez, 2009; Neuwald et al., 2014; Sánchez et al., 2021). Aunque los resultados de dicho estudio muestran que los linfomas T agresivos fueron prevalentes (75%), la importancia del diagnóstico de linfoma T indolente se basa en su mejor pronóstico y curso clínico menos agresivo (Valli et al., 2006; Valli et al., 2013; Avery et al., 2014). Por lo antes mencionado, conocer el fenotipo tumoral resulta de vital importancia, al condicionar el tratamiento y el pronóstico de los pacientes.

### **2.3 Linfoma T indolente**

Esta variación de los linfomas de células T representa alrededor del 10 % al 20 % del fenotipo de células T y son indolentes desde el punto de vista clínico ya que como se desarrollará más adelante la sintomatología es leve o inaparente en los pacientes (Ponce et al., 2004; Valli et al., 2006; Avery et al., 2014; Jark et al., 2020). Las células claras pequeñas caninas/TZL están asociadas con la ausencia del marcador CD45 lo que se considera un sello distintivo en el diagnóstico de la enfermedad (Seelig et al., 2014; Martini et al., 2015; Martini et al., 2017). Estos se definen histopatológicamente por células pequeñas o intermedias con bajo índice mitótico. Los linfocitos tienen una “forma de espejo de mano” que invaden el paracortex y los cordones medulares mientras dejan intacta la arquitectura ganglionar (zona T) (Ponce et al., 2004; Valli et al., 2011). Los linfomas de células T CD45- generalmente muestran inmunofenotipos aberrantes, siendo el CD4-CD8- el más frecuente (Pawlak et al., 2016; Harris et al., 2020).

### **2.4 Epidemiología**

Este tipo de linfoma suele presentarse en caninos adultos, generalmente, entre los 9 o 10 años (Martini et al., 2015; Sánchez et al., 2021). Si bien no presenta predilección sexual, se ha observado una clara predilección racial en perros Golden retrievers americano y Shih-tzu (Seelig et al., 2014; Mituzani, Goto-Koshino, Takahashi, Uchida y Tsujimoto, 2016).

## 2.5 Diagnóstico clínico

Los linfomas indolentes, tal como se desprende de su nombre, se caracterizan por no producir dolencias, un aumento de tamaño de uno o más linfonódulos en un transcurso de histórico semanas a años, en animales asintomáticos o con signos discretos que aparecen en etapas avanzadas en las que se puede evidenciar apatía, fiebre, hiporexia y adelgazamiento progresivo (Valli et al., 2006; Flood Knapik et al., 2013; Aresu et al., 2014; Martini et al., 2015) (Figura 1). Inicialmente la linfadenopatía puede ser solitaria (principalmente submandibular) o regional, aunque también puede evidenciarse linfadenopatía generalizada al momento del diagnóstico (Valli et al., 2006; Mizutani et al., 2016).

Si bien el TZL es primariamente nodal, algunos trabajos describen infiltración de la médula ósea y la sangre (con o sin linfocitosis) (Martini et al., 2015; Hughes et al., 2018). En algunos pacientes puede observarse demodicosis, conjuntivitis, uveítis, cistitis y pielonefritis asociados a disfunción del sistema inmune (Flood Knapik et al., 2013; Mituzani et al., 2016).



Figura 1. Linfonodo submandibular marcadamente aumentado de tamaño en un Golden Retriever diagnosticado con TZL.

## 2.6 Diagnóstico citológico

La citología es una herramienta muy importante en el diagnóstico de los linfomas de alto grado. Sin embargo, su utilidad en los linfomas indolentes se asocia a la experiencia del citólogo para diferenciar procesos reaccionales de neoplásicos.

En este sentido, el aspecto citomorfológico de una punción de linfonódulo con predominio linfocitos pequeños a intermedios con núcleos regulares a irregulares y un citoplasma pálido con la característica forma de espejo de mano, son altamente sugestivos de los linfomas T indolentes (Valli et al., 2013) (Figura 2). Este linfoma de bajo grado, presenta bajo índice mitótico y rara vez se observan mitosis (Fournel-Fleury et al., 2002; Ponce et al., 2004). Cabe mencionar que, si bien estas características citológicas son sugestivas de TZL, no son confirmatorias ya que los linfocitos en espejo de mano también se pueden observar en hiperplasias paracorticales.

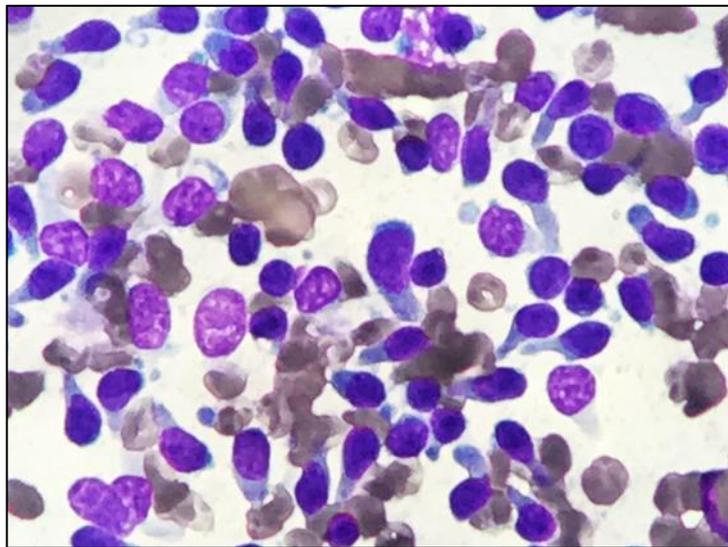


Figura 2. Citología de linfonodo obtenida por PAF y teñida con May Grunwald-Giemsa. La población celular está compuesta mayoritariamente por linfocitos con forma de “espejo de mano”.

## 2.7 Diagnóstico por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica muy importante en el diagnóstico del TZL. En este caso se observa la pérdida del CD45 junto a la marcación aberrante de otros marcadores que se analizan en conjunto. El CD45 es un marcador panleucocitario, por lo que los linfocitos deberían ser CD45+. Por lo tanto, la ausencia de marcación a CD45 en los linfomas TZL es muy utilizada para su caracterización por citometría (Martini et al., 2015). El CD45 es una proteína

transmembrana tirosina fosfatasa que participa en la regulación de diferentes procesos de maduración, activación y diferenciación de los linfocitos. La pérdida del CD45 está asociada, además, a mecanismos de evasión de la apoptosis, debido a que la galectina se une a la molécula CD45 para poder iniciar la muerte celular programada (Hernández y Baum, 2002).

Si bien la pérdida del CD45 se ha definido como un hallmark del cáncer, es decir la marca registrada de este tipo de tumor y confirma el diagnóstico de TZL, es frecuente observar aberraciones (pseudoclonalidad) en este tipo tumoral (Martini et al., 2015). Las aberraciones son marcaciones que no deberían suceder en un linfocito normal. En la ontogenia del linfocito T se parte de timocitos que son doblemente negativos a CD4- y CD8-; luego son doblemente positivos a CD4+ y CD8+ y una vez que estos linfocitos se encuentran listos para salir del timo, salen como T CD4 (colaboradores) ó T CD8 (citotóxicos). Las aberraciones más frecuentes son la coexpresión de los 2 marcadores, CD4 y CD8, en la misma población celular, o la ausencia de ambos (Martini et al., 2015; Sánchez et al., 2021). Los estudios demuestran que la mayoría de los linfomas T indolentes son CD8+, seguidos de los CD4/CD8- y CD4+ (Avery et al., 2014; Pawlak et al., 2016; Sánchez et al., 2021). Otra aberración que ha sido frecuentemente reportada es la coexpresión de marcadores de linfocitos B (CD20, CD21 o CD79a) (Avery et al., 2014; Martini et al., 2015).

La citometría de flujo también ha ayudado a estudiar la patogenia de la enfermedad ya que los TZL además de ser CD45-, muestran fuerte marcación positiva a MHC II llevando a pensar que tiene origen en linfocitos T efectores activados (Avery et al., 2014; Seelig et al., 2014).

## **2.8 Histopatología e inmunohistoquímica**

La histopatología junto a la inmunohistoquímica está definida como la técnica *gold standard* para el diagnóstico del linfoma. Sin embargo, la interpretación histopatológica también puede ser desafiante ya que la arquitectura nodal se conserva en la mayoría de los casos de TZL, sobre todo en los estadios iniciales. (Ponce et al., 2004; Valli et al., 2013). La diferenciación entre los linfomas de bajo y alto grado por histopatología tiene en cuenta el tamaño celular, el patrón de la

cromatina, el número y localización de los nucleolos, así como también el índice mitótico y la arquitectura (difusa, nodular, folicular).

En un TZL, los linfocitos neoplásicos expanden el paracortex (región de los linfocitos T en el linfonodo), alcanzando en algunos casos los cordones medulares. En ocasiones se puede alterar la arquitectura nodular dando atrofia de los folículos por la expansión excesiva del paracortex (Figura 3). En nuestro país, así como en muchos otros, la histopatología es un proceso muy poco aceptado por los propietarios, por ser un método invasivo que requiere sedación y anestesia general de los pacientes para obtener la muestra. De todas formas, puede ser necesario para el diagnóstico confirmatorio en algunos casos.

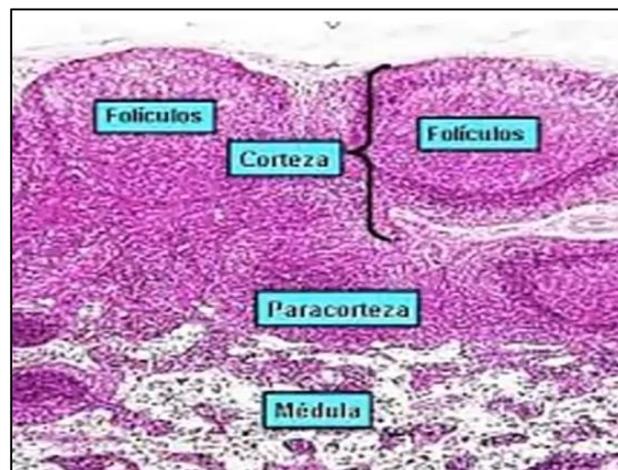


Figura 3. Imagen de un corte de linfonódulo normal, morfológicamente dividido en tres áreas corteza, paracorteza y médula.

Para evitar confusiones con el linfoma de zona marginal B, otro tipo de linfoma indolente, la histopatología debería acompañarse de inmunohistoquímica, utilizando marcadores específicos de linaje celular (CD3 para linfomas T y, CD79a, CD20 o PAX5 para los linfomas B). En los linfomas de zona T, además presentan un panel sugestivo, mostrando una marcación positiva a CD3 y negativa a CD45.

## 2.9 Diagnóstico paraclínico

Los exámenes complementarios normalmente solicitados en TZL incluyen: hemograma completo, perfil bioquímico, ecografía abdominal y radiografía de tórax. Si bien los resultados del hemograma pueden estar dentro de los parámetros normales para la especie, es posible encontrar anemia y trombocitopenia en algunos pacientes (Martini et al., 2015; Sánchez et al., 2021), pudiendo asociarse a síndromes paraneoplásicos o mieloptosis. En cuanto a la línea blanca, lo más característico es la linfocitosis madura, reportada en más del 50% de los pacientes (Seelig et al., 2014; Martini et al., 2015; Sánchez et al., 2021). Si bien sabemos que la presencia de linfocitosis no condiciona la sobrevida, tenemos que tener en cuenta la magnitud de esta linfocitosis, existiendo reportes de que recuentos de linfocitos superiores a 9212/ul se asocian a menores tiempos de sobrevida (Flood Knapik et al., 2013). Resultados de nuestro grupo de trabajo mostraron que la eosinopenia también es un hallazgo frecuentemente encontrado en perros con TZL, sin embargo, anormalidades en monocitos y neutrófilos son raros de ver (Sánchez et al., 2021).

Los exámenes bioquímicos se solicitan normalmente para evaluar el correcto funcionamiento de los diferentes órganos y tejidos de los pacientes, así como también tener monitoreado el grado de avance de la enfermedad.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que las gammapatías (concentración elevada de gamma globulinas en sangre) se observan con frecuencia en perros con TZL (Figura 4). Aunque este hallazgo puede ser paradójico, se ha descrito en varios trastornos de linfocitos B y T en humanos (Mims, 2018). Este perfil podría estar relacionado con las diferencias encontradas en los niveles de linfocitos circulantes y el papel de CD45 en la regulación del sistema inmunológico. Sin embargo, pocos informes describen variaciones en las fracciones de proteínas y ninguno considera el inmunofenotipo (Gavazza, Sacchini, Lubas, Gugliucci y Valori, 2009; Tappin et al., 2011).

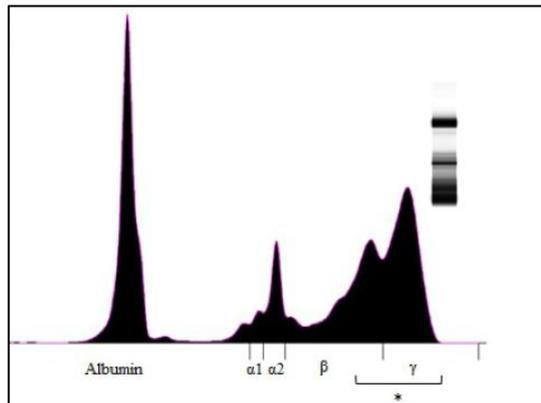


Figura 4. Representación gráfica de la electroforesis capilar de proteínas de un paciente con TZL. Las diferentes fracciones proteicas (albúminas; alfa 1 globulinas, alfa 2 globulinas; beta globulinas, gamma globulinas). Una gammapatía policlonal es distinguido, caracterizado por la presencia de un pico beta-gamma de base amplia (\*).

El examen imagenológico es importante para evaluar los linfonódulos abdominales, así como el bazo e hígado que comúnmente están afectados en pacientes con linfoma T indolente (Aresu et al., 2014; Mizutani et al., 2016).

## 2.10 Terapéutica

Hasta la fecha, la decisión del tratamiento de los TZL en la práctica clínica depende de la extensión de la enfermedad y el comportamiento de la neoplasia debido a que no hay evidencia científica sólida de que los pacientes sometidos a quimioterapia tengan mejores tiempos de supervivencia que las que no la reciben, independientemente del protocolo quimioterápico que se utilice. Por esto, en pacientes que no presentan sintomatología clínica, ni citopenias en el hemograma se sugiere el “Watchful Waiting”, que es mirar y esperar, haciendo un seguimiento clínico de estos pacientes realizando chequeos clínicos y laboratoriales periódicos (Moore, 2016).

En general, el tratamiento se implementa cuando el paciente asintomático comienza a presentar sintomatología clínica como fatiga extrema, progresión rápida con la duplicación del tamaño del linfonódulo en un transcurso de 6 meses,

con presencia de linfocitosis superior a 9200 linfocitos/ $\mu$ L teniendo en cuenta que el aumento linfocitario puede presentarse de forma abrupta entre un control y el siguiente. Otro criterio a tener en cuenta es la presentación de más de un linfonódulo mayor a 3 cm o cuando la linfadenomegalia es en un nódulo solo, pero sin un tamaño mayor a 7 cm y cuando vemos citopenias como anemia o trombocitopenia que van de la mano de la invasión de la médula ósea (mieloptisis) o cuando se ven signos de disfunción orgánica por infiltración, esplenomegalia o hepatomegalia (Moore, 2016).

Las primeras opciones de tratamiento sistémico son protocolos multidroga, combinando fármacos como el clorambucilo (o cliclofosfamida) con prednisolona, ya que es el que reporta mayores sobrevividas y menores muertes vinculadas al linfoma (Flood-Knapik et al., 2013). Otra opción es el clorambucilo como monoterapia durante dos años, pudiéndose administrar cada 48 hs (2-4 mg/m<sup>2</sup>) ó cada 14 días (20mg/m<sup>2</sup>).

En casos más agresivos se reconoce como una opción viable el protocolo CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Sin embargo, autores afirman que en algunos casos los perros con linfomas de bajo grado tienen un buen pronóstico a largo plazo y que el uso de protocolos basados en CHOP no ofrece beneficios en cuanto a la supervivencia de los pacientes (Seelig et al., 2014). Otra opción es el uso de Melphalan combinado con prednisona (Mizutani et al., 2016).

Es de importancia recordar que el linfoma T indolente no tiene cura y casi siempre son recurrentes, por lo que, a pesar del tratamiento realizado, difícilmente se logre la remisión completa. En este sentido, la limitada respuesta favorable a los tratamientos se debe a que los quimioterápicos en su mayoría están dirigidos hacia células de rápida multiplicación. Sin embargo, el linfoma T indolente no presenta multiplicación celular acelerada y no hay células blanco a las cuales atacar.

## **2.11 Pronóstico**

En general, el pronóstico de los linfomas indolentes suele ser bueno con sobrevividas que superan ampliamente a los linfomas de alto grado. Sin embargo,

aunque al principio tienen un comportamiento multicéntrico nodal, luego puede volverse difuso empeorando el pronóstico (Aresu et al., 2014), debiéndose evaluar la extensión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

### **3. HIPÓTESIS**

Los pacientes caninos con linfoma T indolente presentarán alteraciones hematológicas, bioquímicas e inmunofenotípicas.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Contribuir al conocimiento del linfoma canino T indolente.

#### **4.2 Objetivos Específicos**

Evaluar la frecuencia de presentación del linfoma T indolente (CD45-) en los pacientes que acudieron a consulta al Hospital Escuela de la Facultad de Veterinaria entre enero del 2018 y enero del 2022.

Evaluar si los parámetros hematológicos y/o bioquímicos se ven afectados por este inmunofenotipo tumoral (CD45-).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo registrándose en planillas las siguientes variables: edad, sexo, raza, signos clínicos, linfonódulos involucrados, presencia de aberraciones fenotípicas y resultados de los estudios paraclínicos realizados (hemograma completo, funcional hepático, perfil renal, calcemia, actividad sérica de LDH, proteinograma electroforético).

Todos los experimentos comprendidos en este estudio se realizaron en la Facultad de Veterinaria, UdelaR. Los procedimientos que involucraron animales contaron con el consentimiento de sus propietarios y se realizaron bajo la supervisión de los responsables de este proyecto y el oncólogo tratante. El Comité de Ética aprobó esta investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de la República (Universidad de la República) de Uruguay (CEUA FVET-801 111900-000780-19).

### **5.1 Animales**

El presente estudio incluyó todos los caninos con diagnóstico citológico de linfoma T indolente (n=13), que acudieron a consulta oncológica al Hospital de Facultad de Veterinaria entre enero del 2018 y enero del 2022. A los propietarios de estos caninos se les explicó el proyecto de investigación y se les solicitó autorización para realizar la toma de muestras.

### **5.2 Diseño experimental**

A cada paciente se le extrajo una muestra de sangre y una biopsia de linfonódulo que se dividieron en 2 submuestras (Figura 5).

Las muestras de sangre se extrajeron de la vena cefálica, con agujas 21G. Dichas muestras se colocaron en tubos con EDTA para la realización de hemogramas completos y en tubo seco para la evaluación del funcional hepático, perfil renal, proteinograma electroforético y la determinación de la calcemia y de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en suero.

Las punciones de linfonódulos se obtuvieron por la técnica de punción aspiración con aguja fina (PAAF) (Marconato et al., 2012), utilizando una jeringa de 5 ml y

una aguja hipodérmica de 21G. La muestra extraída se colocó en un tubo eppendorf con EDTA y 1 ml de PBS (1X a pH 7.4). Este material se transportó refrigerado hasta el laboratorio y fue analizado en un citómetro de flujo (BD, “BIOSCIENCES” Accuri C6). El fenotipo de los linfomas se determinó dentro de las primeras 12 horas de extraída la muestra y se utilizaron marcadores específicos que participan en la diferenciación linfoide: CD3, CD4, CD5, CD8, CD21, CD34 y CD45 (Aniolek et al., 2014; Martini et al., 2015). También se utilizó el marcador MHC-II (complejo mayor de histocompatibilidad) en 6 perros ya que este marcador se incorporó cuando la tesis estaba en ejecución. Se consideró un mínimo de 65% de positividad a cada marcador para considerar la población positiva. Paralelamente, se obtuvo otra punción para citología.

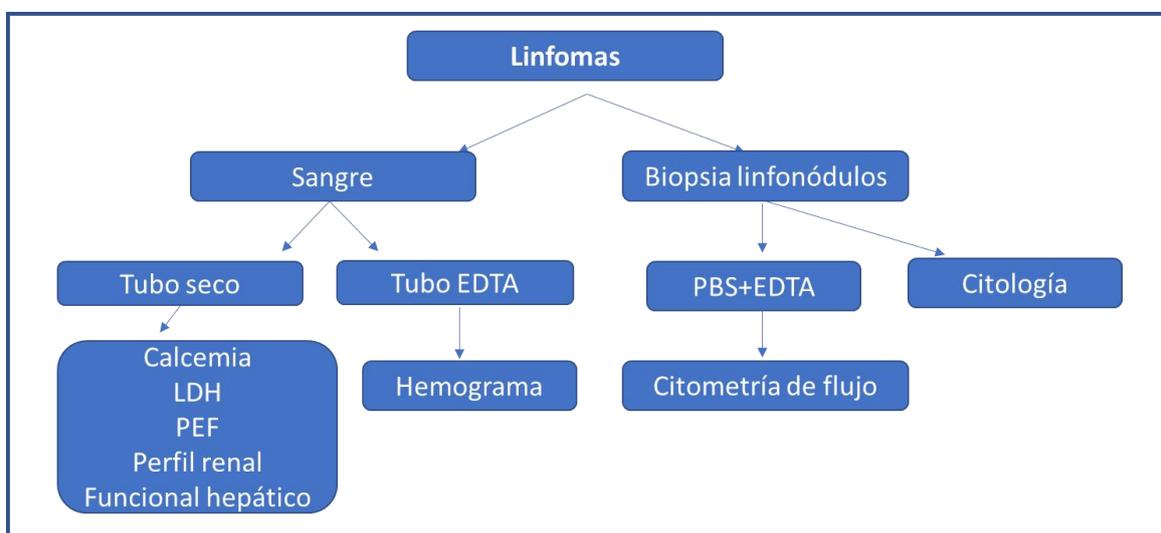


Figura 5. Esquema del diseño experimental, donde se muestran los tipos de muestra utilizados y los estudios realizados.

En este estudio se presentan datos de 13 pacientes caninos con diagnóstico de linfoma T indolente. No obtuvimos datos del perfil renal y hepático de 4 pacientes, así como no contamos con datos de proteínas totales, albúmina y globulinas de un perro y el PEF de otros 3.

### 5.3 Procesamiento de las muestras por citometría de flujo

La adquisición de los datos se realizó en el citómetro de flujo de la Facultad de Veterinaria Accuri C6 según lo descrito por nuestro grupo de trabajo (Sánchez et al., 2021).

En primer lugar, se configuró la estrategia de *gate* (zonas lógicas de interés), basada en el tamaño y la granularidad de los linfocitos en un gráfico de puntos (*dot plot*) FSC vs SSC. Se estableció un umbral de residuos (*debris*) para eliminar los eventos que tienen propiedades de dispersión frontal y lateral bajas (*threshold* 600.000 en FSC-H). La adquisición de todas las muestras se realizó en modo *slow* para garantizar que las células pasen de a una frente al haz de láser y sean debidamente excitadas. Además, se configuró un gráfico para eliminar dupletes (FSC-H vs FSC-A), de modo que sólo se tuvieron en cuenta los singuletes (Figura 6).

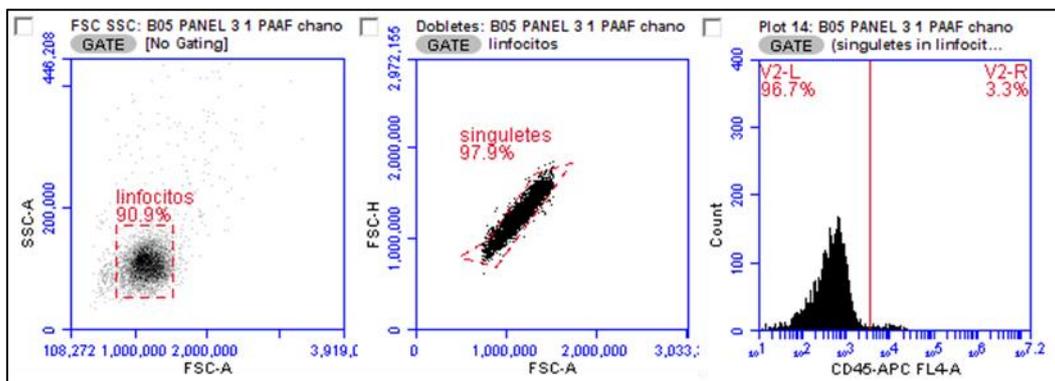


Figura 6. Estrategia de gate en muestra de punción de linfonódulo. A la derecha se observa un gráfico de puntos de dispersión morfológica (dispersión frontal, FSC vs dispersión lateral, SSC) donde se encuentra seleccionada la población linfocitaria. Al medio se observa la selección de singuletes en el gráfico de puntos De FSC-A vs FSC-H. A la izquierda se observa un histograma representativo, en este caso para el marcador CD45-APC.

El panel de anticuerpos conjugados con fluorocromos utilizados para la caracterización de las poblaciones celulares se determinó en base a su disponibilidad comercial, a su reactividad contra poblaciones de leucocitos caninos, al rango de espectro de luz en el cual se excita su marcador y por la capacidad del citómetro de registrar su emisión de luz. Los paneles de trabajo fueron los siguientes: panel 1 (CD5, CD34), panel 2 (CD45, CD3, CD21), panel 3 (CD4, CD8), y panel control (sin tinción). En 6 pacientes se realizó un panel extra con anticuerpos anti MHC-II.

Para evitar la muerte celular o una menor intensidad de expresión de algunos marcadores de superficie, las muestras para citometría fueron procesadas dentro

de las 12 horas de extraídas (Jalla et al., 2004). En primer lugar, se realizó un conteo absoluto de células vivas utilizando el citómetro de flujo y los linfocitos se obtuvieron a partir de 50 µl de sangre entera o de punciones de linfonódulos alcanzando una concentración óptima de 500.000 a 1.000.000 células totales (Suárez, del Valle Pérez, Dominguez y Macías Abraham, 2015). Posteriormente se evaluó la viabilidad celular utilizando Ioduro de propidio (10 µg/ml, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), no incluyendo en el estudio muestras con una positividad superior al 20%, es decir se trabajó con una viabilidad celular superior al 80%. La sensibilidad de esta técnica es superior a  $1 \times 10^{-4}$  es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10.000 células normales (Suárez et al., 2015). Con el fin de realizar la fenotipificación de las muestras provenientes de caninos con linfoma, se adquirieron un mínimo de 5000 linfocitos y se utilizaron anticuerpos primarios específicos para la especie canina dirigidos contra antígenos de diferenciación celular (Tabla 2): CD34 (células madres), CD45 (panleucocitario), CD3 y CD5 (linfocitos T), CD4 (linfocitos T helper), CD8 (linfocitos T citotóxico), CD21 (linfocitos B maduros), y MHC-II (complejo mayor de histocompatibilidad tipo II). La incubación de todos los anticuerpos se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (BIORAD), en un ambiente oscuro durante 45 minutos y a temperatura ambiente. A continuación, se realizó la lisis de glóbulos rojos, utilizando 1 ml de buffer de lisis (Quiklysis, Visur), en oscuridad durante 10 minutos. Una vez completada la lisis, las células nucleadas estuvieron prontas para ser adquiridas. Las muestras se analizaron siempre en duplicado y junto a un tubo sin marcación que se usó como control negativo.

Los fenotipos aberrantes se definieron a partir de la disminución o ausencia de expresión de antígenos pan-leucocitarios (CD45), la co-expresión de antígenos de diferentes líneas celulares, la expresión simultánea o expresión nula de CD4 y CD8 en linfocitos T, o la expresión de CD34 (Comazzi y Gelain, 2011; Martini et al., 2015).

Tabla 2. Listado de anticuerpos y fluorocromos empleados.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Especificidad</b>
CD34	RPE	Células madre hematopoyéticas
CD45	APC	Panleucocitario
CD3	FITC	Linfocitos T
CD5	FITC	Linfocitos T
CD4	FITC	Linfocitos T colaboradores
CD8	PE	Linfocitos T citotóxicos
CD21	PE	Linfocitos B
MHC-II	FITC	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II

#### **5.4 Análisis hematológico**

El hemograma fue realizado en un contador hematológico automatizado (Mythic 18 Vet Hematology Analyzer, Orphée). El frotis de sangre se realizó al momento de recibida la muestra y fue utilizado para realizar el conteo diferencial de glóbulos blancos así como para la evaluación de la morfología celular, mediante su observación en el microscopio por los técnicos del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria.

Se definió anemia cuando el recuento de glóbulos rojos, el hematocrito y la concentración de hemoglobina, se encontraban por debajo del rango de referencia (Tabla 3). Acorde a lo definido por Tasca et al., 2009, se clasificó a la anemia como leve cuando los valores estuvieron entre  $4.6$  a  $5.95 \times 10^6$  eritrocitos/ $\mu\text{L}$ , moderada cuando estuvieron entre  $3.0$  a  $4.6 \times 10^6$  eritrocitos/ $\mu\text{L}$ , y severa cuando estuvieron entre  $2.3$  a  $3.0 \times 10^6$  eritrocitos/ $\mu\text{L}$ . Para clasificar la anemia, también se utilizaron los índices de Wintrobe (volumen corpuscular medio, MCV; hemoglobina corpuscular media, MCH; concentración de hemoglobina corpuscular media, MCHC). Las anomalías en los leucocitos y

plaquetas se definieron cuando los valores de los mismos no estaban incluidos en el rango de referencia. Los pacientes que presentaron agregados plaquetarios, no se incluyeron en el análisis.

Tabla 3. Valores de referencia de las variables hematológicas. Tomado de Oregon State University (OSU) veterinary Diagnostic Laboratory.

<b>Variable</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor de referencia</b>
Leucocitos	μL	6000 - 17000
Linfocitos	μL	1000 - 4800
Neutrófilos	μL	3000 - 11400
Monocitos	μL	150 - 1350
Eosinófilos	μL	100-750
Basófilos	μL	0-140
Plaquetas	μL	200.000 - 900.000
Eritrocitos	millones/μL	5,5 - 8,5
Hemoglobina	g/dL	12 - 18
Hematocrito	%	37 - 55
MCV	fl	60 - 77
MCH	pg	19,5 - 24,5
MCHC	g/dL	33 - 36

### **5.5 Bioquímica sérica**

El perfil renal (urea y creatinina), el funcional hepático (albúmina, globulina, proteínas totales, GOP, GPT, colesterol, bilirrubina total, fosfatasa alcalina), la calcemia y la actividad de la LDH se determinaron a partir del suero de los pacientes con el equipo semiautomático, CB 350i (Wiener lab Group). Las gammapatías se exploraron por electroforesis capilar (Minicap, Sebia, Barcelona,

España). Las fracciones proteicas fueron albúmina y alfa 1, alfa 2, beta y gamma globulinas. Los rangos de referencia utilizados fueron proporcionados por laboratorios de diagnóstico veterinario Oregon state University-OSU y a partir de ellos se definieron anomalías (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de referencia de las variables bioquímicas. Tomado de Oregon State University (OSU) veterinary Diagnostic Laboratory.

<b>Variable</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor de referencia (OSU)</b>
Proteínas totales	g/dl	5.7-7.6
Albúmina	g/dl	3.1-4.2
Globulinas	g/dl	
Alfa 1 globulinas	g/dl	0.1-0.4
Alfa 2 globulinas	g/dl	0.4-1.0
Beta globulinas	g/dl	0.5-2.4
Gamma globulinas	g/dl	0.3-1.2
GOT	UI/L	18-56
GPT	UI/L	20-98
Fosfatasa alcalina	UI/L	17-111
Colesterol	mg/dl	150-275
Bilirrubina total	mg/dl	0.0-0.5
Urea	mg/dl	21.42-64.28
Creatinina	mg/dl	1.0-2.0
Calcio	mg/dl	5.7-11.4
LDH	UI/L	30-286

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Análisis descriptivo de los datos**

Fueron considerados en este estudio 100 pacientes caninos con linfoma multicéntrico, de los cuales 13 presentaron el subtipo linfoma de zona T (TZL), representando un 13% del total. La edad promedio de estos últimos fue 9.1 años (rango 6 – 14 años). El grupo estuvo constituido por 9 machos (2 castrados y 7 enteros) y 4 hembras castradas. Las razas se distribuyeron de la siguiente forma: 8 Golden Retrievers (61%), 2 Beagles (15%), 2 Cruzas (15%) y un Bullmastiff (7.7%).

### **6.2 Citometría de flujo**

De los 100 pacientes diagnosticados con linfoma a los que se les realizó inmunofenotipificación por citometría de flujo en el periodo de estudio, 12 presentaron un fenotipo compatible con TZL (Figura 7). El mismo se caracteriza por presentar marcación negativa a CD45 (92.3%) y ser positivo a los antígenos específicos de estipe celular T CD3 y CD5, con la excepción de un paciente que no logró un porcentaje de positividad para declararlo positivo a CD3, pero sí expresó dicho marcador. Por otra parte, un paciente presentó marcación positiva a CD45 pero debido a su comportamiento clínico se lo clasificó como indolente. Todos los pacientes presentaron resultado negativo para los marcadores CD34 y CD21. En cuanto a las aberraciones encontradas, 4 de los 13 perros con TZL fueron doble negativos a CD4/CD8; un paciente doble positivo a CD4 y CD8 y otro paciente que presentó 2 poblaciones con expresión de CD4 y CD8, respectivamente. Dentro de los pacientes con inmunofenotipo normal, 4 se originaron en linfocitos T colaboradores (CD4+) y, 3 en linfocitos T citotóxicos (CD8+) (Tabla 5). De los 13 pacientes sólo a 6 se les realizó MHC-II siendo positivo en todos los casos (100%).

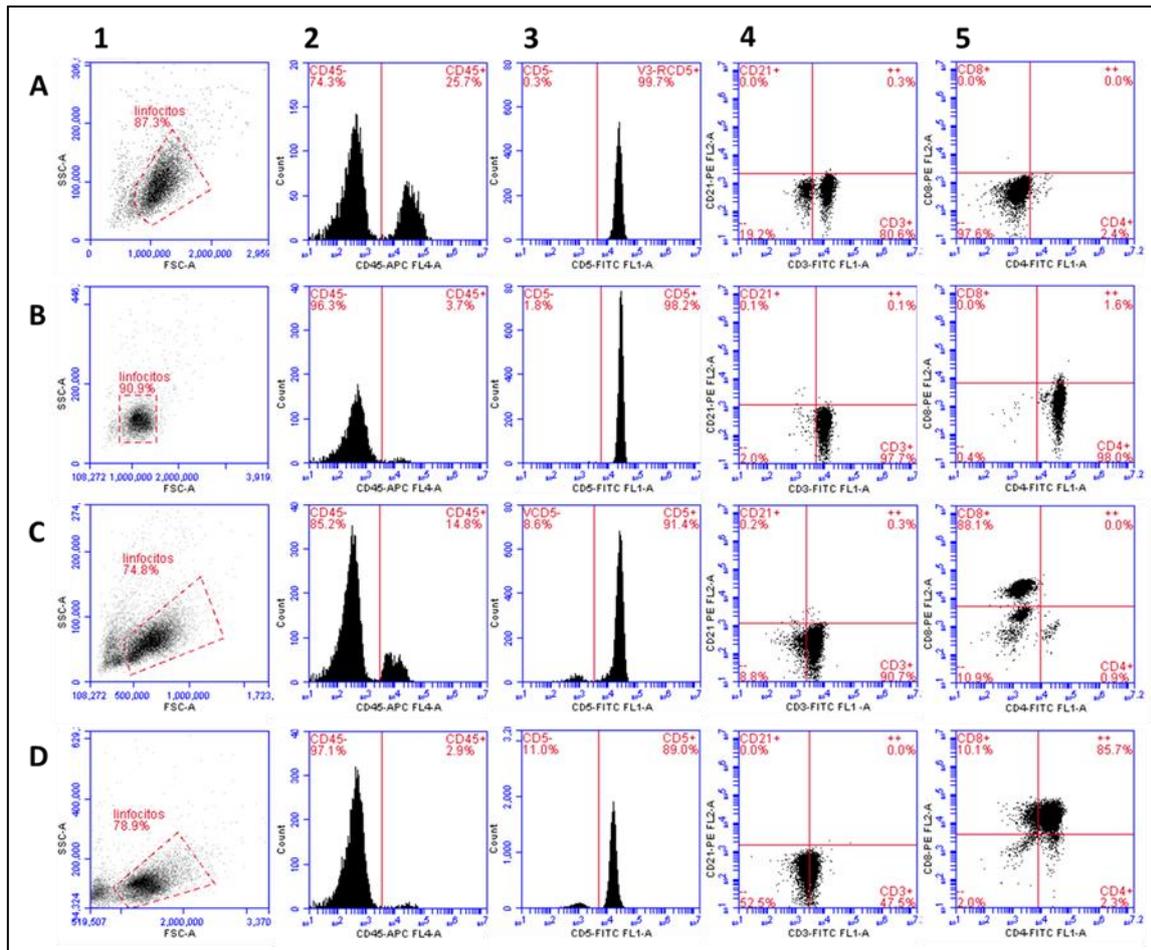


Figura 7. Representación gráfica de la citometría de flujo realizadas en punciones de linfonodos. (1) Gráfico de dispersión morfológica (FSC vs SSC). (2, 3) Los histogramas muestran que la población de linfocitos estudiada en todos casos fue negativa para CD45 y positiva a CD5. (4) Los *dot/plot* muestran que los pacientes fueron positivos a CD3 y negativos a CD21. (5) Se observa una expresión variable respecto a los marcadores CD4 y CD8. Interpretaciones: (A) Linfoma T CD4/CD8-, (B) Linfoma T CD4+, (C) Linfoma T CD8+, (D) Linfoma T CD4/CD8++.

Tabla 5. Características de la población e inmunofenotipado por citometría de flujo de poblaciones neoplásicas identificadas en aspirados de ganglios linfáticos de 13 perros con linfoma multicéntrico T indolente.

ID	Sexo	Raza	Edad (años)	CD45	CD34	CD21	CD3	CD5	CD4	CD8	MHC-II	Fenotipo
1	H	Beagle	7	-	-	-	+	+	-	-		T CD45- CD4-/CD8-
2	M	Golden Retriever	8	-	-	-	+	+	-	-		T CD45- CD4-/CD8-
3	H	Yorkshire	14	-	-	-	+	+	-	+		T CD45- CD4-/CD8-
4	H	Bull Mastif	6	-	-	-	+	+	-	-		T CD45- CD4-/CD8-
5	M	Golden Retriever	10	-	-	-	+	+	+	-		TCD45- CD4+
6	M	Golden Retriever	8	-	-	-	-	+	+	-	+	TCD45- CD4+
7	M	Golden Retriever	12	-	-	-	-	+	+	+		TCD45- CD4+/CD8+
8	M	Golden Retriever	8	-	-	-	+	+	-	+/-		T CD45-
9	H	Golden Retriever	10	-	-	-	+	+	-	+	+	T CD45- CD8+
10	M	Golden Retriever	7	+	-	-	+	+	+	-	+	T CD45+ CD4+
11	M	Beagle	10	-	-	-	+	+	-	+	+	T CD45- CD8+
12	M	Golden Retriever	9	-	-	-	+	+	+	-	+	TCD45- CD4+
13	M	Cruza	10	-	-	-	+	+	-	+	+	TCD45- CD8+

*+*: indica positividad en más del 65% de las células neoplásicas;

*-*: indica negatividad en más del 65% de las células neoplásicas;

*+/-*: indica positividad en más del 20% y menos del 65% de las células neoplásicas.

### **6.3 Hematología**

De la lectura de los hemogramas se desprende que 4 pacientes con TZL presentaron anemia (30%), normocítica-normocrómica en todos los casos. Acorde a la gravedad de las mismas, todas fueron clasificadas como moderadas.

Respecto a la serie blanca, 5 pacientes presentaron leucocitosis (38%). En cuanto al recuento de linfocitos, 7 pacientes presentaron linfocitosis (53%). Los eosinófilos de 4 pacientes en estudio estuvieron por debajo del límite inferior de referencia para la especie (30.7%), mientras que 1 paciente presentó eosinofilia (7.7%). En cuanto al recuento monocitario también se obtuvieron resultados dispares, presentando 2 pacientes monocitopenia (15%) y 1 paciente monocitosis (7.7%). Todos los pacientes en estudios presentaron sus valores de neutrófilos dentro de la normalidad y 1 solo paciente presentó trombocitopenia (7.7%). Los promedios de las variables hematológicas se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de referencia, promedios y desvíos de los hemogramas realizados a los pacientes en este estudio.

<b>Variable</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desvío estándar</b>	<b>Valor de referencia</b>
<b>Leucocitos</b>	18.428	11.735	6.000 - 17.000 $\mu$ L
<b>Linfocitos</b>	10.554	10.494	1.000 - 4.800 $\mu$ L
<b>Neutrófilos</b>	6.914	2.607	3.000 - 11.400 $\mu$ L
<b>Monocitos</b>	610	388	150 - 1.350 $\mu$ L
<b>Plaquetas</b>	374.750	166.080	200.00 - 900.000 $\mu$ L
<b>Eritrocitos</b>	6,1	1,5	5,5 - 8,5 millones/ $\mu$ L
<b>Hemoglobina</b>	14,8	3,3	12 - 18 g/dL
<b>Hematocrito</b>	41%	8,80%	37 % - 55 %
<b>VCM</b>	65	10,8	60 - 77 fl
<b>HCM</b>	24,48	1,57	19,5 - 24,5 pg
<b>CHCM</b>	35,7	3,63	33 - 36 g/ dl

## 6.4 Bioquímica sérica

### *Calcemia y LDH*

Los resultados de la bioquímica sérica no mostraron variación en la concentración de calcio total en ninguno de los pacientes estudiados. Sin embargo, la actividad sérica de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se vió

afectada por el linfoma, presentando en 5 de los pacientes valores por encima del rango de referencia (38%).

#### *Perfil Renal*

Los resultados del perfil renal corresponden a los 9 pacientes con TZL que se realizaron este estudio. En todos ellos, los valores de urea se ubican dentro del rango normal para la especie. Sin embargo, la creatinina estuvo disminuida en 4 de los pacientes (44%).

#### *Perfil hepático*

Al igual que lo ocurrido en el perfil renal, contamos con los resultados de funcional hepático de 9 pacientes con TZL. Cabe destacar, que los valores de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT/ex GPT) y aspartato aminotransferasa (AST/ex GOT) del perfil hepático se ubicaron dentro del rango de referencia de especie utilizado por el laboratorio en todos los perros.

Por otro lado, la fosfatasa alcalina presentó valores elevados en 8 pacientes (89%), mientras que un perro obtuvo valores normales (11%).

Por su parte, los valores de bilirrubina total se encontraron normales en 8 perros (89%), y uno presentó un valor superior al rango normal (11%).

En cuanto al colesterol, los resultados fueron variados; un paciente presentó hipercolesterolemia (11,1%), 7 pacientes se mantuvieron normales (77,7%) y 1 presentó valores por debajo del límite inferior (11,1%). Los promedios de las variables de bioquímica sérica se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de referencia, promedios y desvíos de la bioquímica sérica realizada a los pacientes en este estudio.

<b>Variable</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desvío estándar</b>	<b>Valor de referencia</b>
Calcio	9,88	0,53	5.7-11.4 mg/dL
LDH	292,85	353,26	30-286 UI/L
Urea	29,98	13,00	21,42-64,28 mg/dL
Creatinina	0,91	0,16	1.0-2.0 mg/dL
ALT (ex GPT)	35,00	12,81	20-98 UI/L
AST (ex GOT)	29,38	11,08	18-56 UI/L
Fosfatasa A	292,00	393,79	17-111 UI/L
Bilirrubina total	0,14	0,12	0.0-0.5 mg/dL
Colesterol	199,78	71,34	150-275 mg/dL

### **6.5 Proteinograma electroforético**

Se contó con el proteinograma electroforético de 10 pacientes, encontrándose las proteínas totales aumentadas en 2 de ellos. Con respecto a la concentración de albúmina, se observó hipoalbuminemia en 2 pacientes (20%). Además, 6 pacientes presentaron hiperglobulinemia. Al estudiar las fracciones de las globulinas encontramos que la concentración de los alfa 1, alfa 2 y beta globulinas fueron normales en todos los pacientes, mientras que 3 de ellos mostraron gammapatía (30%). Los promedios de las variables obtenidas en el proteinograma electroforético se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de referencia, promedios y desvíos del proteinograma electroforético realizado a los pacientes en este estudio.

<b>Variable</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desvío estándar</b>	<b>Valor de referencia</b>
Proteínas totales	6,94	0,63	5.7-7.6 g/dL
Albúmina	3,27	0,33	3.1-4.2 g/dL
Globulina	3,64	0,69	-
Alpha 1	0,25	0,07	0.1-0.4 g/dL
Alpha2	0,62	0,21	0.4-1.0 g/dL
Beta	1,63	0,34	0.5-2.4 g/dL
Gamma	1,15	0,63	0.3-1.2 g/dL

## 7. DISCUSIÓN

En caninos, el linfoma representa una de las neoplasias malignas más comunes, siendo la forma multicéntrica o generalizada la presentación más frecuente (Marconato et al., 2012). El diagnóstico clínico de linfoma multicéntrico se confirma mediante la evaluación de aspirados con aguja fina de los nódulos linfáticos por citología, arribando al diagnóstico en el 90% de los linfomas de alto grado (Marconato et al., 2011; Valli et al., 2013). Sin embargo, la citología requiere de técnicas complementarias para distinguir entre linfomas de bajo grado e hiperplasias reactivas (Jark y De Sá Rodrigues, 2022). En este sentido, la clasificación inmunofenotípica mediante citometría de flujo permite determinar el tipo celular responsable de la enfermedad (células B, T CD45+, o T CD45-). Dentro de los linfomas T, la mayoría son CD4+ CD45+, de alto grado, mientras que una minoría suelen ser CD4+ CD45- (linfomas T indolentes) (Avery et al., 2014). Nuestro estudio comprende a los linfomas T indolentes (T zone lymphoma, TZL), que representaron un 13% del total de linfomas multicéntricos en nuestro país, lo que es similar a lo reportado en la bibliografía internacional (Valli et al., 2006; Martini et al., 2015; Jark et al., 2020; Sánchez et al., 2021). Este tipo de linfoma ha sido reportado como el más común de los clínicamente indolentes, alcanzando el 61.7% del total de los mismos (Flood Knapik et al., 2013).

Si bien el TZL puede desarrollarse en cualquier raza o cruce se ha visto una clara predilección en el Shih Tzu y el Golden Retriever Americano, habiéndose detectado en éstos últimos una falta de expresión génica del CD45 (Seelig et al., 2014; Mizutani et al., 2016; Hughes et al., 2018). Se ha planteado la posibilidad de que los Golden Retriever presenten un estado preneoplásico de TZL, ya que el 31% de los adultos aparentemente sanos (sin evidencias de linfoma o leucemia) presentaron linfocitos sanguíneos CD45- (Hughes et al., 2018). En nuestro estudio enfocado en TZL, pudimos ver que la mayoría de los pacientes son de la raza Golden Retriever (8 de los 13 pacientes, representando el 65.5 % de los casos), lo cual demuestra una fuerte predisposición racial, coincidiendo con los estudios internacionales previos. Hay reportes que indican que 1 de cada 8 Golden Retriever desarrollarán linfoma a lo largo de su vida (Glickman, Glickman y Thorpe, 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 lo que es hasta 3 veces mayor que en linfomas T o B de alto grado (Valli et al., 2013; Seelig et al., 2014). 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; Dr. Víctor Domingo, comunicación personal). Otras de las razas comprendidas en esta tesis también habían sido mencionadas en la literatura, como los Yorkshire, los Bullmastiff y los perros cruza (Martini et al., 2016).

El promedio de edad de los caninos con TZL incluidos en esta tesis fue de 9.16 años, con un rango de 6 a 14 años, coincidiendo con la bibliografía internacional (Seelig et al., 2014; Martini et al., 2015; Jark et al., 2020). Si bien, en general esta neoplasia se presenta en perros que rondan los 10 años de edad, un estudio mostró que un 15% de sus pacientes eran menores de 5 años (Jark et al., 2020), lo que demuestra que no se puede descartar en animales más jóvenes.

Tal como se mencionó anteriormente, los TZL presentan la característica de no expresar el antígeno CD45, lo que ha sido definido como una aberración y un *hallmark* del cáncer (Seelig et al., 2014; Martini et al., 2015). En nuestro trabajo 12 de los 13 perros presentaron ausencia de esta marcación, sin embargo uno de ellos fue CD45+. Este paciente se clasificó como indolente por presentar un comportamiento clínico acorde, y debido a que pudimos realizarle el estudio del índice de proliferación Ki67 y los resultados fueron compatibles con linfoma de bajo grado (Poggi et al., 2017). Además, cabe resaltar que hay casos descritos de TZL CD45+, aunque en general no superan el 5% de los casos (Martini et al., 2015).

Por otra parte, existe un reporte de caso clínico de un canino con linfoma inmunofenotípicamente compatible con linfoma de zona T (CD45-) pero de células intermedias y diagnóstico histopatológico de linfoma de alto grado con un alto índice mitótico (periférico de células T no especificado-PTCL-NOS) (Parachini-Winter, Carioto y Gara-Boivin, 2019). Esto destaca la importancia de combinar modalidades de diagnóstico complementarias en el complejo proceso de subtipificación del linfoma canino, además de sugerir la existencia de pacientes que cursan linfomas de diferentes características al mismo tiempo.

Otra de las aberraciones descritas en el TZL es la doble negatividad a CD4 y CD8, lo que ocurrió en 4 de nuestros pacientes. Esta es la aberración que se observa con mayor frecuencia en el TZL (Comazzi y Gelain, 2011; Avery et al., 2014; Pawlak et al., 2014; Seeling et al., 2014; Martini et al., 2016). Hay estudios en los que se muestra que los ratones transgénicos sin CD45 presentaron una menor capacidad para madurar de células T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> a células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, lo que podría dar un indicio del por qué de la presencia de CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> en pacientes CD45<sup>-</sup> (Byth et al., 1996). También se observó un paciente doble positivo a CD4 y CD8 y otro paciente que presentó 2 poblaciones con expresión de CD4 y CD8, respectivamente. La marcación positiva a CD21 es otra aberración destacada en los trabajos sobre TZL consultados (Martini et al., 2016; Hugues et al., 2016; Avery et al., 2014; Seelig et al., 2014). Sin embargo, en éste trabajo no encontramos esta aberración en ninguno de nuestros pacientes.

En cuanto al MHC II, los 6 pacientes estudiados mostraron resultados similares a los reportados en la literatura internacional (Avery et al., 2014; Deravi, Berke, Woods y Bienzle, 2017; Harris et al., 2020). Tanto el linfoma B como el TZL se asocian a altos niveles de expresión de MHC II y la baja expresión de MHC-II en LB (linfocitos B) ha demostrado ser un fuerte predictor de mal pronóstico (Rao et al., 2011; Avery et al., 2014; Seelig et al., 2014).

El perfil hematológico y la bioquímica sanguínea en caninos diagnosticados con linfoma presentan una variedad de alteraciones que carecen de especificidad (Gavazza, Lubas, Valori y Gugliucci, 2008). La lectura de los hemogramas reveló anemia en un 30% de los pacientes, normocítica-normocrómica en todos los casos. Acorde a la gravedad de las mismas, todas fueron clasificadas como moderadas. La anemia observada en nuestros pacientes es consistente con Tasca et al., 2009, quienes consideran esta alteración hematológica como una complicación frecuente en pacientes caninos oncológicos y en el linfoma en particular, se asocia a la naturaleza sistémica de este tumor (Miller et al., 2009). Un paciente con anemia presentó bilirrubina elevada, y valores de proteínas totales elevados a base de globulinas, lo que podría sugerir la presencia de una anemia hemolítica. Si bien los porcentajes de anemia difieren entre los trabajos, se observa que es un hallazgo común en este tipo de patologías. (Martini et al.

2016) encontró que el 9.1% de los perros con TZL tenían anemias leves, sin embargo este porcentaje asciende al 54% en el trabajo de ( Seelig et al. 2014).

En este estudio se determinó que el 38% de los pacientes con TZL presentaron leucocitosis, y el 53% linfocitosis. Estudios anteriores han demostrado que la linfocitosis madura es un hallazgo común en TZL indolentes, superando el 50% de los perros en todos los casos (Flood-Knapik et al., 2013; Avery et al., 2014; Seelig et al., 2014; Martini et al., 2016). Como es sabido, los linfocitos que dan origen a este tipo tumoral presentan la característica de evadir la apoptosis por falta de expresión del CD45. Debido a esto pueden vivir por largos periodos de tiempo dentro del nódulo linfático haciendo que aumente de tamaño hasta que ocurre el fenómeno conocido como overspill o desbordamiento de linfocitos al torrente sanguíneo, explicando así la linfocitosis (Hernandez y Baum, 2002; Seelig et al., 2014; Martini et al., 2016).

Poco se sabe del vínculo entre el TZL y los recuentos de eosinófilos. Sin embargo, nuestros resultados mostraron eosinopenia en el 30.7% de los perros, mientras que un paciente presentó eosinofilia. En cuanto al recuento monocitario también se obtuvieron resultados dispares, presentando 2 pacientes monocitopenia (15%) y 1 paciente monocitosis (7.7%).

La hipercalcemia es un síndrome paraneoplásico frecuentemente hallado en perros con linfomas, asociado con enfermedad maligna avanzada (Ruslander et al., 1997; Marconato et al., 2011; Valli et al., 2013; Aresu et al., 2014; Harris et al., 2020). La hipercalcemia se debe a la producción de un péptido relacionado con la hormona paratiroidea por parte de los linfocitos T CD4 neoplásicos (Bryan, 2016; Goldner, 2016). Sin embargo, los pacientes presentes en este estudio mostraron valores dentro del rango normal para la especie.

En cuanto a la actividad sérica de la enzima LDH, estudios afirman que el aumento de los niveles de LDH podría deberse a modificaciones hacia el metabolismo anaeróbico (aumento de la glucólisis anaeróbica), necesario para mantener el rápido avance tumoral (Fantin, St-Pierre y Leder, 2006). En este estudio se observó que el 38.4% de los pacientes presentaron niveles de LDH por encima del rango superior para caninos. La hipercalcemia y la LDH aumentada están asociadas a un peor pronóstico así como también a recaídas (Zanatta,

Abate, D'Angelo, Miniscalco y Mannelli, 2003; Marconato, Crispino, Finotello, Mazzotti y Zini, 2010).

Con respecto a la función renal podemos decir que todos los pacientes presentaban una funcionalidad conservada, con ausencia de signología relacionada a falla renal. Los analitos considerados en este estudio fueron la urea y creatinina, prescindiendo de la evaluación del fósforo y SDMA. En estudios realizados en pacientes con linfoma multicéntrico se observó que solo el 5.8% de los pacientes presentaron alteraciones en los marcadores de falla renal (Martini et al., 2016). Un hallazgo en nuestros pacientes fue que 4 de ellos presentaron niveles de creatinina bajos. La creatinina surge del metabolismo de la creatina y fosfocreatina muscular y presenta una tasa de producción constante con una filtración libre a nivel glomerular, sin reabsorción ni secreción tubular con eliminación renal constante a TFG constante. En este sentido, la pérdida de la masa muscular, o las dietas bajas en proteínas han sido descritas como causas de descenso de este metabolito (Wittwer, 2012; Ceron, 2013; Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023).

Hay varios mecanismos que intentan explicar el aumento de las enzimas hepáticas en los perros con linfoma. Uno de los mecanismos más aceptados es que son secundarios al linfoma canino e indican hepatopatía reactiva y/o deshidratación; aunque también pueden ser el resultado de que el linfoma canino afecta este órgano (Zandvliet, 2016). A pesar de ello, todos nuestros pacientes presentaron los valores enzimáticos dentro del rango normal para la especie, descartando la presencia de daño hepático en todos ellos. En estudios realizados en linfoma multicéntrico se identificaron cambios hepáticos que incluyen daño hepatocelular, colestasis y deterioro funcional del hígado en el 16,7% de los pacientes (Gavazza et al., 2009).

Sin embargo, algunos parámetros del funcional hepático estaban alterados, como un aumento de la fosfatasa alcalina en un 89% de ellos. Sin embargo, esta enzima es poco específica y su valor se altera también en otras patologías extrahepáticas (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023).

El proteinograma electroforético puede proporcionar información útil para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la enfermedad. En este sentido,

observamos gammapatías en 3 pacientes. Aunque este hallazgo puede resultar paradójico, se ha descrito en varios trastornos de linfocitos B y T en humanos y fue previamente reportado por nuestro grupo de trabajo (Mims, 2018; Sánchez et al., 2021). Este perfil podría estar relacionado con las diferencias encontradas en los niveles de linfocitos circulantes y el papel del CD45 en la regulación del sistema inmunológico. Sin embargo, la literatura sobre este tema es escasa, y hasta dónde sabemos ningún trabajo considera el inmunofenotipo de linfoma (Gavazza et al., 2009; Tappin et al., 2011).

## 8. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos concluimos que en este estudio el linfoma T indolente se presentó en un 13% de los perros analizados, los cuales presentaron una edad media de 9.1 años y la mayoría de ellos pertenecieron a la raza Golden Retriever.

La citometría de flujo se ha convertido en una herramienta diagnóstica imprescindible para el diagnóstico del linfoma T indolente. A excepción de un paciente, todos los perros con sospecha de TZL fueron negativos al marcador CD45. Fue posible además, identificar aberraciones descritas en este tipo de linfoma.

En el hemograma se hallaron algunas alteraciones hematológicas. Por un lado, el 53% de los pacientes con TZL presentaron linfocitosis, y un 30% presentaron anemia moderada.

Los hallazgos bioquímicos más relevantes fueron el aumento en la fosfatasa alcalina, la hiperglobulinemia y las gammapatías presentes en el 89%, 50 y 30% de los pacientes, respectivamente.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, V.J., Evans, K. M., Sampson, J., y Wood, J. L. N. (2010). Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 51(10), 512-524.
- Álvarez-Berger, F.J., Aburto, E., Aristi, G., y Chávez, G. (2009). Estudio histológico e inmunofenotípico del linfoma canino en el centro de México. *Veterinaria México*, 40(2), 141-155.
- Aniolek, O., Gajewski, Z., y Ginzinski, S. (2014). Application of flow cytometry in diagnosing lymphomas in dogs and cats. *Central European Journal of Immunology*, 39(3), 327-330.
- Aresu, L., Martini, V., Rossi, F., Vignoli, M., Sampaolo, M., Arico, A., ... Marconato, L. (2014). Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(4), 348-362. doi:10.1111/vco.12048
- Avery, P.R., Burton, J., Bromberek, J.L., Seelig, D.M., Elmslie, R., Correa, S., ...Avery, A.C. (2014). Flow cytometric characterization and clinical outcome of CD4+ T-cell lymphoma in dogs: 67 Cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28, 538-546.
- Bronson, R.T. (1982). Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *American Journal of Veterinary Research*, 43, 2057-2059.
- Bryan, J.N. (2016). The current state of clinical application of serum biomarkers for canine Lymphoma. *Frontiers in Veterinary Science*, 3,87. doi:10.3389/fvets.2016.00087
- Byth, K.F., Conroy, L.A., Howlett, S., Smith, A.J., May, J., Alexander, D.R., y Holmes, N. (1996). CD45- null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *Journal of Experimental Medicine*, 183(4), 1707-1718.
- 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 182, 106-112.
- Comazzi, S., Marelli, S., Cozzi, M., Rizzi, R., Finotello, R., Henriques, J., ... Teske, E. (2018). Breed-associated risks for developing canine lymphoma differ among countries: an European canine lymphoma network study. *BMC Veterinary Research* 14, 232. doi:10.1186/s12917-018-1557-2

- Comazzi, S., y Gelain, M.E. (2011). Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal*, 188, 149-155.
- Cornell University College of Veterinary Medicine. (2023). Recuperado de <https://eclinpath.com>.
- Deravi, N., Berke, O., Woods, J. P., y Bienzle, D. (2017). Specific immunotypes of canine T cell lymphoma are associated with different outcomes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191, 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.07.008>
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Olson, P., y Hedhammar, A. (2000). Gender, age, breed and distribution of morbidity and mortality in insured dogs in Sweden during 1995 and 1996. *Veterinary Record*, 146, 519-525.
- Fantin, V.R., St-Pierre, J., y Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9, 425-434.
- Fearon, E.R. (1997). Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 278, 1043-1050.
- 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. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(4), 272-286. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00317.x>
- Flores, E. (1986). Epidemiología del cáncer en perro y gato. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 8(2) 39-48.
- Fournel-Fleury, C., Magnol, J. P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., ... Felman, P. (1997). Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Comparative Pathology*, 117(1), 35-59. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(97\)80065-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(97)80065-5)
- Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., ... Magnol, J. P. (2002). Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Veterinary Pathology*, 39(1), 92-109. <https://doi.org/10.1354/vp.39-1-92>
- Gavazza, A., Lubas, G., Valori, E., y Gugliucci, B. (2008). Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. *Veterinary Research Communications*, 32(Suppl 1), S291–S293. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9131-1>

- 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. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15, 190-195.
- Gavazza, A., Sacchini, F., Lubas, G., Gugliucci, B., y Valori, E. (2009). Clinical, laboratory, diagnostic and prognostic aspects of canine lymphoma: a retrospective study. *Comparative Clinical Pathology*, 18, 291-299.
- Glickman L., Glickman N., y Thorpe R., (2000). The Golden Retriever Club of America National Health Survey. Recuperado <http://www.grca.org/healthsurvey.pdf>.
- Goldner, W. (2016). Cancer-Related Hypercalcemia. *Journal of Oncology Practice*, 12, 426-435. doi: 10.1200/JOP.2016.011155
- Hanahan, D., y Weinberg, R.A., (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- 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. *Veterinary and Comparative Oncology*, 18(3), 416-427. <https://doi.org/10.1111/vco.12568>
- Hernandez, J.D., y Baum, L.G. (2002). Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology*, 12, 127R–136R.
- Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Altekruse, S.F., ...Bethesda, M.D. (2012). National Cancer Institute. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009*.
- Hughes, K. L., Labadie, J. D., Yoshimoto, J. A., Dossey, J. J., Burnett, R. C., y Avery, A. C. (2018). Increased frequency of CD45 negative T cells (T zone cells) in older Golden retriever dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(1), E109–E116. doi:10.1111/vco.12343
- Jark, P.C., Fracacio, P., Anai, L.A., Silva, M.C.L., Calazans, S.G., Senhorello, I.L.S., ...Sueiro, F.A.R. (2020). Histopathological and immunophenotypical characterization of canine multicentric Lymphoma in Brazil: a study of 203 cases. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72(3), 787-793.
- Jark, P.C. y De Sá Rodrigues, L.C. (2022). *Neoplasias hematopoiéticas en caes e gatos*. São Paulo: MedVet.
- Jalla, S., Sazawal, S., Deb, S., Black, R.E., Das, S.N., Sarkar, A., y Bhan, M. (2004). Enumeration of lymphocyte subsets using flow cytometry: effect of storage before and after staining in a developing country setting. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 19, 95-99.

- Lingaas, F., Comstock, K.E., Kirkness, E.F., Sorensen, A., Aarskaug, T., Hitte, C., ... Ostrander, E.A. (2003). A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal hystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. *Human Molecular Genetics*, 12, 3043-3053.
- 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., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., ... Zini E. (2009). Association between waste management and cancer in companion animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 564-569.
- Marconato, L., Stefanello, D., Valenti, P., Bonfanti, U., Comazzi, S., Roccabianca, P., ... Zini E. (2011). Predictors of long-term survival in dogs with high grade multicentric lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 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. *Hematological Oncology*, 31(1), 1-9.
- Martini, V., Cozzi, M., Aricò, A., Dalla Rovere, G., Poggi, A., Albonico, F., ... Comazzi, S. (2017). Loss of CD45 cell surface expression in canine T-zone lymphoma results from reduced gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 187, 14-19.
- 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. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14 (Suppl 1), 117-126. doi:10.1111/vco.12155.
- 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. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(3), 281-287. doi: 10.1111/vco.12043.
- Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., ... Bocchini, V. (2008). Cancer incidence in pet dogs: Findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 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). Buenos Aires: Inter-Médica .
- 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 of Veterinary Internal Medicine*, 23, 116-122. doi 10.1111/j.1939-1676.2008.0210.x

- Mims, M.P. (2018). Lymphocytosis, lymphocytopenia, hypergammaglobulinemia, and hypogammaglobulinemia. R. Hoffman, E. J. Benz, L. E. Silberstein, H. E. Heslop, J. I. Weitz, J. Anastasi, M. E. ... Abutalib (Ed.), *Hematology, basic principles and practice* (pp. 682–690). Philadelphia: Elsevier.
- Mizutani, N., Goto-Koshino, Y., Takahashi, M., Uchida, K., y Tsujimoto, H. (2016). Clinical and histopathological evaluation of 16 dogs with T-zone lymphoma. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78(8), 1237-1244. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0688>
- Modiano, J.F., Breen, M., Burnett, R.C., Parker, H.G., Inusah, S., Thomas, ... Avery, A.C. (2005). Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Research*, 65, 5654-5661.
- Moore, A.S. (2016). Treatment of T cell lymphoma in dogs. *Veterinary Record*, 179(11), 277.
- Moreno Nogueira, J.A., Casas Fernández de Tejerina, A., y Moreno Rey, A. (2009). Tratamiento de los linfomas no hodgkinianos indolentes. *Revista clínica española*, 209(2), 82-87.
- Moreno, K., y Bracarense, A. (2007). Linfoma canino de células T: aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos de 38 casos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44, 103-110.
- Müller, A.M.S., Ihorst, G., Mertelsmann, R., y Engelhardt, M. (2004). Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Annals of Hematology*, 84, 1-12.
- Nelson, R.W., y Couto, C.G. (2010). Linfoma en perros y gatos. En *Medicina Interna de pequeños animales* (pp. 1174-1186). Barcelona: 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. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 34(4), 349-354.
- Owen, L.N. (1980). *TNM classification of tumours in domestic animals*. Geneva: World Health Organization.
- Parachini-Winter, C., Carioto, L. M., y Gara-Boivin, C. (2019). Retrospective evaluation of anemia and erythrocyte morphological anomalies in dogs with lymphoma or inflammatory bowel disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 254(4), 487-495. doi: 10.2460/javma.254.4.487.

- Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J.P., Fournel-Fleury, C., y Ponce, F. (2009). Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3(2), 301-310.
- Pawlak, A., Rapak, A., Drynda, A., Poradowski, D., Zbyryt, I., Dzimira, S., ... Obminska-Mrukowicz, B. (2014). Immunophenotypic characterization of canine malignant lymphoma: a retrospective study of cases diagnosed in Poland Lower Silesia, over the period 2011–2013. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14, S1, 52–59. doi: 10.1111/vco.12112.
- Pawlak, A., Ziolo, J., Kutkowska, A., Blazejczyk, J., Wietrzyk, A., Krupa, W., ...Rapak. (2016). A novel canine B-cell leukaemia cell line. Establishment, characterisation and sensitivity to chemotherapeutics. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(4), 1218-1231.
- Pessina, P. (2011). *Carcinoma tiroideo en perros: aspectos moleculares* (Tesis Maestría). Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo.
- Piccaluga, P.P., Sapienza, M.R., Agostinelli, C., Sagramoso, C., Mannu, C., Sabattini, E., ... Pileri, S.A. (2009). Biology and treatment of follicular lymphoma. *Expert Review of Hematology*, 2, 533-547.
- 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.
- Poggi, A., Miniscalco, B., Morello, E., Gattino, F., Delaude, A., Ferrero Poschetto, L., ...Riondato, F. (2017). Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*, 15(2), 431-440. doi:10.1111/vco.12184
- 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
- Rao, S., Lana, S., Eickhoff, J., Marcus, E., Avery, P. R., Morley, P. S., y Avery, A. C. (2011). Class II major histocompatibility complex expression and cell size independently predict survival in canine B-cell lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(5), 1097-1105. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0767.x.
- Ratcliffe, L., Mian, S., Slater, K., King, H., Napolitano, M., Aucoin, D., y Mobasheri, A. (2009). Proteomic identification and profiling of canine lymphoma patients. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7, 92-105.

- Ruple, A., Avery, A.C., y Morley, P.S. (2017). Differences in the geographic distribution of lymphoma subtypes in Golden retrievers in the USA. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(4), 1590-1597.
- 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* (Athens, Greece), 11(2), 169-172.
- 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 Veterinary Journal*, 11(4), 734-746. doi: 10.5455/OVJ.2021.v11.i4.26
- Sanz Rivas, C. (1998). *Linfomas caninos: Estudio óptico, electrónico e inmunohistoquímico/Proliferación y ploidía* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid.
- Schneiderman, M.A., y Levin, D.L. (1980). *Needs, problems and prospects in cancer epidemiology*. Bethesda: Cancer Epidemiology in the USA and USSR. Us dep. Of Health and Human Services Natr. Canc. Inst.
- Seelig, D.M., Avery, A.N., Ehrhart, E.J., y Linden, M.A. (2016). The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma. *Veterinary Sciences*, 3(2), 11.
- 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.
- Stefanello, D., Valenti, P., Zini, E., Comazzi, S., Gelain, M.E., Roccabianca, P., ...Marconato, L. (2011). Splenic marginal zone lymphoma in 5 dogs (2001–2008). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 90-93.
- Suárez, V.M., del Valle Pérez, L. O., Díaz Domínguez, G., y Macías Abraham, C. (2015). Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(3), 242-253
- Tappin, S.W., Taylor, S.S., Tasker, S., Dodkin, S.J., Papasouliotis, K., y Murphy, K.F. (2011). Serum protein electrophoresis in 147 dogs. *Veterinary Record*, 168(17), 456.
- 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). *Veterinary Clinical Pathology*, 38(1), 2-12. doi: 10.1111/j.1939 65X.2008.00099.x

- 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*, 50(5), 738-748. doi:10.1177/0300985813478210
- 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 Organization criteria. *Veterinary Pathology*, 48(1), 198-211. doi: 10.1177/0300985810379428
- Valli, V.E., Vernau, W., de Lorimier, L.P., Graham, P.S., y Moore, P.F. (2006). Canine indolent nodular lymphoma. *Veterinary Pathology*, 43, 241-256.
- Vogelstein, B., y Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789-799.
- Withrow, S.J., Vail, D.M., y Page, R.L. (2013). *Withrow & MacEwen's Small animal clinical oncology* (5<sup>th</sup> ed.). St. Louis: Elsevier/Saunders.
- Withrow, S.J., y Vail, D.M. (2007). *Oncología clínica de pequeños animales* (4<sup>a</sup> ed.) Barcelona: Elsevier.
- Wittwer, F. (2012). Manual de patología clínica veterinaria. Valdivia: Ediciones Universidad Austral de Chile.
- 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). Canine lymphoma: a review. *The Veterinary Quarterly*, 36(2), 76-104. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1152633>