



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



**Estudio histológico, inmunofenotípico y de las proteínas vimentina, MUM-1 y Ki-67 en linfoma canino**

**T E S I S**

**Que como uno de los requisitos para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias Químico-biológicas**

**Presenta**

**MVZ Asela Berenice Meza León**

**Directores de tesis**

**Dra. Elba Reyes Maldonado**

**Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes**

**México, D. F., Enero de 2011.**

Esta tesis se realizó en el laboratorio de citología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Elba Reyes Maldonado y la Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes. El autor fue becario CONACYT en el periodo comprendido de febrero de 2009 a enero de 2011.

## DEDICATORIA

**A mi familia, que es lo más grande y valioso que tengo.**

**Mami:** porque para mí eres lo más grande e importante que tengo, gracias por cada uno de los momentos que pasamos juntas y porque sino hubieras sido tan “molestona” con la escuela seguramente no habría llegado hasta aquí. Te quiero mucho.

**Papá:** por todos los esfuerzos y ejemplos que me brindaste para ser lo que soy ahora. Te quiero papi.

**A mis hermanos:** Gaby, Yaya, George y Ariel porque cada uno a su manera me han apoyado y enseñado a vivir mejor la vida. Que ni el tiempo, la distancia ni los desacuerdos nos hagan olvidar lo que somos.

**A mis sobrinos:** Marianita, Ángel, Frida, Matías y Valery porque cada uno es la alegría, el dolor y la esperanza; siempre están en mi corazón. Los amo

**A Julián:** porque ya te convertiste en miembro de mi familia, gracias por todo el apoyo y tiempo que hemos compartido.

.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutoras, la Dra. Elba Reyes Maldonado y Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes a quienes no les importó entrar en terreno desconocido para apoyar mi formación y me brindaron todo su apoyo para realizar este trabajo.

A los miembros del comité: Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios, Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont, Dra. María del Rocío Ortiz Butrón y M en C Víctor Gabriel Hernández Chávez por su apoyo y comentarios para la realización y mejora del trabajo de tesis.

Al M en C Francisco Javier García Vázquez: “Doc”, no cabe duda que las cosas pasan por algo y a su debido tiempo, y yo tuve la fortuna de estar en el lugar y momento adecuados para conocerlo. No alcanzan las palabras para darle todo mi agradecimiento por todo el apoyo y confianza que me brindo, sin su ayuda no estaría aquí ni ahora.

Al histotecnólogo José Eduardo Farfán Morales por todo su apoyo y tiempo invertidos en la realización del arreglo de tejidos.

A quienes ahora considero mis amigas, por todo el tiempo compartido, la ayuda brindada y por ayudarme a pasar todos esos momentos difíciles: Bere (tocaya) y Erika.

A la Dra. Laura Romero por permitirme meterme en sus terrenos y facilitarme las muestras de tejido para este trabajo.

## **INDICE**

Abreviaturas	ii
Índice de figuras y tablas	iii
Resumen	iv
Abstract	v
I. Introducción	1
I.I. Etiología	1
I.II. Clasificación histológica	3
I.III. Biología	5
I.IV. Manifestaciones clínicas	7
I.V. Pronóstico	8
1. Estadio clínico	9
2. Clasificación histológica	10
3.- Inmunofenotipo	11
4.- Marcadores moleculares	14
PAX 5	14
Vimentina	14
MUM1/IRF-4	15
5.- Índices de proliferación	16
Ki-67	17
6.- Síndromes paraneoplásicos	18
I.VI. Justificación	19
I.VII. Planteamiento del problema	20
Hipótesis, Objetivos general y particulares	21
II. Materiales y Métodos	22
III. Resultados	25
IV. Discusión	35
V. Conclusiones	40
VI. Referencias bibliográficas	41

## Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ACAD	Aspiración citológica con aguja delgada
AgNOR's	Regiones organizadoras del nucleolo argentafines
CG	Centro germinal
DAB	Diaminobencidina
DCGNH	Linfoma difuso de células grandes no hendidas
DCINH	Linfoma difuso de células intermedias no hendidas
DCPDP	Linfoma difuso de células pequeñas con diferenciación plasmocitoide
DCPNH	Linfoma difuso de células pequeñas no hendidas
DMCNH	Linfoma difuso mixto de células no hendidas
DNA	Acido desoxirribonucleico
FMCNH	Linfoma folicular mixto de células no hendidas
H-E	Técnica de hematoxilina-eosina
Ig M	Inmunoglobulina M
IHQ	Inmunohistoquímica
LC	Linfoma canino
LNH	Linfoma no Hodgkin
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MUM-1	Mieloma múltiple 1/factor regulador del interferón 4
NCI-WF	Instituto Nacional de Cáncer-Formulación de trabajo
NK	Linfocitos asesinos naturales ("natural killer")
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAX5	Proteína activadora específica de linfocitos B
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PTHrP	Péptido relacionado a la hormona del crecimiento
RAG	Genes activadores de recombinación
TAM	Técnica de microarreglo de tejidos
TCR	Receptor de células T

## INDICE DE FIGURAS y TABLAS

	Título	Página
Figura 1	Frecuencia de linfoma canino (LC) por tipo de raza	25
Figura 2	Patrón histológico de linfoma canino	26
Figura 3	Distribución de los linfomas caninos estudiados por frecuencia y tipo histológico	27
Figura 4	Distribución de los casos de LC por inmunofenotipo	28
Figura 5	Expresión inmunohistoquímica de PAX5, CD3 y CD56 en linfoma no Hodgkin	29
Figura 6	Expresión inmunohistoquímica de la proteína MUM-1 en linfoma no Hodgkin	32
Figura 7	Expresión inmunohistoquímica de la proteína Ki-67 en linfoma no Hodgkin	32
Figura 8	Expresión de vimentina en linfoma no Hodgkin por la técnica inmunohistoquímica	34
Tabla 1	Clasificación histológica de los linfomas no Hodgkin del National Cancer Institute-Working Formulation (NCI-WF)	4
Tabla 2	Clasificación por la OMS de estadios clínicos del linfoma en perros y gatos	9
Tabla 3	Características y diluciones empleadas de los anticuerpos utilizados	24
Tabla 4	Prevalencia de linfoma canino de acuerdo al grado de malignidad	28
Tabla 5	Distribución de los LC por grado de malignidad, patrón histológico e inmunofenotipo	31
Tabla 6	Expresión de las proteínas Ki-67, vimentina y MUM1 por tipo histológico e inmunofenotipo	33

## RESUMEN

**Introducción.** El linfoma canino (LC) representa del 7-24% de todas las neoplasias en esta especie y hasta el 85% de las neoplasias hematopoyéticas. Histológicamente, la mayoría de los linfomas caninos son de células grandes de alto a intermedio grado de malignidad y los de bajo grado de malignidad son poco frecuentes. Inmunofenotípicamente se reporta que los linfomas de estirpe B son más frecuentes y de mejor pronóstico que los T; sin embargo, hasta la fecha poco se sabe respecto a la evaluación del inmunofenotipo, tipo histológico y grado de malignidad así como de la expresión de otros marcadores pronósticos.

El objetivo de este trabajo fue realizar la clasificación histológica e inmunofenotípica en muestras de linfoma canino, así como evaluar el índice de proliferación y expresión de vimentina y MUM-1 como factores pronósticos.

**Materiales y métodos.** Se obtuvieron 41 muestras de tejidos incluidos en parafina con diagnóstico de linfoma canino; como controles se utilizaron ganglios linfáticos de 25 perros normales diferentes, sin afectación de ganglio linfático. La clasificación histológica se realizó considerando la arquitectura del ganglio, el índice mitótico y el tipo celular mediante la técnica de hematoxilina-eosina, para determinar el inmunofenotipo se empleó la técnica inmunohistoquímica en un arreglo de tejidos, se emplearon anticuerpos anti CD3, PAX5, CD56, vimentina, Ki-67 y MUM-1.

**Resultados.** Histológicamente, el 97.6% de las muestras presentaron un patrón difuso, con 6 tipos celulares diferentes: linfoma difuso de células grandes no hendidas, linfoma difuso de células pequeñas no hendidas, linfoma difuso de células intermedias no hendidas, linfoma difuso mixto de células no hendidas, linfoma difuso de células pequeñas con diferenciación plasmocitoide y linfoma folicular mixto de células no hendidas. De acuerdo al grado de malignidad se encontró que el 48.8% fueron de grado bajo, seguidos del alto grado (31.7%) y grado intermedio (19.5%). Inmunofenotípicamente, se encontró un predominio de la estirpe T (39.0%), mientras que la estirpe B y los linfomas no B/no T representaron el 29.3% cada uno, se detectó aunque con baja frecuencia, linfoma de células NK (2.4%). La expresión de la proteína MUM-1 se detectó en menos del 5% de los casos. El índice de proliferación incrementado se presentó en el 65.8% de los casos y la vimentina en el 87.8% de los casos.

**Conclusiones.** La clasificación histológica en base al tipo histológico no se correlaciona con el inmunofenotipo y el índice de proliferación, mientras que de acuerdo al grado de malignidad si hay correlación con el inmunofenotipo e índice de proliferación. Los linfomas de estirpe T son más frecuentes en esta población y existe una baja incidencia de linfomas de células NK. La expresión de Ki-67 no se relacionó como factor pronóstico confiable. La frecuencia de expresión de MUM-1 es baja en linfoma canino y la expresión de vimentina sirve para confirmar el origen mesenquimatoso de la neoplasia.

## ABSTRACT

The canine lymphoma (CL) represents from 7 to 24% of all neoplasms on this species, and the 85% of all haematopoietic neoplasms. Hystologically most of the canine lymphoma are represented by large cells with high to intermediate grade of malignancy while the low degree of malignancy is less frequent. B cells lymphomas are more frequent and less dangerous than T cells lymphoma. However, studies about immunophenotype, histological pattern, malignancy grade, as well as, other prognostic markers are very limited.

The aim of this study is the immunophenotypic and histological classification of samples from canine lymphoma and to evaluate the proliferation index and expression of other prognostic markers.

**Materials and methods.** 41 paraffin embedded tissues diagnosticated with canine lymphoma were analyzed. Lymph nodes from 25 different healthy dogs were used as control. The classification was made considering the lymph node architecture, the mitotic index and the cellular type using the hematoxylin & eosin technique. In order to determine Immunophenotyping, the following antibodies were used: CD3, PAX5, CD56, vimentine, ki-67 and MUM-1.

**Results:** Histologically 97.6% of samples showed a diffuse pattern with 6 different cellular types: diffuse lymphoma of large non cleaved cells, diffuse lymphoma of small non cleaved cells, diffuse lymphoma of intermediate non cleaved cells, diffuse lymphoma mixed of non cleaved cells, diffuse lymphoma of small cells with plasmacytoid differentiation and finally, follicular lymphoma mixed of non cleaved cells. According to the degree of malignancy rate, 48.8% were considered low, 31.7% high and 19.5% intermediate. Immunophenotypically 39% of cases exhibited T lineage, 29.3% were B lineage and non B/non T lymphoma each one and 2.4% NK lymphoma. Mum-1 protein expression was detected in at least 5 % from the subjects. Increased Proliferation index was detected in 65% of subjects and the vimentine in the 87.8% of subjects.

**Conclusions.** The histological classification based on cellular type did not show correlation with immunophenotype neither with proliferation rate. On other hand, proliferation rate and cellular immunophenotype were correlated with malignance degree. In this study, T lineage lymphoma was the most frequent, whereas incidence of NK-cell lymphomas was detected only in a low percentage. Ki-67 expression did not show to be useful prognostic factor. Also, MUM-1 expression in canine lymphoma was infrequent. The mesenchymal origin of the neoplasm was confirmed by vimentin expression.

## **I. INTRODUCCIÓN**

El linfoma se define como una proliferación clonal de linfocitos malignos en tejidos sólidos como ganglios linfáticos, médula ósea y órganos viscerales. El linfoma canino (LC) es una neoplasia espontánea, natural y similar en presentación clínica, etiología y factores pronósticos al linfoma no-Hodgkin (LNH) de los seres humanos. (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Fournel-Fleury y cols., 1997; Meuten, 2002; Stanislaw, 2007; Tozon y cols., 2003).

El LC es el tercer tipo de cáncer más frecuente en el perro y representa hasta el 85% de las neoplasias hematopoyéticas; la incidencia anual es de 13 a 30 casos por cada 100,000 perros. Estudios realizados en humanos y en perros han demostrado que la prevalencia de los distintos subtipos de linfoma depende en gran medida de la región geográfica. La edad de presentación oscila entre los 5 y 9 años, aunque puede presentarse a cualquier edad (Álvarez y cols., 2009; Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Dhaliwal y Kitchell, 2003; Dobson y cols., 2001; Meuten 2002).

Los perros con linfoma que responden bien al tratamiento alcanzan una sobrevida de al menos 8 a 12 meses, aunque rara vez se cura, mientras que aquellos pacientes sin respuesta favorable, sobreviven en promedio de 6 a 8 semanas. Esta variabilidad se asocia con el hecho de que los subtipos de linfoma tienen un pronóstico distinto y requieren tratamientos diferentes, por lo que el conocimiento y clasificación de los subtipos de linfoma permite seleccionar un tratamiento adecuado, reducir el sufrimiento de los pacientes y evitar costos innecesarios al propietario (Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Teske y cols., 1994)

### **I.I. Etiología.**

Se considera que el linfoma es una enfermedad multifactorial sin una etiología clara confirmada; sin embargo, se postulan algunos factores como predisposición genética, aberraciones cromosómicas, exposición a químicos, radiación o campos electromagnéticos; la infección viral no ha sido bien documentada en esta especie (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Kelsey y cols., 1998; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002; Sueiro y cols., 2005.)

### **a) Predisposición genética.**

Teske y cols., 1994, reportaron linfoma en una familia de rottweilers (ambos padres y tres de los cuatro hermanos de una misma camada). Se ha informado mayor incidencia de presentación en ciertas razas puras como boxer, san bernardo, terrier escocés, basset hound, airedale terrier, bulldog inglés, chow chow, pastor alemán, cobrador dorado, cobrador de labrador, cocker spaniel, poodle, rottweiler, mientras que hay menor incidencia en otras como dachshund y pomerania (Álvarez cols., 2009; Baskin y cols., 2000; Meuten, 2002; Morrison, 1998; Sueiro y cols., 2005.)

### **b) Aberraciones cromosómicas.**

Existen escasos estudios citogenéticos en el perro, debido a la dificultad para realizar el cariotipo que consta de 76 cromosomas acrocéntricos. En los datos publicados, 25% de los casos que presentaron trisomía del cromosoma 13, se relacionaron con incremento en la duración de la primera remisión y tiempo de sobrevida en comparación con aquellos perros con otras alteraciones cromosómicas. Otras trisomías reportadas son las de los cromosomas 20, 30 y 37, así como tetrasomía del cromosoma 9 (Meuten, 2002; Winkler y cols., 2005). En un estudio por citometría de flujo sobre ploidias en linfoma canino se encontró que más del 70% de los casos fueron diploides y cerca del 20 % aneuploides (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Thomas y cols., 2001; Thomas y cols., 2003; Winkler y cols., 2005).

### **c) Exposición a químicos.**

Se ha sugerido que la exposición a algunos herbicidas particularmente el 2-4 diclorofenoxiacético, incrementa el riesgo en los perros para padecer linfoma. En algunos estudios se demostró que el desarrollo del linfoma en perros es dos veces mayor, cuando el propietario ha aplicado este herbicida más de cuatro veces al año en su propiedad. (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Álvarez y cols., 2009; Meuten, 2002)

#### **d) Campos electromagnéticos.**

Los campos electromagnéticos de baja frecuencia (50-60 Hz) creados por corrientes eléctricas en los hogares, se han relacionado con el desarrollo de cáncer en niños, especialmente con leucemia; así mismo, con enfermedades linfoides malignas en el adulto. Esta relación también se ha considerado como causa de incremento en el desarrollo de linfoma en el perro (Kelsey y cols., 1998, Meuten, 2002, Sueiro y cols., 2005).

#### **e) Factores inmunológicos.**

Existen algunos reportes (Dobson, 2001; Greenle, 1990, Meuten, 2002) que revelan una asociación entre el sistema inmune o autoinmunidad y neoplasias hematopoyéticas en perros.

Keller (1992), mostró que perros con trombocitopenia mediada por autoanticuerpos, tenían mayor incidencia de padecer linfoma que aquellos sin este padecimiento; así mismo, un perro desarrollo linfoma multicéntrico siete meses después del diagnóstico de pénfigo cutáneo.

### **I.II. Clasificación histológica.**

Existen varios sistemas de clasificación para esta neoplasia, la mayoría de ellos basados en la morfología celular e inmunofenotipo, los cuales son relevantes para la terapia. Actualmente, en medicina veterinaria se emplea con mayor frecuencia el esquema del National Cancer Institute - Working Formulation (NCI-WF) la cual toma en consideración la arquitectura del ganglio (difuso o folicular), el índice mitótico (bajo, intermedio y alto grado), el tamaño del núcleo (grande o pequeño) y la forma del núcleo (hendido y no hendido) a los cuales se les atribuye una posible relación con el pronóstico de la enfermedad (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación histológica de los linfomas no Hodgkin del National Cancer Institute-Working Formulation (NCI-WF)**

<p><b>Linfomas de bajo grado</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Linfocítico o plasmocítico de células pequeñas</li><li>• Folicular predominantemente de células pequeñas hendidas</li><li>• Folicular mixto de células grandes y pequeñas</li></ul> <p><b>Linfomas de grado intermedio</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Folicular con predominio de células grandes</li><li>• Difuso de células pequeñas hendidas</li><li>• Difuso mixto de células pequeñas y grandes</li><li>• Difuso de células grandes (hendidas/no hendidas)</li></ul> <p><b>Linfomas de alto grado</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Difuso inmunoblástico</li><li>• Difuso linfoblástico</li><li>• Difuso de células pequeñas no hendidas (tipo Burkitt)</li></ul>
---

El tamaño celular se determina en relación al diámetro de los eritrocitos. Núcleos pequeños tienen 1 a 1.5 veces el diámetro del eritrocito, mientras que los núcleos grandes presentan tamaños iguales o mayores a 2 eritrocitos. El índice mitótico se considera bajo cuando se observan de 0 a 2 mitosis por campo 40X, de 3 a 5 mitosis se considera grado intermedio y alto grado cuando hay más de 6 mitosis por campo 40X. (Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Meuten, 2002; Fournel-Fleury y cols., 1997).

El esquema que la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió para la especie canina basado en la morfología celular e inmunofenotipo generalmente no se emplea de manera rutinaria (Guija de Arespacochaga y cols., 2007, Carter y cols., 1986, Dhaliwal y Kitchell, 2003, Meuten, 2002, Morris y Dobson, 2002, Morrison, 1998).

Se ha demostrado que los tumores de alto grado de malignidad responden mejor a la quimioterapia que los de bajo grado. Los perros con linfoma de bajo grado tienden a presentar una enfermedad progresiva lenta y viven relativamente más tiempo sin tratamiento intensivo, sin embargo, este tipo es poco frecuente en perros. El tipo de linfoma más frecuente en esta especie, es de intermedio a alto grado de malignidad y compuesto principalmente de células grandes (Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Dhaliwal y col., 2003; Fournel-Fleury y cols., 1997; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002; Morrison, 1998).

### **I.III. Biología.**

La etiopatogenia molecular del linfoma en perros se desconoce en gran medida, en la especie humana se conoce acerca de la histogénesis del linfoma derivado de las células B, pero aún es poco claro el que se origina de los linfocitos T.

Como en la mayoría de los tipos de cáncer, la patogenia del linfoma representa un proceso que involucra la acumulación progresiva y clonal de lesiones genéticas múltiples, que afectan protooncogenes y genes supresores de tumores. La teoría en tumores de origen linfoide es que los desórdenes de estas células se caracterizan por representar una maduración detenida en varios estadios de la diferenciación normal.

Varios tumores espontáneos que se presentan en perros tienen inactivación del gen supresor de tumores *p53*, el cual se propuso, podría ser uno de los múltiples cambios genéticos en la linfomagénesis; sin embargo, esta alteración se encontró solo en pocos casos de linfoma, principalmente en los de alto grado de malignidad y sobre todo, en animales geriatras, lo que sugiere que las mutaciones del gen tienden a incrementar con la edad cuando la reparación del DNA comienza a ser menos eficiente, lo que provoca mayor susceptibilidad a la neoplasia (Dhaliwal y col., 2003, Sueiro y cols., 2005).

El desarrollo de las células B en médula ósea, se inicia por el ensamblaje de genes que codifican para las regiones variables de las cadenas pesadas (H) y ligeras ( $\kappa$  y  $\lambda$ ) de los anticuerpos por los progenitores de células B, mediado por un proceso llamado recombinación V(D)J. Este proceso de manera general, se inicia por la participación de endonucleasas específicas de linfocitos, genes activadores de recombinación (RAG 1 y RAG 2) y grupo de proteínas de alta motilidad (HMG-1). Los tres segmentos de los genes (V, D y J) se unen para crear la región variable de la cadena pesada (mientras que  $\kappa$  y  $\lambda$  solo se componen de segmentos V y J), el ensamblaje de las cadenas pesadas ocurre en dos pasos, en

el primer rearrreglo un segmento del gen  $D_H$  se reordena al segmento  $J_H$  y en el segundo paso, un gen  $V_H$  se rearregla a la unión  $D_HJ_H$  Kusec, 2002.

En el locus H humano localizado en el cromosoma 14, hay aproximadamente 50 segmentos  $V_H$  funcionales, 27  $D_H$  y 6  $J_H$ . Entonces, cada célula B genera un par de genes particulares para la región variable de la cadena pesada, y un par para la región variable de su cadena ligera, la cual difiere de aquellas otras células B que codifican para un anticuerpo distinto. Por lo tanto, cada célula B tiene su propio marcador molecular clonal. Las células B vírgenes se acumulan en los folículos primarios de los órganos linfoides secundarios: ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) Kusec, 2002; Abbas y Litchman, 2004.

Cuando se analizaron y secuenciaron los genes de las regiones variables de inmunoglobulinas en células de linfoma de humanos, fueron analizados y secuenciados, se encontraron mutaciones somáticas lo cual indica que se originaron de células B del centro germinal o post centro germinal. Esto se ha encontrado en linfomas foliculares, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células grandes, linfomas mediastínicos, linfomas anaplásicos de células grandes, linfomas MALT, linfomas esplénicos, leucemia prolinfocítica, leucemia de células peludas, linfomas linfoplasmocitoides y algunas leucemias linfocíticas crónicas de células B. La excepción son los linfomas de la zona del manto y algunos casos de leucemia linfocítica crónica donde no se encontró mutación somática de los genes de la región variable Kusec, 2002.

Los eventos moleculares involucrados en la patogénesis del linfoma de células B ocurren principalmente en 2 estadios del desarrollo de estas células: durante la recombinación variable en precursores de células B en médula ósea, y durante la diferenciación celular en el microambiente del centro germinal en el curso de la respuesta inmune dependiente de células T Kusec, 2002.

A nivel citogenético y cromosomal, el sello distintivo de la mayoría de los linfomas son las traslocaciones cromosómicas involucrando al locus de las inmunoglobulinas y una variedad de genes asociados (Abbas y Lichtman, 2004, Kusec, 2002).

#### **I.IV. Manifestaciones clínicas**

Por su presentación anatómica se reconocen cinco formas del linfoma en el perro: multicéntrico, intestinal, mediastínico o tímico, cutáneo y extranodal; este último se subdivide en renal, neural y ocular (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).

El linfoma multicéntrico representa del 80 a 85% de los casos, se caracteriza por presentar linfadenomegalia generalizada llegando a tener de 2 a 15 veces el tamaño normal de los ganglios linfáticos. En ciertos casos, se pueden encontrar solo uno o más ganglios afectados. Si la linfadenomegalia es muy marcada, puede causar obstrucción mecánica de los vasos linfáticos produciendo edema en miembros y cara. Cuando se encuentra afectada la médula ósea se pueden observar citopenias que se reflejan clínicamente como infecciones, hemorragias y anemia. Un 10 a 20% de los perros presentan hipercalcemia como síndrome paraneoplásico, estos pacientes presentan hiporexia o anorexia, depresión, pérdida de peso progresiva, vómito, diarrea, poliuria y polidipsia (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).

El linfoma intestinal representa del 5 a 7% de los casos reportados, se caracteriza por infiltración local o difusa de tejido linfoide en el intestino delgado con aumento del tamaño de los ganglios mesentéricos. Los signos clínicos asociados son vómito, anorexia, diarrea y pérdida de peso. En ocasiones pueden aparecer signos de obstrucción intestinal y peritonitis. El hígado, bazo y nódulos mesentéricos pueden o no estar involucrados (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).

El linfoma mediastínico representa el 5% de los casos y se caracteriza por la presencia de una neoplasia en el mediastino anterior. Los signos clínicos que se presentan son disnea, tos, intolerancia al ejercicio, derrame pleural, disfagia y regurgitación. La hipercalcemia se presenta en un 40 a 50% de los casos (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).

La forma cutánea puede adoptar dos formas: primaria, originada en piel y secundaria, la cual se asocia con linfomas encontrados predominantemente en otros sitios corporales y ambas derivan de las células T (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).

El linfoma extranodal se caracteriza por presentar tejido neoplásico en órganos no linfoides. Las presentaciones con mayor frecuencia son la cutánea y la ocular. Los signos clínicos son muy variables y dependen de la localización, en general son consecuencia de la compresión que ejerce la neoplasia o la invasión de las células malignas en el órgano afectado (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).

#### **I.V. Pronóstico**

Sin tratamiento, la supervivencia promedio para un perro con linfoma es solo de 6 a 8 semanas; con corticosteroides como único tratamiento se le puede extender alrededor de 3 meses, pero con la quimioterapia suele prolongarse de 6 a 9 meses. Aproximadamente, el 70 a 80% de los casos de linfoma multicéntrico alcanzan la remisión y permanecen en ese estado durante un promedio de 6 a 9 meses. Sin embargo, el tiempo de sobrevida puede variar desde una semana hasta varios años. Una vez ocurrida la recaída el pronóstico empeora, ya que solo el 50% de los casos responden al tratamiento de rescate (Baskin y cols., 2000; Dhaliwal y Kitchell, 2003; Dobson y cols., 2001; Kiupel y cols., 1999, Morris y Dobson, 2002; Morrison, 1998; Sueiro y cols., 2005).

Algunas de las variables reportadas en medicina veterinaria de significancia pronóstica incluyen: **A)** aquellos relacionados con los pacientes como raza, edad,

peso corporal y género. **B)** dependientes del tumor tales como estadio clínico, marcadores moleculares, clasificación histológica, inmunofenotipo celular, índices de proliferación, condiciones paraneoplásicas y, **C)** los dependientes del tratamiento como respuesta a la terapia inicial (Baskin y cols., 2000; Dhaliwal y Kitchell, 2003; Dobson y cols., 2001; Kiupel y cols., 1999, Morris y Dobson, 2002; Morrison, 1998; Sueiro y cols., 2005).

### **A) Relacionados con el paciente**

Existen diversos estudios que confirman la predisposición de las razas puras para presentar linfoma, especialmente el rottweiler de entre 5 y 9 años. La pérdida de peso se ha asociado con una pobre respuesta al tratamiento. Otros estudios reportan que la edad, el género y el peso no están relacionados con la supervivencia libre de enfermedad (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Dobson y cols., 2001; Morrison, 1998).

### **B) Dependientes del tumor**

#### **1.- Estadio clínico.**

La estadificación es un método empleado para evaluar la extensión de la neoplasia, identificar síndromes paraneoplásicos, signos sistémicos de enfermedad y/o enfermedad oculta que sirve para elegir el tratamiento adecuado y determinar un pronóstico. Para este propósito en medicina veterinaria, se emplea el sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para especies domésticas (Tabla 2) (Morrison, 1998).

**Tabla 2. Clasificación por la OMS de estadios clínicos del linfoma en perros y gatos**

<b>Estadio I.</b> Un solo ganglio linfático o tejido linfoide de un solo órgano se encuentra implicado
<b>Estadio II.</b> Una cadena ganglionar se encuentra implicada
<b>Estadio III.</b> Implicación generalizada de todos los ganglios linfáticos
<b>Estadio IV.</b> Implicación del hígado, bazo o ambos con o sin los estadios I a III
<b>Estadio V.</b> Manifestación en sangre periférica, implicación de la médula ósea con o sin grados I a IV
<b>Subestadio a.</b> Sin signos sistémicos
<b>Subestadio b.</b> Con signos sistémicos

Diferentes estudios (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Dobson y cols., 2001; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002) han descrito la importancia de estadificar adecuadamente a los perros con linfoma para determinar periodos de supervivencia, remisiones o intervalos libres de enfermedad, no así para determinar respuesta al tratamiento donde no se han reportado correlaciones.

Los estadios tempranos (I y II) tienen pronósticos más favorables comparados con los tardíos (III y IV) ya que alcanzan remisiones completas y periodos de supervivencia largos. Los estadios tardíos y subestadios b tienen pronósticos desfavorables con periodos libres de enfermedad y tiempo de sobrevida más cortos (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Dobson y cols., 2001; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).

## **2.- Clasificación histológica**

En cuanto a lo que se refiere a la arquitectura del ganglio linfático, todos los autores coinciden que el linfoma difuso es el más común en los perros y que el linfoma folicular, siendo menos agresivo, representa menos del 6%. Una posible razón es que el linfoma folicular pasa desapercibido por los propietarios mientras que una vez difuso es fácilmente reconocido (Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Moulton y Harvey, 1990).

De acuerdo al tipo celular, el linfoma linfoblástico (alto grado), frecuentemente es de estirpe T y son los linfomas más comúnmente asociados a hipercalcemia. Los perros con este tipo de linfoma pueden sobrevivir no más de 90 días aun con terapia agresiva. En contraste, los linfomas de células pequeñas no hendidas los cuales por definición son de tipo B, tienden a presentar remisión completa con terapia adecuada (Meuten, 2002).

Parece ser que el grado histológico de malignidad es un indicador pronóstico confiable, y que los tumores de alto grado tendrán una peor respuesta. De acuerdo a la clasificación de Kiel, los tumores de alto grado confieren menor

probabilidad de alcanzar respuesta completa y presentan un intervalo libre de enfermedad menor, mientras que de acuerdo a la clasificación de la WF, los pacientes con tumores de alto grado tienen una supervivencia más corta (Morris y Dobson, 2002).

Otros estudios han mostrado que los tumores de alto grado responden mejor a la quimioterapia que aquellos de bajo grado. Los perros con tumores de bajo grado pueden tener una enfermedad progresiva lenta y vivir relativamente un periodo largo aun sin tratamiento; sin embargo, son poco frecuentes en animales (Meuten, 2002).

La mayoría de los linfomas en animales son de patrón difuso, de grado intermedio a alto grado de malignidad y compuestos por células grandes (Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Dhaliwal y col., 2003; Dobson y cols., 2001; Fournel-Fleury y cols., 1997; Meuten, 2002; Morris y col., 2002; Morrison, 1998).

En un estudio realizado en México, se encontró que como en otras áreas geográficas, la mayoría de los linfomas son de patrón difuso, con grado de malignidad de intermedio a alto; sin embargo, se mostró una mayor proporción de casos de linfoma de bajo grado (22.6%) (Álvarez y cols., 2009; Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Dobson y cols., 2001).

### **3.- Inmunofenotipo**

El inmunofenotipo celular resulta ser el factor más importante asociado con el pronóstico. En animales se ha demostrado que el uso de marcadores celulares específicos para la especie humana resulta confiable (Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Carter y cols., 1986; Dhaliwal y Kitchell, 2003; Morris y Dobson, 2002; Morrison, 1998; Meuten, 2002; Teske y cols., 1994; Wilkerson y cols., 2005; Willmann y cols., 2009).

Una variedad de antígenos celulares referidos como CD (del inglés *cluster of differentiation*), pueden ser detectados en diferentes estadios del desarrollo de

linfocitos B y T, y permiten identificar un linaje o estado de diferenciación de un linfocito.

El linaje de células B se define por la expresión de CD79a citoplasmática y otras moléculas CD para determinar el grado de maduración de las células de linfoma. Las células pre B tempranas expresan CD79a y cadenas  $\mu$  (IgM) citoplasmáticos. La porción de transducción de señales del receptor de células B (CD79), se expande a las regiones transmembranal e intracitoplasmática de la célula y se expresa en las células maduras e inmaduras en la mayoría de las neoplasias de células B, incluyendo tumores de células pre-B y células plasmáticas. Las células pre-B se convierten en células B inmaduras cuando la IgM citoplasmática es exportada a la superficie. Como las células B vírgenes se exponen a antígenos fuera de la médula ósea, CD21 e IgM aparecen en la superficie (Abbas y col., 2004; Wilkerson y cols., 2005).

Los marcadores presentes en precursores de células T tempranos incluyen CD3, CD2, CD5, CD7 y CD1a citoplasmáticos. El complejo CD3 está asociado con el receptor de células T (TCR) y se expresa en timocitos tempranos y a lo largo de toda la maduración. Durante la maduración tímica, los precursores de células T sufren rearme del TCR y expresan moléculas CD5, CD4 y/o CD8. Las células T maduras que entran a la circulación sanguínea y a los ganglios linfáticos pierden los marcadores tímicos tempranos (CD1a) y persisten los de superficie CD3, CD4 o CD8 (Abbas y col., 2004; Wilkerson y cols., 2005).

A la fecha, no se han publicado estudios que empleen algún marcador celular para determinar los linfomas de los linfocitos *natural killer* (NK) como CD56, CD16 y CD94 (Alvarez y cols., 2009; Guija de Arespachaga y cols., 2007; Carter y cols., 1986; Dhaliwal y col., 2003; Morris y Dobson, 2002; Morrison, 1998; Meuten, 2002; Teske y cols., 1994; Wilkerson y cols., 2005; Willmann y cols., 2009).

De acuerdo a los estudios publicados, se ha determinado que 60 a 80% de los casos de linfoma en el perro son de células B, mientras que los de linfocitos T alcanzan del 10 a 38%. Los linfomas mixtos (de células B y T) alcanzan un 22%,

mientras que los linfomas nulos (sin células B o T inmunorreactivas) representan menos del 5% (Carter y cols., 1986; Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Fournel-Fleury y cols., 1997; Fernández y cols., 2005; Meuten, 2002; Teske y cols., 1994; Wilkerson y cols., 2005; Willmann y cols., 2009).

En humanos, se ha mostrado que el inmunofenotipo depende fuertemente de la región geográfica y una relación causal con factores de riesgo específicos. De este modo se ha asociado al virus de Epstein-Barr con los linfomas de células B en África, mientras que el virus linfotrópico tipo I se ha ligado a una alta incidencia de linfomas T en Japón y el este de China. En medicina veterinaria pocos estudios han revelado esta asociación, sin embargo, se ha reportado una mayor incidencia de inmunofenotipo T en América comparado con estudios realizados en Europa, lo que puede sugerir que en América puede haber factores geográficos asociados (Álvarez y cols., 2009; Guija de Arespacochaga y cols., 2007).

A pesar de que para algunos autores el inmunofenotipo no ha mostrado ninguna asociación con el tipo histológico y la respuesta del tumor, sí tiene una fuerte influencia en la duración de la primera remisión, el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global. De este modo, los linfomas de células T presentan un mayor riesgo de recaída y muerte prematura después de la terapia, comparado con los de inmunofenotipo B (52 Vs 160 días y 153 Vs 330 días respectivamente) (Álvarez y cols., 2009; Carter y cols., 1986; Dhaliwal y Kitchell, 2003; Dobson y cols., 2001; Sözmen y cols., 2005; Stanislaw, 2007; Tozon y cols., 2003).

El inmunofenotipo puede ser determinado por medio de las técnicas de citometría de flujo e inmunohistoquímica, siendo esta última el método más empleado para fines diagnósticos y de investigación en oncología veterinaria (Álvarez y cols., 2009; Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Wilkerson y cols., 2005).

Para fines de investigación en oncología, a finales de los años 90's se desarrolló y validó la técnica de microarreglo de tejidos (TAM) la cual facilita la evaluación simultánea de un gran número de muestras de neoplasias procesadas bajo las mismas condiciones, permitiendo el ahorro de tejido, reactivos y tiempo, lo cual

mejora dramáticamente la eficiencia y disminuye los costos. En oncología veterinaria no se ha empleado muy frecuentemente esta técnica, sin embargo, se ha validado para la investigación de varios marcadores en linfomas (Keller y cols., 2007, Voduc y cols., 2008).

#### **4.- Marcadores moleculares**

Poco hay respecto a los hallazgos moleculares en medicina veterinaria, pero en el linfoma humano la expresión de ciertos marcadores puede ser útil para determinar el origen del linfoma y predecir resultados. Los principales estudios de estos marcadores se asocian con sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas o apoptóticas, de factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, angiogénesis y proteínas del citoesqueleto, los cuales pueden tener un efecto favorable o desfavorable en la patogénesis del tumor.

##### **4.1 Pax5**

Conocida como proteína activadora específica de linfocitos B (BSAP), pertenece a la familia de factores de transcripción. Es codificado por el gen *Pax5* y juega un papel importante en el desarrollo y diferenciación de linfocitos B, su expresión inicia en estadios tempranos de células B y permanece activo aún en estadios tardíos de diferenciación, pero está ausente en células plasmáticas diferenciadas. Se ha asociado con linfoma linfoplasmocitoide como consecuencia de la traslocación t(9;14), la cual se relaciona con un error de recombinación de cambio de clases (Kusec, 2002; Willmann y cols., 2009).

Willmann y cols. (2009) describieron a PAX5 como un nuevo marcador pan B en el perro, sin embargo, no se asoció con ninguna translocación

##### **4.2 Vimentina**

La vimentina, con un peso molecular de 52 KD es la principal proteína de los filamentos intermedios presente en el citoplasma de fibroblastos, linfocitos, células endoteliales y algunos otros tejidos mesenquimales, cuya función es mantener la

integridad de la célula. En células linfoides, el nivel de expresión y la organización celular es variable dentro de los diferentes linajes. Mientras que los linfocitos T mantienen la expresión de vimentina en todos los estadios de maduración, los linfocitos B reducen la síntesis de la proteína cuando maduran hacia células plasmáticas (Lilienbaum y cols., 1986; Minin y Moldaver, 2008; Möller y cols., 1988).

Los linfomas linfocíticos usualmente expresan vimentina mientras que los linfomas mixtos y los de células grandes presentan una proporción de células tumorales negativas a la proteína o no se expresa en todas las células (Lilienbaum y cols., 1986; Minin y Moldaver, 2008; Möller y cols., 1988).

La expresión de vimentina se anula temporalmente en los linfocitos B durante su transformación blástica, la cual toma lugar en el centro germinal del folículo linfoide, por lo que la falta de expresión de vimentina podría reflejar una etapa de diferenciación extra folicular característica de los linfomas del centro germinal (Lilienbaum y cols., 1986; Minin y Moldaver, 2008; Möller y cols., 1988).

En los perros se reporta un porcentaje bajo de linfomas foliculares, aunque no se ha estudiado la expresión de vimentina en estos casos (Meuten, 2002; Guija de Arespacochaga y cols., 2007; Moulton y Harvey, 1990).

#### **4.3 MUM1/IRF-4 (mieloma múltiple 1/factor regulador del interferón 4)**

El producto del gen *Mum1/IRF-4* es una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción, éste juega un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes en respuesta a señales por el interferón y otras citocinas. Se expresa de manera normal en células plasmáticas y se ha demostrado que los ratones deficientes de IRF4, son incapaces de formar centros germinales (CG), carecen de células plasmáticas en bazo y lamina propia, muestran una reducción importante de inmunoglobulinas séricas, y no son capaces de montar una respuesta de anticuerpos o generar linfocitos T citotóxicos o respuestas antitumorales. Estos hallazgos proporcionan evidencia de que el gen *Mum1/IRF4*

es esencial para la función de las células B maduras y los linfocitos T citotóxicos (Hans y cols., 2004; Falini y cols., 2000).

Dada esta función biológica, parece que MUM1 tiene el potencial de ser un marcador del fenotipo no-CG. De hecho, cuando se evalúa junto con CD10 y BCL6 identifica el fenotipo no-CG que resulta ser más agresivo y de peor pronóstico. Se ha reportado su expresión en 50 a 70% de casos de linfoma difuso de células grandes en humanos, y recientemente, algunos estudios han reportado que la expresión de MUM1 en células tumorales, se asocia con menor supervivencia global e intervalo libre de enfermedad (Hans y cols., 2004, Falini y cols., 2000).

En medicina veterinaria se ha reportado la expresión de MUM1 junto con CD79 $\alpha$  y CD20 en casos de plasmacitoma, sin embargo, a pesar de su reconocida importancia en el desarrollo del sistema inmunológico, la expresión de la proteína MUM1 en tejido linfohematopoyético normal y neoplásico se desconoce (Ramos-Vara y cols., 2007).

La expresión de la proteína bcl-2 relacionada con la inhibición de la muerte celular programada, o la expresión del protooncogen bcl-6 asociado con la translocación cromosómica más frecuentemente encontrada en linfomas difusos de células grandes B en humanos (Kusec, 2002) no han sido investigados para su uso en la especie canina.

## **5.- Índices de proliferación**

La proliferación celular es controlada por señales del microambiente que la estimulan o la inhiben, un exceso de estimuladores o una deficiencia de inhibidores llevan al crecimiento incontrolado. Aunque, el crecimiento acelerado puede ser acompañado por el acortamiento del ciclo celular, el mecanismo más importante del crecimiento es la conversión de células en reposo o quiescentes en células proliferantes por el hecho de entrar al ciclo celular.

La evaluación del potencial proliferativo basado en fracciones de la fase S del ciclo celular, ha conducido al uso de determinantes de la aparición de proteínas dependientes del ciclo celular como Ki-67, determinación de la proporción de células con regiones organizadoras del nucleolo argentafines (AgNOR's), expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), determinación de ploidia o aneuploidia del ADN en células tumorales, y también en estudiar la expresión de genes anormales encargados de corregir errores en la fase de traducción del material genético, como *p53* (Campana y cols., 1987, Tozon y cols., 2003).

### **Ki-67**

La evaluación del índice de Ki-67 (índice proliferativo) en linfoma no Hodgkin humano, se ha usado para validar la clasificación en términos de grado de malignidad, ya que esta proteína no histona altamente conservada, sintetizada al inicio de la proliferación celular es indispensable para la división y se degrada al final del ciclo celular, se expresa exclusivamente en las células proliferantes (normales o neoplásicas) y aún no se conoce su función específica (Schlüter y cols., 1993; Scholzen y col., 2000).

La distribución topográfica del antígeno Ki-67 es dependiente del ciclo celular: en la fase G1 se localiza principalmente en la región perinucleolar, en las siguientes fases se localiza en el interior de todo el núcleo. En la etapa de mitosis está presente en todos los cromosomas y aparece en una estructura reticular que rodea los cromosomas en metafase (Schlüter y cols., 1993; Scholzen y col., 2000).

En 2008, Szczuraszek y cols. no encontraron relación entre la expresión del antígeno y las variables clíniopatológicas de los pacientes con linfoma. En un seguimiento a 30 meses, la disminución de expresión del antígeno se asoció con una supervivencia más larga.

En medicina veterinaria, se ha tratado de determinar la asociación de la expresión de la proteína ki-67 con el pronóstico, sin embargo, no se tienen resultados satisfactorios. Kiupel y cols. (1999) y Phillips y cols. (2000) reportaron la expresión

de la proteína como predictor del intervalo libre de recaída pero no de la supervivencia global de perros con linfoma después de iniciar la quimioterapia.

## **6.- Síndromes paraneoplásicos**

La anemia es una anormalidad frecuentemente encontrada en casos de linfoma, se presenta en casi 40% de los casos, se relaciona con inflamación crónica relacionada al linfoma, tiempo de vida reducida de los eritrocitos y a metabolismo anormal del hierro. En estudios publicados, este hallazgo se asocia con un tiempo corto de supervivencia y con mala calidad de vida en los pacientes con linfoma (Baskin y cols., 2000; Dobson y cols., 2001; Ettinger, 2003).

La hipercalcemia es un signo paraneoplásico presente hasta en 40% de los casos. El mecanismo se relaciona con la producción de un péptido inducido por el tumor relacionado a la hormona de la paratiroides (PTHrP) el cual, estimula la resorción ósea osteoclástica. En un estudio en el que se asociaron varios factores entre ellos, las concentración elevada de calcio, se encontró que se relaciona con un estadio clínico avanzado y es de mal pronóstico en los casos de linfoma, (Baskin y cols., 2000, Dobson y col., 2001, Ettinger, 2003).

## **I.VI. Justificación**

El linfoma canino es frecuente en las consultas en oncología veterinaria, su incidencia así como las características morfológicas e inmunológicas marcan amplias diferencias entre un área geográfica y otra.

Se han documentado diferencias morfológicas entre casos de linfoma canino en Europa y Estados Unidos debidas principalmente al esquema de clasificación histológico empleado, ya que hasta la fecha, a pesar de contar con un sistema más adecuado como el propuesto por la OMS, el cual aparte de identificar el tipo celular considera el inmunofenotipo para dar una clasificación adecuada, se siguen utilizando diferentes clasificaciones (Kiel, Working Formulation, Rapaport) en las cuales además de determinar el tipo celular, se asume un estadio de maduración de la célula (centroblástico, inmunoblástico, centrocítico), considerando únicamente sus características cito-morfológicas sin tomar en cuenta la expresión de marcadores específicos para cada una de las células, lo que al final lleva a resultados poco concordantes entre el tipo histológico e inmunofenotipo celular.

En México, Álvarez y cols. (2009) realizaron un estudio donde se clasificó histológicamente los linfomas caninos utilizando un esquema tradicional (Working Formulation) y se determinó el inmunofenotipo, encontrándose diferencias significativas en comparación con los datos reportados en Estados Unidos y Europa, ya que se encontró mayor número de linfomas de bajo grado así como mayor incidencia de inmunofenotipo T.

Por otro lado, a pesar de la similitud que existe entre el linfoma no Hodgkin humano y el linfoma canino en relación con la conducta, alteraciones citogenéticas, desarrollo y aspecto clínico, en el área veterinaria no se han evaluado nuevos marcadores que permitan esclarecer la biología de la neoplasia y realizar una clasificación más precisa del linfoma canino como sucede en la patología humana.

## **I.VII. Planteamiento del problema**

El pronóstico de un paciente con linfoma está estrechamente relacionado con el tipo celular involucrado, grado de malignidad expresado por el índice mitótico y otros marcadores involucrados con el desarrollo del tumor, como aquellos que evalúan el índice de proliferación.

En medicina veterinaria, en la rama de pequeñas especies (perros y gatos), la aspiración citológica con aguja delgada (ACAD) es el método más utilizado para realizar el diagnóstico de neoplasias y en un alto porcentaje de estos casos, no se confirma el diagnóstico por estudio histopatológico. El linfoma canino no es la excepción, por lo que en ocasiones, los esquemas quimioterapéuticos parecen no tener éxito en todos los pacientes, lo que puede ser consecuencia del desconocimiento del tipo histológico, el inmunofenotipo y el índice de proliferación que se sabe juegan un papel fundamental en lo que respecta a respuesta al tratamiento, el tiempo global de supervivencia, el periodo libre de enfermedad, así como la presencia y la duración de recaídas.

## **Hipótesis**

La clasificación del linfoma canino se correlaciona con el inmunofenotipo e índice de proliferación con base en el patrón histológico y grado de malignidad.

## **Objetivo general**

Realizar la clasificación histológica de casos de linfoma canino, determinar la frecuencia de inmunofenotipo, índice de proliferación y otros marcadores y su posible correlación como indicadores pronósticos.

## **Objetivos específicos**

- 1.- Realizar la clasificación histológica para el linfoma canino basada en el patrón celular.
- 2.- Determinar el inmunofenotipo con los anticuerpos anti CD3, PAX5 y CD56 para linfocitos T, B y NK respectivamente.
- 3.- Determinar la expresión de las proteínas Ki-67, vimentina y MUM-1 en casos de linfoma canino y su posible asociación con el pronóstico.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **a) Muestras**

Se obtuvieron 41 muestras de tejido embebido en parafina de perros diagnosticados con linfoma entre 1999 y 2010 del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, de los cuales se desconocen las condiciones de fijación.

Como controles se utilizaron ganglios linfáticos de 25 perros diferentes, no neoplásicos, fijados en formol amortiguado al 7% y embebidos en parafina.

### **b) Clasificación histológica**

Se obtuvieron cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espesor del tejido, posteriormente, fueron desparafinados, hidratados y teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina (H/E) para su análisis al microscopio de campo claro.

La clasificación histológica se realizó tomando en consideración los siguientes parámetros: patrón histológico (folicular y/o difuso), índice mitótico (bajo, intermedio y alto) y tipo celular como lo describe Guija de Arespacochaga (2007).

### **c) Técnica de microarreglo de tejidos (TMA)**

Para la construcción del arreglo de tejidos se escogió una zona representativa de la lesión a partir de la laminilla teñida con hematoxilina y eosina para cada uno de los casos y de los tejidos control. Posteriormente, al azar, se hizo un plano identificando la localización exacta de cada uno de los tejidos.

Con un sacabocados para biopsia de 4 mm se tomaron dos cilindros del tejido los cuales se colocaron manualmente en un nuevo bloque de parafina de acuerdo a la localización planeada, se obtuvieron cortes de 2  $\mu\text{m}$  de espesor para corroborar la morfología a través de una tinción de hematoxilina – eosina (H/E) y otros para determinar el inmunofenotipo y las proteínas Vimentina, MUM-1 y Ki-67 por el método inmunohistoquímico.

#### **d) Inmunohistoquímica**

Se obtuvieron cortes de 2  $\mu\text{m}$  de espesor del bloque arreglado de tejidos y se colocaron en portaobjetos previamente tratados con una solución de poli-L-lisina. Los cortes se desparafinaron introduciéndolos en la estufa a 60° C durante 30 minutos, posteriormente se sumergieron en xilol por 5 minutos. Se hidrataron los tejidos con pases en xilol y alcohol etílico en gradientes de 96, 80, 70 y 50% y finalmente un paso de agua destilada.

La técnica de inmunohistoquímica (IHQ) se realizó con el sistema biotina-estreptavidina/peroxidasa mediante el sistema de detección “mouse/rabbit inmunodetector with HRP” (BioSB Inc. Santa Barbara, C.A., USA).

Para el desenmascaramiento de epítomos se utilizó citrato de sodio 0.1M pH 6 (target retrieval solution 10X, Dako, Cytomation Carpinteria C.A. USA), durante 1 minuto en olla de presión/horno de microondas y se dejaron enfriar a 4° C durante 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 0.9% en medio acuoso durante 5 minutos y después lavadas con agua destilada, enseguida se montaron en “coverplates” con PBS como lo describe García-Vázquez (2008). Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo primario a diferentes diluciones (Tabla 3) y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente, luego, se lavó con PBS durante 4 minutos. Se agregaron el anticuerpo secundario biotinilado y el complejo estreptavidina/HRP (Biocare) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, cada uno con un lavado intermedio de 4 minutos en PBS. Para evidenciar la reacción antígeno- anticuerpo se empleó como sustrato 3,3´diaminobencidina -  $\text{H}_2\text{O}_2$  (DAB, Biocare) y se vigiló al microscopio. Se realizó el contraste de los núcleos con hematoxilina de Gill por 3 minutos y diferenció con hidróxido de amonio 0.37 M. Se deshidrataron las laminillas con lavados en alcohol etílico al 50%, 60%, 70%, 80%, 96%, absoluto anhidro y xilol. Se realizó el montaje de las laminillas con resina sintética Entellan (Merck).

**Tabla 3. Características y diluciones empleadas de los anticuerpos utilizados.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Clona</b>	<b>Dilución</b>
PAX5	Cell Marque	24	1:25
CD3	Dako	Policlonal	1:50
CD56	Dako	123C3D5	1:50
Ki67	Dako	MIB 1	1:100
MUM 1	Dako	MUM 1p	1:25
Vimentina	Dako	V9	1:100

Como control positivo para CD56 se utilizó un corte de tejido nervioso humano y para el resto de los anticuerpos, cortes de amígdala humana en cada una de las laminillas.

Los linfomas fueron clasificados como de células T, B o NK cuando más del 25% de células reaccionaron con los anticuerpos CD3, PAX5 y CD56 respectivamente. Cuando no hubo reacción para ninguno de los anticuerpos se reportaron como no B/ no T. Para el resto de los marcadores también se consideró reacción positiva cuando más del 25% de las células presentaron reacción.

### III. RESULTADOS

#### III.1 Muestras

De los 41 casos evaluados, 27 fueron machos (65.8%) y 14 hembras (34.2%). La edad de presentación osciló entre 1 y 15 años con una media de 5 años.

Se encontró la presencia de linfoma en 16 razas diferentes, siendo las más frecuentes el mestizo (7/41), rottweiler (7/41), cobrador dorado (6/41) y pastor alemán (5/41), el resto de los casos correspondieron a las razas beagle, bull terrier, cocker spaniel, schnauzer estándar, schnauzer gigante, bóxer, bulldog inglés, cobrador de labrador, fox terrier, gran danés, samoyedo y terrier escocés, los resultados se muestran en la figura 1.

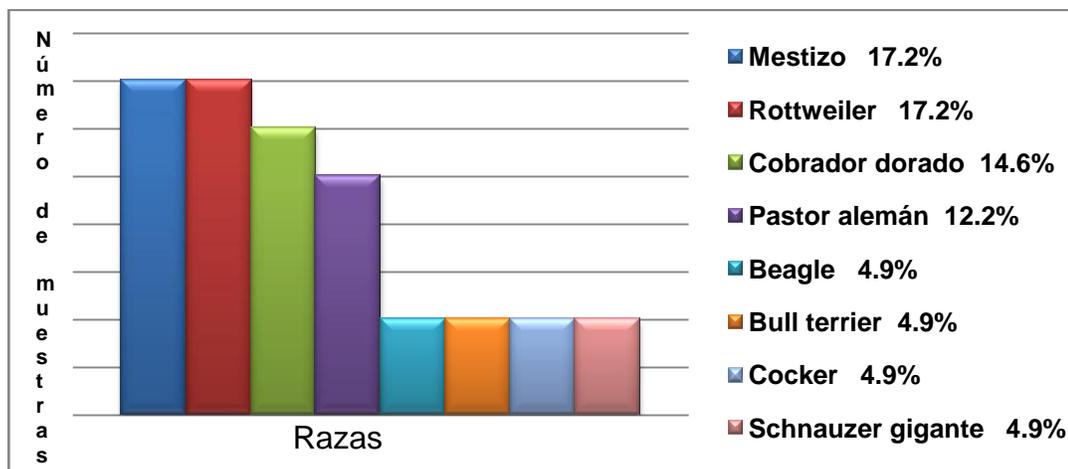
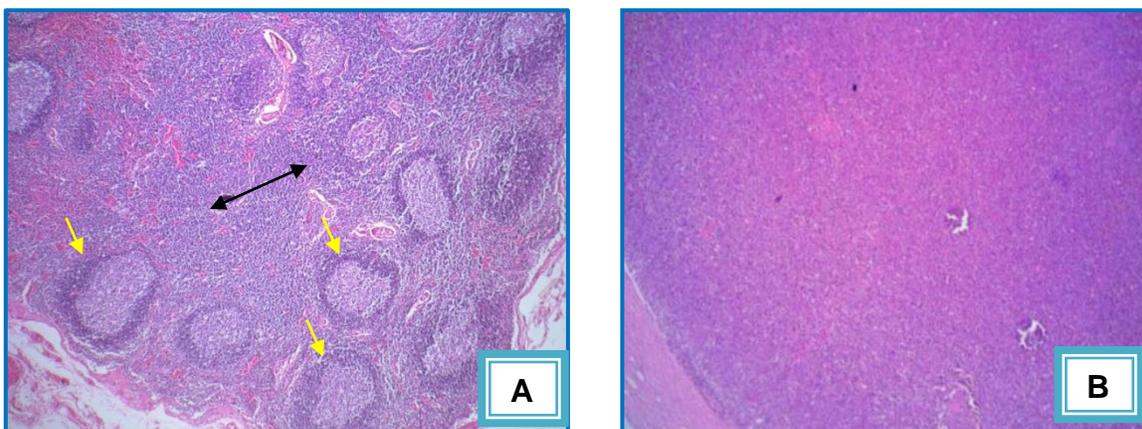


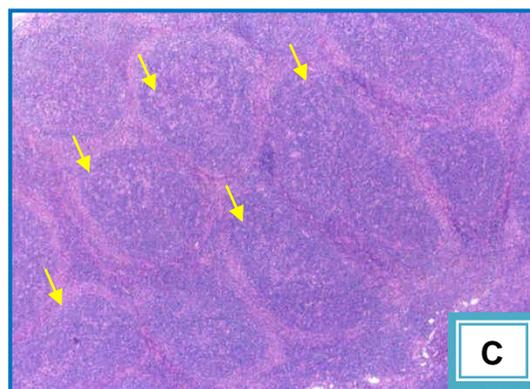
Figura 1. Frecuencia de linfoma canino (LC) por tipo de raza. Se muestra el predominio de perros mestizos (7/41) y las razas rottweiler (7/41), cobrador dorado (6/41) y pastor alemán (5/41) en los 41 casos evaluados de linfoma canino

#### III.2 Clasificación histológica

Respecto al patrón histológico, se encontró un patrón difuso en 40/41 casos (97.6%), mientras que sólo en uno de los linfomas se presentó el patrón folicular (2.4%) Figura 2.

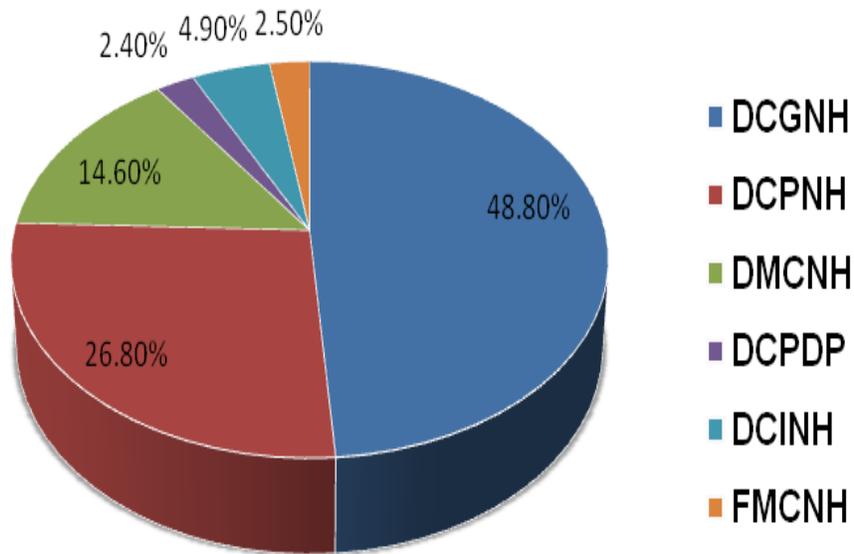


**Figura 2. Patrón histológico de linfoma canino.** Se muestran micrografías de ganglio linfático de perro normal y con diagnóstico de linfoma **A)** imagen de ganglio linfático normal, donde se observan los folículos secundarios → en la corteza del ganglio y la zona de la médula ↔, **B)** ganglio con linfoma con patrón difuso donde la arquitectura normal del ganglio es reemplazada por células neoplásicas, **C)** imagen de LC con incremento de folículos linfoides → invadiendo las zonas de corteza y médula característico de patrón folicular. Tinción de hematoxilina y eosina (H/E) 100X.



Una vez revisada la arquitectura y el análisis histológico de los ganglios linfáticos afectados, se encontraron 6 grupos diferentes de linfomas: difuso de células grandes no hendidas (DCGNH), difuso de células pequeñas no hendidas (DCPNH), difuso de células intermedias no hendidas (DCINH), difuso de células pequeñas con diferenciación plasmocitoide (DCPDP), difuso mixto de células no hendidas (DMCNH) y folicular mixto de células no hendidas (FMCNH).

En general, de los casos estudiados, el linfoma difuso de células grandes no hendidas (DCGNH) fue el que se encontró con mayor frecuencia (48.8%), seguido del DCPNH (26.8%) y DMCNH (14.6%), los tipos DCINH, FMCNH y DCPDP se encontraron con menor frecuencia 4.9%, 2.5% y 2.4% respectivamente, los resultados se resumen en la figura 3.



**Figura 3. Distribución de los linfomas caninos estudiados por frecuencia y tipo histológico.** Se observa que el DCGNH fue el más frecuente, seguido por el DCPNH y DMCNH, mientras que los linfomas FMCNH y CPDP se encontraron en menor frecuencia. DCGNH: difuso de células grandes no hendidas, DCPNH difuso de células pequeñas no hendidas, DCINH difuso de células intermedias no hendidas, DCPDP difuso de células pequeñas con diferenciación plasmocitoide, DMCNH difuso mixto de células no y FMCNH folicular mixto de células no hendidas.

Cuando los casos se clasificaron por grado de malignidad de acuerdo al número de mitosis anormales por campo, se encontró que el grado de malignidad bajo fue el más frecuente (48.8%), seguido del grado alto (31.7%) y el de grado intermedio fue el menos común (19.5%).

Dentro de los linfomas de bajo grado (20/41), el DCGNH (8/20) y DCPNH (8/20) se encontraron con mayor frecuencia (19.5% cada uno) seguidos del linfoma DMCNH (7.3%) y DCPDP (2.5%).

Para los linfomas de grado intermedio 8/41, se encontró la misma frecuencia (4.9%) para el linfoma DCGNH, DCPNH, DCINH y DMCNH.

Dentro del grado de malignidad alto, se encontró mayor frecuencia de linfoma DCGNH (24.4%) en comparación con los DCPNH (2.4%) y DMCNH (2.4%), el único caso de patrón folicular (FMCNH) apenas representó el 2.4% en esta categoría. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

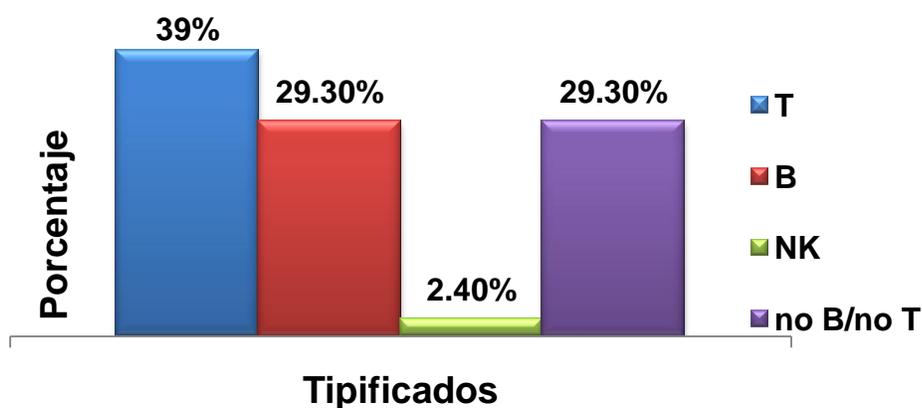
**Tabla 4. Prevalencia de linfoma canino de acuerdo al grado de malignidad.**

Grado de malignidad	Tipo histológico	Número de casos	Porcentaje %
Bajo 20 (48.8%)	DCGNH	8	19.5
	DCPNH	8	19.5
	DMCNH	3	7.3
	DCPDP	1	2.5
V Intermedio 8 (19.5%)	DCGNH	2	4.9
	DCPNH	2	4.9
	DCINH	2	4.9
	DMCNH	2	4.9
Alto 13 (31.7%)	DCGNH	10	24.4
	DCPNH	1	2.4
	DMCNH	1	2.4
	FMCNH	1	2.4

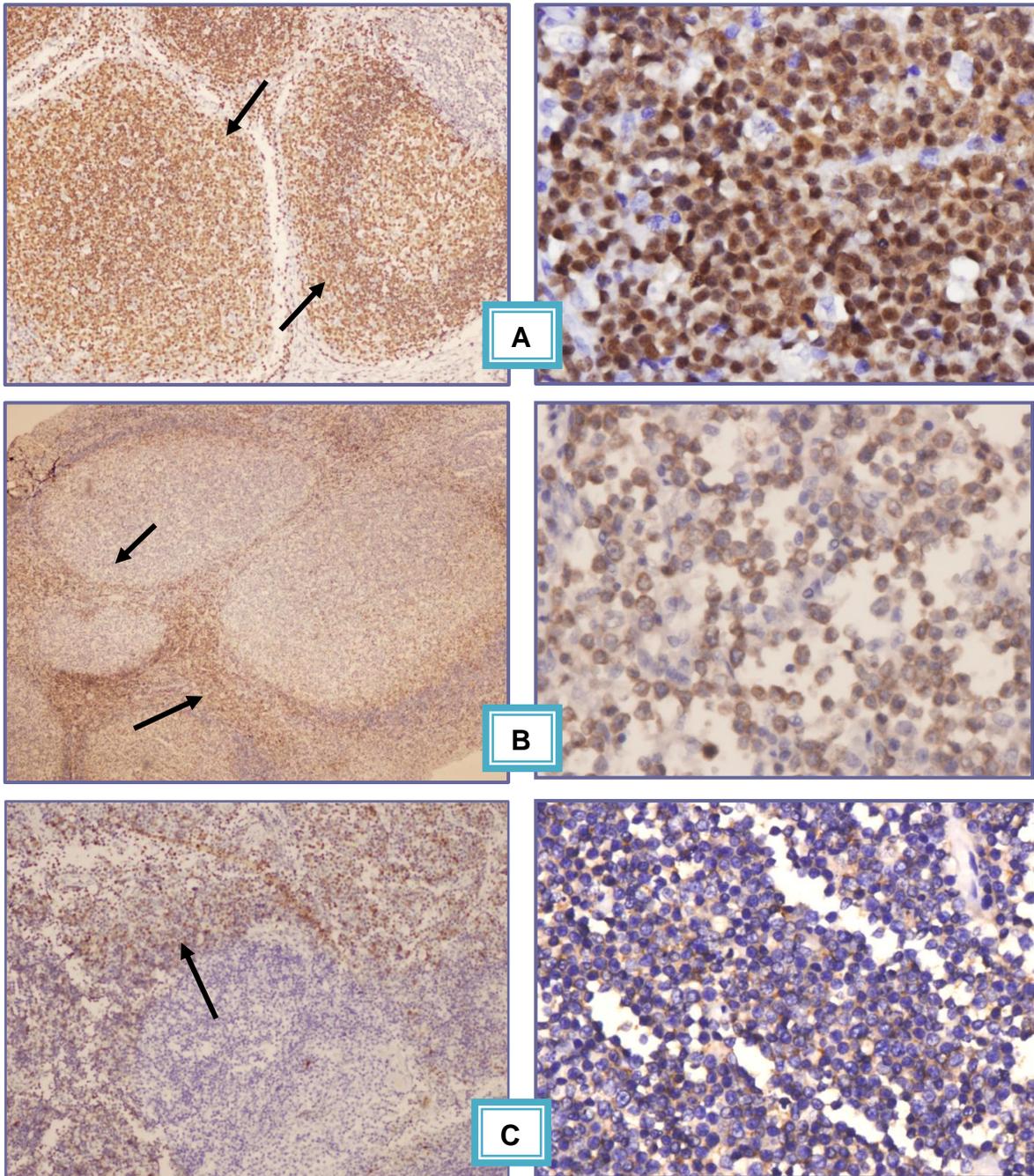
DCGNH: difuso de células grandes no hendidas, DCPNH difuso de células pequeñas no hendidas, DCINH difuso de células intermedias no hendidas, DCPDP difuso de células pequeñas con diferenciación plasmocitoide, DMCNH difuso mixto de células no hendidas y FMCNH folicular mixto de células no hendidas.

### III.3 Inmunofenotipo

De los 41 casos estudiados se logró tipificar solo a 29 (70.7%), de éstos, el 29.3%(12/29) fueron de estirpe B, 39.0% (16/29) de estirpe T y sólo el 2.4% (1/29) de linfocitos NK. El 29.3% de los casos restantes se clasificaron como no B/no T (Figuras 4 y 5).



**Figura 4. Distribución de los casos de LC por inmunofenotipo.** Del lado izquierdo de la gráfica se observa el porcentaje de casos inmunofenotipificados donde la estirpe T se encontró con mayor frecuencia, seguido del fenotipo B y en menor proporción el fenotipo NK. Del lado derecho se graficó el porcentaje de los casos clasificados como no B/no T.



**Figura 5. Expresión inmunohistoquímica de PAX5, CD3 y CD56 en ganglios sanos y con linfoma canino.** Cortes histológicos de ganglio linfático que muestran: **A)** izq. Expresión de Pax5 en folículos secundarios → 100x, der. Ganglio linfático con linfoma canino con expresión nuclear positiva en linfocitos de estirpe B 400x, **B)** izq. expresión de CD3 fuera del folículo linfoide → 100x, der. Expresión de CD3 en membrana citoplasmática de linfocitos T 400x, **C)** izq. expresión de CD56 en la médula → 100x, der. Reacción positiva en membrana citoplasmática de linfocitos NK 400x. Técnica biotina streptavidina.

### Grado bajo

La estirpe T se detectó en 7/20 casos, la estirpe B en 4/20 casos, el único caso de estirpe NK se encontró en este grupo y 8/20 casos fueron no B/no T.

Por tipo histológico, el linfoma difuso de células grandes no hendidas (DCGNH) y el linfoma difuso de células pequeñas no hendidas (DCPNH), se encontraron con mayor frecuencia en este grupo (40% cada uno). Del tipo DCGNH 4/8 fueron de estirpe T y 2/8 de estirpe B. De los linfomas DCPNH 2/8 fueron de inmunofenotipo T, mientras que solo 1/8 fue de estirpe B, 4/8 fueron no B/no T. El linfoma DCPDP no pudo ser inmunotipificado, mientras que del tipo MCNH 1/3 fue de estirpe T y 1/3 de estirpe B.

### Grado intermedio

De los 8 casos de este grupo, (5/8) fueron subtipo T, mientras que (2/8) se determinaron como subtipo B y (1/8) fue no B/no T.

Histológicamente, este grupo fue el más variado, se incluyeron los tipos DCGNH, DCPNH, DCINH, y DMCNH con 2 casos para cada uno. Los tipos DCPNH y DCINH fueron de estirpe T, solo uno de los casos de CGNH compartió este fenotipo, y uno del tipo DMCNH fue de estirpe B (Tabla 5).

### Grado alto

El subtipo B se encontró en 6/13 casos, mientras que el subtipo T se detectó en 4/13 casos, 3/13 fueron no B/no T.

Por diagnóstico histológico, en este grupo 10 casos (76.9%) correspondieron al tipo DCGNH, de estos, 4/10 fueron estirpe B, y 3/10 de estirpe T. Solo se encontró un caso del tipo DCPNH siendo de estirpe B y uno del tipo DMCNH de estirpe T. El único caso con patrón folicular se encontró en este grupo y fue de estirpe B (Tabla 5).

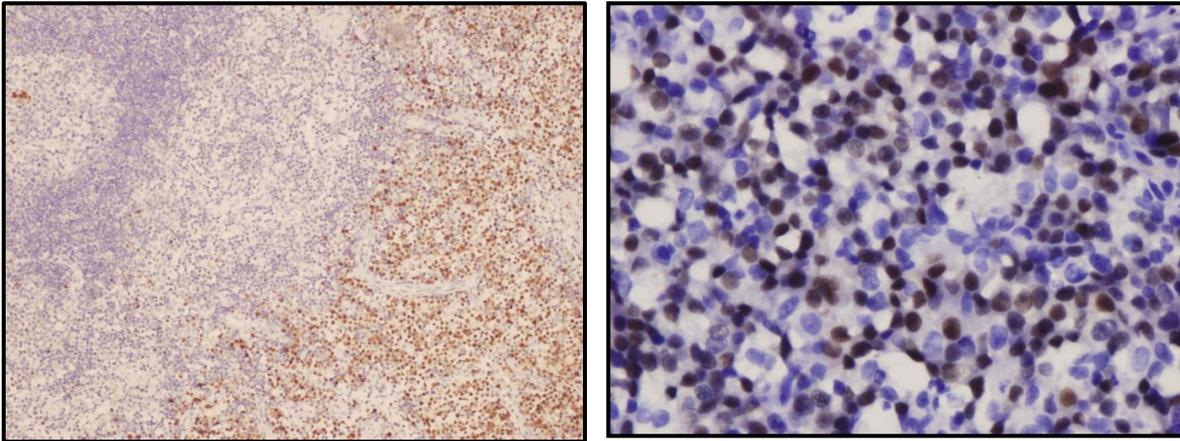
**Tabla 5. Distribución de los LC por grado de malignidad, patrón histológico e inmunofenotipo.**

Grado de malignidad	Tipo histológico	Inmunofenotipo				Total
		B	T	NK	No B/No T	
Bajo 20/41 (48.8%)	DCGNH 40%	2/8	4/8	0	2/8	8
	DCPNH 40%	1/8	2/8	1/8	4/8	8
	DCPDP 5%	0	0	0	1/1	1
	DMCNH 15%	1/3	1/3	0	1/3	3
Intermedio 8/41 (19.5%)	DCGNH 25%	1/2	1/2	0	0	2
	DCPNH 25%	0	2/2	0	0	2
	DICNH 25%	0	2/2	0	0	2
	DMCNH 25%	1/2	0	0	1/2	2
Alto 13/41 (31.7%)	DCGNH 76.9%	4/10	3/10	0	3/10	10
	DCPNH 7.7%	1/1	0	0	0	1
	DMCNH 7.7%	0	1/1	0	0	1
	FMCNH 7.7%	1/1	0	0	0	1

DCGNH: difuso de células grandes no hendidas, DCPNH difuso de células pequeñas no hendidas, DCINH difuso de células intermedias no hendidas, DCPDP difuso de células pequeñas con diferenciación plasmocitoide, DMCNH difuso mixto de células no hendidas y FMCNH folicular mixto de células no hendidas.

### III.4 Expresión de MUM1

La expresión de esta proteína sólo se encontró en 2/41 casos, uno de ellos clasificado como FMCNH de inmunofenotipo B y el otro como DCPDP no B/no T, en la figura 6 se muestra una imagen representativa de la reacción positiva en los linfocitos malignos (Tabla 6).

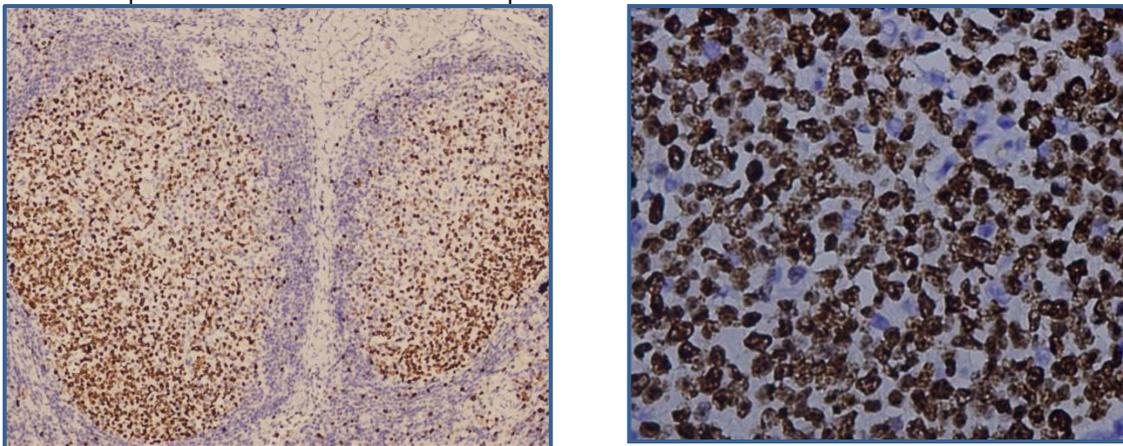


**Figura 6. Expresión inmunohistoquímica de la proteína MUM-1 en linfoma no Hodgkin.** Izq. Corte histológico de ganglio linfático de perro sano mostrando expresión de MUM1 fuera del folículo linfoide 100x, der. Corte histológico de ganglio linfático con diagnóstico de linfoma folicular mixto de células no hendidas donde se aprecia la reacción positiva color café-ocre en el núcleo de los linfocitos malignos 400X. Técnica biotina-streptavidina,

### III.5 Expresión de Ki-67

La expresión de esta proteína (Figura 7) se encontró en el 65.8% (n=27) de los casos, de estos, el 31.7% (n=13) fueron linfomas difusos de células grandes no hendidas, 17.1% (n=7) difuso de células pequeñas no hendidas, 7.3% (n=3) difuso mixto de células no hendidas, 4.9% (n=2) difuso células intermedias no hendidas y los difusos de células intermedias y folicular mixto 2.4% cada uno, el resumen de los resultados se muestran en la tabla 6.

**Figura 7. Expresión inmunohistoquímica de la proteína Ki-67 en linfoma no Hodgkin.** Izq. Corte histológico de ganglio linfático donde se observa la expresión normal de la proteína en un folículo linfoide → 100x. Der. Corte histológico de ganglio linfático donde se observa coloración café-ocre en el núcleo de los linfocitos neoplásicos 400x. Técnica biotina-estreptavidina.



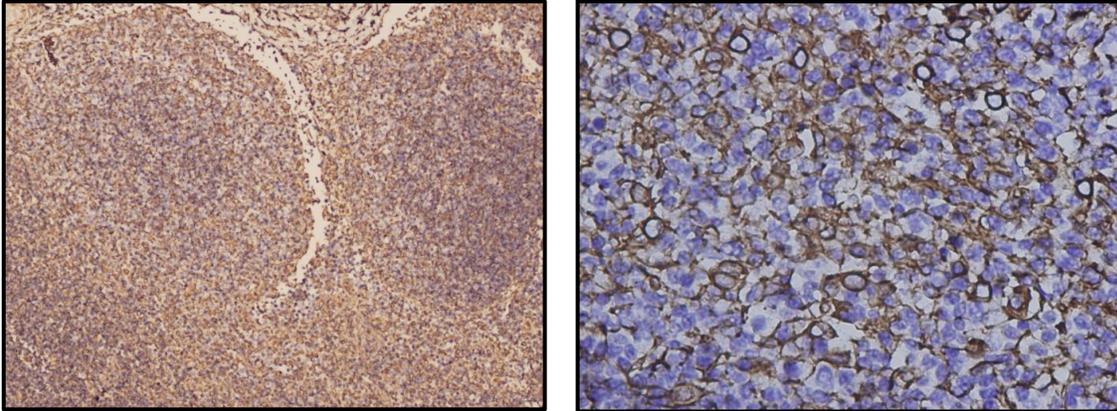
### III.6 Vimentina

La expresión de esta proteína (Figura 8) se dividió por grados de acuerdo al porcentaje de células positivas como leve (50% de células positivas), moderada (75%) e intensa (más del 90%), sin embargo, todas aquellas muestras que expresaron 50% o más se consideraron como reacción positiva. El 87.8% de los casos (n= 36) fueron positivos y el 12.2% (n= 5), no la expresaron, en estos últimos no se encontró predominio de algún tipo histológico o inmunofenotipo. Los resultados se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6. Expresión de las proteínas Ki-67, vimentina y MUM1 por tipo histológico e inmunofenotipo**

Tipo histológico	Inmunofenotipo				Ki-67 +	Vimentina +	MUM1 +
	B	T	NK	No B/no T			
DCGNH 21 (48.8%)	8	8	0	5	13	20	0
DCINH 2 (4.9%)	0	2	0	0	2	2	0
DCPNH 11 (26.8%)	2	4	1	4	7	9	0
DCPDP 1 (2.5%)	0	0	0	1	1	1	1
DMCNH 5 (14.6%)	1	2	0	2	3	3	0
FMCNH 1 (2.5%)	1	0	0	0	1	1	1
<b>TOTAL 41</b>	12	16	1	12	27	36	2

DCGNH: difuso de células grandes no hendidas, DCPNH difuso de células pequeñas no hendidas, DCINH difuso de células intermedias no hendidas, DCPDP difuso de células pequeñas con diferenciación plasmocitoide, DMCNH difuso mixto de células no hendidas y FMCNH folicular mixto de células no hendidas.



**Figura 8. Expresión de vimentina en linfoma no Hodgkin.** Arriba. Corte histológico de ganglio linfático sano con expresión positiva de vimentina 100x, Abajo. Corte histológico de ganglio linfático en el que se observa a nivel citoplasmático la reacción antígeno anticuerpo de coloración café-ocre 400X. Técnica biotina-estreptavidina.

#### IV. DISCUSIÓN.

El linfoma canino es la principal neoplasia hematopoyética en esta especie y una de las que responden mejor a la quimioterapia, alcanzando hasta un 77% de remisiones y periodos de supervivencia por arriba de los 260 días (Greenle y cols., 1990); sin embargo, para poder tener este logro en el tratamiento, se requiere primeramente conocer el tipo celular involucrado, el grado de malignidad, inmunofenotipo y cualquier otro factor involucrado en el pronóstico.

En cuanto al tipo celular, en la actualidad se cuenta con varios esquemas de clasificación de los linfomas caninos, algunos estudios han encontrado relación con el inmunofenotipo, la respuesta al tratamiento y de periodo de supervivencia; algunos otros obtienen que el fenotipo de la neoplasia no es predecible por la morfología celular y por ende, tampoco el pronóstico para esos pacientes. Estos resultados poco concordantes se basan en la falta de una clasificación histológica que sea reproducible en diferentes áreas geográficas y que pueda predecir el desarrollo del linfoma y la respuesta al tratamiento.

En este trabajo, uno de los hallazgos principales fue encontrar un franco predominio del patrón difuso (97.6%) sobre el folicular (2.4%), lo que concuerda con lo reportado previamente por Greenle y cols. (1990), Fournel-Fleury y cols. (1997), Sueiro y cols. (2004), Guija de Arespacochaga y cols. (2007) y Ponce y cols. (2003), quienes obtienen una frecuencia no mayor al 6% de linfoma folicular usando otros esquemas de clasificación.

Respecto a los tipos histológicos, en un estudio de 72 casos Weller y cols. (1980), clasificaron 40 casos como linfoma histiocítico (55.5%) utilizando la clasificación de Rappaport. En otro estudio Greenle y cols. (1990), estudiaron 176 casos de los cuales 83 (47.2%) fueron clasificados como centroblasticos y 45 (25.6%) como inmunoblasticos de acuerdo a la clasificación de Kiel. Usando la misma clasificación, Teske y cols. (1994), estudiaron 95 casos obteniendo que el 54% fueron centroblasticos (n=47) o inmunoblasticos (n=5), mientras que Fournel-

Fleury y cols. (1997), clasificaron 38 casos (41.3%) como centroblasticos y 13 inmunoblasticos (14.1%). Respecto a los resultados de este estudio, se incluyeron estos subtipos en una sola categoría, como linfoma de células grandes (CGNH) en 21/41 casos evaluados (48.8%) lo que concuerda con la frecuencia obtenida en los estudios antes referidos, a pesar de utilizar sistemas de clasificación diferentes.

Los linfomas linfocíticos de células pequeñas, en otras clasificaciones se han asociado a bajo grado de malignidad por lo que su frecuencia es baja, Guija de Arespachoga y cols. (2007) obtuvieron 1.2%, Dobson y cols. (2001) un 12%, mientras que Greenlee y cols. (1990); Fournel-Fluery y cols. (1997) y Teske y cols. (1994), obtuvieron menos del 4 %. En otro estudio, Carter y cols. (1986), encontraron una mayor incidencia (24%), lo que concuerda con los resultados de este trabajo, donde se obtuvo una frecuencia de 26.8% de casos de LDCPNH.

Respecto al grado de malignidad, Carter y cols. (1986); Greenlee y cols. (1990); Teske y cols. (1994); Fournel-Fleury y cols. (1997); Dobson y cols. (2001) han encontrado que los linfomas de alto e intermedio grado de malignidad, son los más frecuentes (80%) y que el tipo histológico más asociado es el DCGNH. Por otro lado, los linfomas de bajo grado se reportan como poco frecuentes (no más del 15%) y se asocian con el tipo histológico de DCPNH, Álvarez y cols. (2009), reportaron mayor incidencia de casos de bajo grado de malignidad (22.6%). En este trabajo se encontró mayor incidencia (48.8%) de linfomas de bajo grado de malignidad, sobre el 31.7% y 19.5% de linfomas de alto grado e intermedio, respectivamente (tabla 4), lo que difiere importantemente respecto a lo informado por los otros estudios. Los linfomas de bajo grado no se relacionaron con ningún tipo histológico, pero los de alto grado sí se asociaron con linfomas de células grandes no hendidas.

Respecto a la frecuencia del inmunofenotipo, Fournel-Fleury y cols., 1997, Kosarek y cols., 2002, Caniatti y cols., 1996 y Dobson y cols., 2001, han reportado una incidencia de linfomas de estirpe B mayor a 70%, mientras que Teske y cols.

(1994), obtuvieron menos del 60% y Álvarez y cols. (2009), informaron el 42% de este inmunofenotipo. En este trabajo la prevalencia de fenotipo B fue de 29.3% debido a que sólo pudieron tipificarse el 70% de los casos estudiados; sin embargo, si se toman en cuenta únicamente estos últimos, la prevalencia alcanza el 41.4% lo que concuerda con lo obtenido por Álvarez y cols. (2009), en una población de la misma área geográfica.

Algunos estudios realizados en Europa han reportado que los linfomas de estirpe T tienen una frecuencia del 20-30% (Fournel-Fleury y cols. 1997; Kosarek y cols. 2002 y Dobson y cols., 2001), sin embargo otros estudios (Teske y cols. 1994; Álvarez y cols., 2009), han encontrado frecuencias superiores a 40% en Europa y México. En este trabajo, el 39% de los linfomas fueron de inmunofenotipo T, lo que coincide con lo reportado previamente en una población canina en la misma área geográfica (Álvarez y cols., 2009), lo que puede sugerir que la frecuencia del inmunofenotipo en esta población está relacionada a factores como el ambiente, tipo de alimentación o raza, por mencionar algunos.

Hasta la fecha no se ha reportado en medicina veterinaria el linfoma de células NK, mientras que en la población humana se reconoce con una frecuencia muy baja (Liang y col., 2008). Un hallazgo relevante en este trabajo, es el haber encontrado, aunque sea en una frecuencia baja (2.4%) linfomas de estirpe NK, lo que coincide con lo reportado en medicina humana; sin embargo, como en esta especie, se requiere utilizar otros marcadores para poder confirmar o diferenciar un linfoma de células NK (CD56+, CD3-, CD4+/-, CD19-, CD20-, CD13- y CD33-) de una leucemia/linfoma más agresivo de células NK (CD56+, CD3-, CD16+/-, CD57- y CD94+) (Valdivia-Ferrufino y cols., 2010).

Los linfomas nulos o no B/no T se han reportado con baja frecuencia (5 – 9 %) independientemente del área geográfica (Álvarez y cols. 2009; Caniatti y cols. 1996; Dobson y cols. 2001; Teske y cols. 1994, Wilkerson y cols., 2005). En este trabajo a diferencia de lo reportado, se encontró una frecuencia mayor (29.3%). Una de las razones que puede estar relacionada con este hecho es la pérdida de expresión

del antígeno ya que se conoce que el tejido de perro es más sensible a la fijación y procesamiento en parafina que el tejido humano (Appelbaum y cols., 1984), en este estudio se desconoce cómo se realizó el proceso de fijación al cual fueron sometidas las muestras, ya que fueron proporcionadas por diferentes centros veterinarios.

Se ha reportado la asociación entre el tipo histológico y el inmunofenotipo (Fournel-Fleury y cols., 1997 y Guija de Arespacochaga y cols., 2007) por lo que los linfomas de alto grado se asocian principalmente con linfomas de CGNH de estirpe B y los linfomas de bajo grado de malignidad se relacionan con inmunofenotipo T y un patrón histológico de CPNH. En este trabajo, se encontró asociación entre el grado de malignidad e inmunofenotipo independientemente del tipo histológico involucrado (Tabla 5). Así, los linfomas de alto grado presentaron mayor frecuencia de estirpe B que de T, los linfomas de grado intermedio de malignidad se asociaron con estirpe T y la mayoría de los de bajo grado de malignidad fueron no B/no T. Teske y cols. (1994), Dobson y cols. (2001) y Ponce y cols. (2004), han reportado que el tipo histológico no sirve para identificar el inmunofenotipo celular lo que coinciden con los resultados de este trabajo, donde el tipo LDCGNH presenta la misma frecuencia de casos B o T y el LDCPNH presentó mayor frecuencia de estirpe no B/no T.

MUM1/IRF4 es uno de los factores de transcripción del interferon, su expresión denota el paso final de la diferenciación de la célula B en el centro germinal con maduración hacia célula plasmática. Se expresa normalmente en las células plasmáticas y en las células del centro germinal, en humanos se ha asociado en 50-77% de linfomas no Hodgkin difusos, el conjunto MUM1, bcl-6 y CD10 (CALLA) definen las características del linfoma de centro germinal que se ha asociado con una supervivencia larga por lo que se le considera un factor de buen pronóstico (Hans y cols., 2004). En este estudio encontramos la expresión de la proteína en dos casos, uno de ellos de fenotipo B y clasificado como FMCNH podría estar asociado a células B activas, mientras que el otro no B/no T clasificado como DCPDP podría relacionarse principalmente con una neoplasia de células

plasmáticas. Para ambos casos lo ideal sería utilizar otros marcadores como CD10, bcl-6, CD38, CD138 que presenten reacción cruzada con tejido canino para establecer una clasificación y pronóstico más específico.

Respecto al índice de proliferación, Fournel-Fleury y cols. (1997) reportaron una alta concordancia entre el grado de malignidad e índice proliferativo, mientras que Kiupel y cols. (1999), Scholzen y col. (2000), Stanislaw, (2007), informaron que la expresión de la proteína no representa un beneficio adicional al evaluarse junto con la clasificación histológica e inmunofenotipo ya que un alto índice mitótico indica alto grado de malignidad y pobre pronóstico. En este trabajo la expresión de la proteína se presentó en 65.8% de los casos (n=27), al hacer el análisis de la expresión de Ki-67 respecto al tipo histológico, grado de malignidad e inmunofenotipo, no se obtuvieron resultados relevantes, sin embargo, de manera general se puede decir que más de la mitad de los linfomas están proliferando independientemente del tipo histológico e inmunofenotipo involucrados, por lo que sería conveniente hacer un seguimiento de la expresión de la proteína en un estudio prospectivo para determinar su valor pronóstico.

La vimentina, en la mayor parte de los tumores ya sean benignos o malignos, conserva el patrón de distribución de la célula originaria del tumor de modo que su identificación inmunohistoquímica facilita el diagnóstico de las neoplasias. En este trabajo el 87.8% de los casos expresaron la presencia de vimentina lo que confirma el origen mesenquimal de la neoplasia, el 12.2% de los casos que no la expresaron, podrían estar relacionados con una fijación inadecuada del tejido y por consiguiente, con la pérdida de expresión de antígeno. Aquellos casos que expresaron la proteína de forma intensa pero que no se logró determinar el fenotipo, indican que el proceso de fijación de la muestra fue adecuado pero que a pesar de que la morfología fue típica de linfoma, podría no tratarse de esta neoplasia sino de otro tumor de origen mesenquimal por lo que se debe ampliar la gama de anticuerpos utilizados en el perro para poder hacer un diagnóstico diferencial con otros tumores de origen mesenquimatoso.

## V. CONCLUSIONES

- La clasificación histológica propuesta en este trabajo considerando el tipo histológico no se correlaciona con el inmunofenotipo; sin embargo, el grado de malignidad si presenta correlación con el inmunofenotipo y el índice de proliferación.
- El inmunofenotipo T fue el más frecuente en esta población y podría estar influenciado por factores no considerados en este trabajo.
- Es baja la incidencia de linfomas de células NK en perros, tal como ocurre en la especie humana.
- La expresión de MUM-1 es poco frecuente en linfoma canino; sin embargo, su evaluación junto con otros marcadores puede servir como factor pronóstico.
- La expresión de Ki-67 no es un factor pronóstico confiable.
- La expresión de vimentina confirmó el origen mesenquimal de las células neoplásicas.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. 5ª Ed, Elsevier Science, España, 2004.
- 2.- Alvarez F, Aburto E, Aristi G, Chávez G. Estudio histológico e inmunofenotípico de linfoma canino en el centro de México. *Vet. Mex.* 40:141-155, 2009.
- 3.- Appelbaum FR, Sale G, Storb R, Charrier K, Deeg H, Graham T, Wulff J. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. *Haematol Oncol*, 2:151-168.1984.
- 4.- Baskin CR, Couto CG, Wittum TE. Factors Influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study. *J Am Anim Hosp Assoc*; 36: 404-409. 2000.
- 5.- Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol*; 138: 648-655. 1987.
- 6.- Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore P. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet. Pathol* 33:204-212. 1996.
- 7.- Carter RF, Valli VEO, Lumsden JH. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. *Can J Vet Res*; 50:154-164. 1986.
- 8.- Dhaliwal R, Kitchell B. Canine lymphosarcoma: clinical features. *Compendium* 25:572-580. 2003.
- 9.- Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P, Hoather TM, Tom BDM. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract*; 42: 377-384. 2001.
- 10.- Ettinger SN. Principles of treatment for canine lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract*; 18: 92-97. 2003.
- 11.- Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, Pacini R, Alunni C, Natali-Tanci L, Ugolini B, Sebastiani C, Cattoretti G, Pileri S, Dalla-Favera R, Stein H. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 95: 2084-2092. 2000
- 12.- Fernandez NJ, West KH, Jackson ML, Kidney BA. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Vet Pathol*; 42: 437-445. 2005.
- 13.- Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Marchal T, Channe L, Delverdier A, Bryon PA, Felman P. Cytohistological and immunological classification of

- canine malignant lymphomas: Comparison with human Non-Hodking's lymphomas. *J. Comp. Pathol*; 117 35-39. 1997.
- 14.- Fournel-Fleury C, Ponce F, Felman P, Blavier A, Bonnefont C, Chabanne L, Marchal T, Cadore JL, Goy-Thollot I, Ledieu D, Ghernati I, Magnol JP. Canine T-cell lymphomas: A morphological, immunological and clinical study of 46 new cases. *Vet Pathol*; 39: 92-109. 2002.
  - 15.- García-Vazquez F. Manual de inmunohistoquímica. Laboratorio de Patología molecular, Depto. Patología. Instituto Nacional de Pediatría. 2008
  - 16.- Greenlee P, Filippa D, Quimby F, Patnaik A, Calvano S, Matus R, Kimmel M, Hurvitz A, Lieberman P. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic and clinical study. *Cancer* 66:480-490. 1990.
  - 17.- Guija de Arespacochaga A, Schwendenwein I, Weissenboeck H. Retrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *J. Comp. Pathol.* 136, 186-192. 2007.
  - 18.- Hans C, Weisenburger D, Greiner T, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink H, Campo E, Braziel R, Jaffe E, Pan Z. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*; 103:257-282. 2004.
  - 19.- Keller ET. Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. *Cancer* 7:2334-2337. 1992.
  - 20.- Keller S, Keller B, Grest P, Börger T, Güscetti F. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical analyses of canine lymphomas. *Vet. Diagn. Invest.* 19:652-659. 2007
  - 21.- Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiol Rev* 20: 204-217, 1998.
  - 22.- Kiupel M, Teske E, Bostock D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol*; 36: 292-300. 1999.
  - 23.- Kosarek C, Kisseberth W, Kociba G. Use of microarrays for analysis of canine lymphoma. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Annual Conference of the Veterinary Cancer Society* 22. 2002.
  - 24.- Kusec R. Molecular and genetic mechanisms of lymphomagenesis. Review., *Croat. Med. Journal*, 43(5): 519-525. 2002
  - 25.- Liang X, Graham D. Natural killer cell neoplasms. *Cancer*;112:1425-36, 2008.
  - 26.- Lilenbaum A, Legagneux V, Portier M, Dellagi K, Paulin D. Vimentin gene: expression in human lymphocytes and in Burkitt's lymphoma cells. *The EMBO Journal*, 5, 2809-2814, 1986.
  - 27.- Meuten JD. Tumors in domestic animals. 4<sup>th</sup> ed. Iowa State Press, USA, 2002.
  - 28.- Minin AA, Moldaver MV. Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution. *Biochemistry (Moscow)*. 73 (13) 1453-1466. 2008.

- 29.- Möller P, Momburg F, Hofmann WJ, Matthaei-Maurer DU. Lack of vimentin occurring during the intrafollicular stages of B cell development characterizes follicular center cell lymphomas. *Blood*, 71(4), 1033-1038. 1988.
- 30.- Morris J, Dobson J. *Oncología en pequeños animales*. Intermedica XXI, Buenos Aires, Argentina, 2002.
- 31.- Morrison WB. *Cancer in dogs and cats. Medical and surgical management*. Williams and Wilkins editors, USA, 1998.
- 32.- Moulton JE, Harvey JW. *Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues in Tumor in domestic animals*. 3<sup>rd</sup> ed. LA California, USA, 1990.
- 33.- Phillips BS, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma *J Vet Diagn Invest*; 12: 111–117. 2000.
- 34.- Ponce F, Magnol JP, Ledieu D, Marchal T, Turinelli V, Chalvet-Monfray K, Fournel-Fleury C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *The Vet Journal* 167:158-166. 2004.
- 35.- Ramos-Vara J, Miller M, Valli V. Immunohistochemical detection of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine plasmacytoma: comparison with CD79 and CD20. *Vet. Pathol.* 44:875-884. 2007.
- 36.- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker M, Key G, Flad H, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *The J. of cell Biol* 123:512-522. 1993.
- 37.- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J of Cell. Physio.* 182:311-322. 2000.
- 38.- Sözmen M, Tasca S, Carli E, De Lorenzi D, Furlanello T, Caldin M. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 323-329.
- 39.- Stanislaw D. Immunocytochemical and cytomorphometric diagnosis of malignant lymphomas in dogs. Department of pathology, pathophysiology, microbiology and forensic veterinary medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Agricultural Academy, Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*; 51: 71-78 2007.
- 40.- Sueiro FAR, Alessi AC, Vassallo J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 Cases, with observations on p53 immunoreexpression. *J Comp Pathol*; 131: 207-213. 2004.
- 41.- Sueiro RF, Carlos AA, Aparecido CC, Aparecida PG, Vassallo J.. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *J Bras Patol Med Lab*; 41: 263-270. 2005.

- 42.- Szczuraszek K, Mazur G, Jelen M, Dziegiel P, Surowiak P, Zabel M. Prognostic significance of Ki-67 antigen expression in non-Hodgkin lymphoma. *Antican Res* 28: 1113-1118. 2008.
- 43.- Teske E, de Vos JP, Egberink HF. Clustering in canine malignant lymphoma. *Vet Q* 16:134-136, 1994.
- 44.- Thomas R, Smith KC, Gould R, Gower SM, Binns MM, Breen M. Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade canine T-lymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers. *Chrom Res* 9: 649-657 2001.
- 45.- Thomas R, Smith KC, Ostrand EA, Galibert F, Breen M. Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridization and a panel of single locus probes. *British J of Cancer* 89: 1530-1537 2003.
- 46.- Tozon N, Strbenc M, Fazarinc G. Detection of canine T lymphocytes in lymphoma-affected lymph nodes using antibodies directed against the human CD3 antigen. *Slov Vet Res* 40: 75-80 2003.
- 47.- Valdivia-Ferrufino D, Assis M, Pérez-Romano B, Fragoso-Flores J, Ruiz-Argüelles A. Neoplasias de células NK: informe de catorce casos estudiados en una sola institución. *Hematología*: 11129-135 2010.
- 48.- Voduc D, Kenney C, Nielsen T. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol.* 18: 89-97 2008.
- 49.- Weller RE, Holmberg CA, Theilen GH, Madewell BR. Histologic classification as a prognostic criterion for canine lymphosarcoma. *Am J Vet Res* 4:1310-4, 1980.
- 50.- Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T, Shuman W, Chun R, Garrett L, Barber L, Avery A. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106: 179-196 2005.
- 51.- Willmann P, Müllauer L, Guija de Arespacochaga A, Reifinger M, Mosberger I, Thalhammer JG. Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B and B-cell marker. *Vet. Immunol. Immunopathol* 128: 359-365, 2009.
- 52.- Winkler S, Murua EH, Reimann-Berg N, Bullerdiek J, Nolte I. Cytogenetic investigations in four canine lymphomas. *Antican Res* 25:3995-3998 2005.