

# ***LINFOMAS CANINOS***

***Estudio óptico, electrónico e inmunohistoquímico***

***Proliferación y ploidía***

Tesis presentada por:  
***Carmen Sanz Rivas***

Directores:  
***María Castaño***  
***Horacio Oliva***

Dpto. de Patología Animal II  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid

Dpto. de Anatomía Patológica  
Fundación Jiménez Díaz  
Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Medicina

Madrid, 1998



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**



**Fundación Jiménez Díaz**

**CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION**

**Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)  
28040 - MADRID**

**INFORME SOBRE EL TRABAJO:**

**“LINFOMAS CANINOS. Estudio óptico, electrónico e inmunohistoquímico. Proliferación y ploidía”.**

Presentado por Carmen Sanz Rivas para optar al título de Doctora en Veterinaria

Los linfomas constituyen una de las neoplasias frecuentes en perros. Su estudio, al igual que en humanos, necesita de una metodología múltiple y de una correlación clínico-evolutiva.

En el presente trabajo se han abordado los distintos aspectos de diagnóstico morfológico e inmunofenotípico. Así mismo se han estudiado dos factores pronóstico interesantes, la proliferación y la ploidía con distintos anticuerpos y diferentes citometrías.

Dada la alta agresividad en el grupo de tumores elegido, la correlación clínico-evolutiva ha sido acorde con la presentada en las neoplasias agresivas y el estudio estadístico ha señalado puntos de interés a considerar en nuevos enfoques.

El presente trabajo ha sido realizado con metódica actualizada y rigor científico, por lo que creemos que reúne las condiciones exigidas para ser presentado como Tesis Doctoral.

Madrid, octubre de 1998

**María Castaño**  
**Catedrática de Anatomía Patológica**  
**Directora de Tesis**

**Horacio Oliva**  
**Catedrático de Patología**  
**Director de Tesis**

## **AGRADECIMIENTOS**

Es difícil, después de realizar un trabajo largo y complejo como es una TESIS DOCTORAL, recordar y citar a todas las personas que habría que incluir en los agradecimientos finales, ya que cualquier olvido podría ser mal interpretado.

Por esa razón es quizás más adecuado hacerlo en principio a las Instituciones que me han permitido y proporcionado material y metodología para la realización del estudio.

La Facultad de Veterinaria de la UCM y a su Departamento de Patología Animal II, en especial Anatomía Patológica e Histología con todos los facultativos y técnicos, como Elena de Patología Médica, han de ser los primeros citados, por la facilitación en la realización de necropsias y la recogida de historias clínicas. Soy consciente de que sin el apoyo de Pedro, Pilar, Belén, Antonio, Eduardo, Laura y los demás todo hubiera sido más costoso.

En segundo lugar el Departamento de Patología de la Fundación Jiménez Díaz UAM, donde realicé toda la metodología aplicada, al Servicio de Inmunología por los datos de la CMF y a la Fundación Conchita Rábago que financió parte de mi estancia en dicho Centro.

En cuanto a las personas, sin olvidar a los directores de Tesis, Horacio Oliva y María Castaño, quisiera recordar a todos: facultativos veterinarios, médicos y biólogos, técnicos de laboratorio general e IHQ, sobre todo a Trinidad Carrizosa, por sus consejos, enseñanzas y simpatía.

A Pilar Rodicio por su eterna sonrisa, cariño, constancia y confianza incondicional. Sin ella el paso por la Fundación no habría tenido ni punto de comparación.

Mis mejores deseos y total gratitud para las oncólogas Ana Ageitos y Lola Pérez de Alenza, las cuales me enseñaron a comprender la correlación clínico-patológica de la enfermedad con seriedad científica y el respeto por el enfermo. Espero que la Sanidad, tanto humana como animal, se llene de personas así.

Un recuerdo especial para las amigas Beatriz y Gema (las mejores para el desarrollo técnico) y la familia, en especial a mi hermana Elena, porque un trabajo de Tesis es tarea que a veces dificulta las relaciones normales y sólo grandes dosis de tolerancia y cariño pueden llevarla a buen fin. También recordar a todos mis amigos que han soportado mis rarezas durante casi cuatro años con gran paciencia. En concreto, gracias a Macarena por dar forma a todos estos textos realizando la edición final del manuscrito y por estar siempre ahí.

A mi tía Fanfi por la confianza que ha puesto en mí desde el principio y todas las enseñanzas en el "arte" de la citología y de la vida.

Mi madre es la última citada, porque no creo que existan palabras para definir lo que ha hecho por este trabajo y por mí. Ha sido la única en confiar en que todo este esfuerzo se plasmara en algo, y en poder combinar con éxito la ecuación madre-jefa-profesora. Fue mi principal impulsora y espero que esta tesis constituya lo que ella habría esperado.

Soy veterinaria por el amor que siento hacia los animales. Agradezco a todos ellos lo que me han enseñado y espero que este trabajo, unido a los muchos actuales, les proporcionen a corto plazo mejores posibilidades de supervivencia.

A todos los que de alguna forma han cooperado conmigo y he olvidado nombrar.

## **ABREVIATURAS**

**Ag** = Antígeno.

**ABC**= Complejo ABC: Avidina-Biotina.

**Ac** = Anticuerpo.

**AcMo** = Anticuerpo monoclonal.

**AcPo** = Anticuerpo policlonal.

**ADN** = Ácido desoxirribonucleico.

**B1** = Célula B sin memoria inmunológica.

**B2** = Célula B con memoria inmunológica.

**bcl-1** = Oncogen.

**bcl-2** = Oncogen.

**CB** = Centroblasto.

**CC** = Centrocito.

**CME**= Citometría estática.

**CMF** = Citometría de flujo.

**C3b** = Fracción 3b del complemento.

**DRC** = Células dendríticas del centro del folículo.

**drc** = Células dendríticas del manto folicular.

**EBV** = Virus de Epstein-Barr.

**ELISA** = Enzyme linked immunosorbent assay.

**FAIDS** = Ver SIDA.

**FeLV** = Virus de la Leucemia felina.

**FeSV** = Virus del sarcoma felino.

**FIV** = Virus de la inmunodeficiencia felina.

**FOCMA** = Antígeno de la membrana celular del oncornavirus felino / Feline oncornavirus cell membrane antigen.

**HM** = Células histiomonocíticas.

**IB** = Inmunoblasto.

**IDC** = Células interdigitantes.

**IFI** = inmunofluorescencia indirecta.

**Ig** = Inmunoglobulina.

**IgFC** = Zona de fijación antigénica de las inmunoglobulinas (fracción constante).

**IgH** = Cadena pesada de Ig.

**IHQ** = Inmunohistoquímica.

**IL** = Interleukina.

**L** = Linfoma.

**LDH** = Láctico-dehidrogenasa.

**LLA** = Leucemia aguda linfoblástica.

**LLC** = Leucemia linfática crónica.

**LMF** = Linfoma del manto folicular.

**LNH-B** = Linfomas no Hodgkin B.

**Lpl** = Linfoplasmocitario.

**MALT** = Tejido linfoide asociado a mucosas.

**ME** = Microscopía electrónica.

**MF** = Micosis fungoide.

**PAAF** = Punción aspiración con aguja fina.

**PI** = Índice proliferativo (Proliferation Index).

**PO** = Peroxidasa.

**QDA** = Programa de Análisis del ADN (Quantitative DNA Analysis Programme).

**QT** = Quimioterapia.

**RC** = Remisión completa.

**RP** = Remisión parcial.

**RN** = Receptores nucleares.

**RER** = Retículo endoplásmico rugoso.

**RP** = Remisión parcial.

**SIDA** = Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (FAIDS: Feline acquired immunodeficiency syndrome -SIDA Felino).

**SNC** = Sistema Nervioso Central.

**SNP** = Sistema Nervioso Periférico.

**STABC** = Complejo Streptavidina-Biotina.

**TVT** = Tumor venéreo transmisible.

**VIH** = Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV: human immunodeficiency virus).

## ÍNDICE

## AGRADECIMIENTOS

## ABREVIATURAS

### I.- PROPÓSITOS Y OBJETIVOS ..... 1

### II.- INTRODUCCIÓN:

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| A.- SISTEMA LINFOIDE; ORGANIZACIÓN .....                                      | 3  |
| B.- ÁREA B; FOLÍCULO LINFOIDE SECUNDARIO .....                                | 4  |
| C.- EL ÁREA T O INTERFOLICULAR .....                                          | 8  |
| D.- CONTRAPARTIDAS TUMORALES .....                                            | 10 |
| D1. <i>Linfomas B</i> .....                                                   | 10 |
| D2. <i>Linfomas T</i> .....                                                   | 11 |
| E.- BIOPATOLOGÍA DE LAS NEOPLASIAS LINFOIDES .....                            | 11 |
| F.- PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS .....                 | 13 |
| F.1. <i>Presentación en el perro</i> .....                                    | 13 |
| F.2. <i>Presentación en otras especies; linfoma-leucemia en el gato</i> ..... | 13 |
| F.3. <i>Clasificación clínico-anatómica en animales domésticos</i> .....      | 17 |
| F.4. <i>Estadios clínicos en mamíferos</i> .....                              | 17 |
| F.5. <i>Historia clínica y diagnóstico</i> .....                              | 18 |
| F.6. <i>Tratamiento. Quimioterapia</i> .....                                  | 20 |
| G.- TÉCNICAS ESPECIALES DE ESTUDIO .....                                      | 23 |

### III.- MATERIAL Y MÉTODOS

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A.- CASUÍSTICA .....                                                                  | 25 |
| B.- MORFOLOGÍA ÓPTICA. ....                                                           | 25 |
| C.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. ....                                                     | 26 |
| D.- INMUNOHISTOQUÍMICA .....                                                          | 28 |
| D.1. <i>Procedimiento manual</i> .....                                                | 28 |
| D.2. <i>Procedimiento automático</i> .....                                            | 31 |
| D.3. <i>Consideraciones técnicas para la realización y valoración de la IHQ</i> ..... | 32 |
| D.4. <i>Anticuerpos utilizados en IHQ</i> .....                                       | 33 |

|                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| E.- ACTIVIDAD PROLIFERATIVA NUCLEAR .....                    | 35  |
| E.1. <i>Anticuerpos monoclonales de proliferación</i> .....  | 36  |
| E.2. <i>Analizador de imagen</i> .....                       | 37  |
| F.- ESTUDIO CITOMÉTRICO .....                                | 39  |
| F.1. <i>Citometría estática</i> .....                        | 40  |
| F.2. <i>Citometría de flujo</i> .....                        | 43  |
| F.3. <i>Valoración del ciclo celular en citometría</i> ..... | 44  |
| G.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....                               | 45  |
| <br><b>IV.- RESULTADOS</b>                                   |     |
| A.- HALLAZGOS CLÍNICOS .....                                 | 46  |
| B.- AFECTACIÓN NECRÓPSICA TUMORAL .....                      | 47  |
| C.- MORFOLOGÍA ÓPTICO-ELECTRÓNICA .....                      | 50  |
| D.- PATRONES DE TINCIÓN EN INMUNOHISTOQUÍMICA .....          | 51  |
| E.- CINÉTICA TUMORAL .....                                   | 54  |
| F.- ESTUDIO ESTADÍSTICO .....                                | 55  |
| <br><b>V.- ICONOGRAFÍA</b>                                   |     |
| A.- TABLAS .....                                             | 58  |
| B.- FIGURAS .....                                            | 65  |
| <br><b>VI.- DISCUSIÓN.</b>                                   |     |
| A.- CONSIDERACIONES GENERALES. ....                          | 107 |
| B.- CONSIDERACIONES DEL GRUPO DE ESTUDIO. ....               | 111 |
| C.- CONSIDERACIONES BIODINÁMICAS. ....                       | 113 |
| <br><b>VII.- CONCLUSIONES.</b> .....                         | 118 |
| <br><b>VIII.- BIBLIOGRAFÍA.</b> .....                        | 120 |

## **I.- PROPÓSITOS Y OBJETIVOS**

Los procesos linfoproliferativos, dentro de las neoplasias malignas muestran una incidencia *ascendente en los humanos*, que se relaciona en parte con el aumento de la inmunodepresión, sobre todo la adquirida: trasplantes y SIDA. La dificultad que acompaña a este grupo tumoral engloba distintos conceptos de diagnóstico y tratamiento; a pesar de una investigación continua, los linfomas continúan siendo actualidad porque su conocimiento completo está unido al avance inmunológico y terapéutico.

La semejanza del sistema linfoide humano y animal, no sólo mamíferos sino también especies inferiores, *hace a priori muy interesante la consideración comparativa de sus neoplasias*. Así mismo puede servir para constatar la ayuda que los datos a nivel humano aportan en el conocimiento de estos tumores.

El presente trabajo estudia los linfomas en la raza canina, de una incidencia superior a la humana y con etiología y epidemiología no conocidas. No se han encontrado en ellos oncogenes causantes de traslocaciones repetitivas, pero sí una probable implicación de los genes supresores. Ninguno de los virus linfotropos responsables de linfomas en el hombre actúa en el perro (ni el virus de Epstein-Barr (EBV) relacionado con el linfoma endémico africano de naturaleza B o linfoblástico tipo Burkitt, ni el HTLV-I, retrovirus condicionante del linfoma-leucemia agresivo de linfocitos T, endémico del Japón e islas del Caribe). Aunque en el gato se conoce que los virus de la leucemia felina (FeLV) y de la inmunodeficiencia felina (FIV) están implicados en linfomas y leucemias por la inducción previa de un estado de inmunodeficiencia, se duda de una etiología viral relacionada con los tumores linfoides del perro.

Para la consideración de esta patología animal, interesante y difícil, se utilizan conceptos semejantes a los descritos en patología humana. Existen discretas variantes en la clínica, estadiaje y terapia, y para su correcta evaluación morfológica se han de incluir de forma necesaria nuevas metodologías.

En cuanto a la clasificación de los tumores, en el presente trabajo se ha seguido la modalidad humana, quizás no totalmente adecuada, porque estas neoplasias en la mayoría de las series publicadas y en los casos que aquí se consideran, son casi siempre de alta agresividad. No obstante, las clasificaciones de Kiel y Working-Formulation, que consideran los linfomas según los distintos grados de malignidad, parece que *cumplen de forma adecuada los objetivos de esta tesis*.

Dado que no hay que olvidar que parte de los linfomas caninos no sólo surgen en ganglios, sino en piel, timo o aparato digestivo, se recogen también los conceptos de la escuela inglesa de los linfomas extraganglionares (Isaacson), la revisión europea-americana REAL, y la última propuesta de la OMS (para clasificar los linfomas) que engloban linfomas nodales y extranodales. No obstante, dado que los distintos subtipos descritos en las clasificaciones generales humanas, resultan con frecuencia poco superponibles con los hallazgos encontrados a nivel animal, parece que los linfomas animales, todos no Hodgkinianos, se deberían considerar por el lugar anatómico donde surgen, por la semejanza con las células que los originan

y por las características biológicas de las mismas, las cuales incluyen métodos biodinámicos para la valoración objetiva de la agresividad.

Los estudios de linfomas animales realizados hasta la actualidad, abarcan las características clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas (IHQ) con anticuerpos monoclonales (AcMo) en congelación, dirigidos anti-antígenos (Ag) animales. Faltan trabajos en los que la IHQ se realice con métodos y anticuerpos (Ac) en cortes parafinados, semejantes a los utilizados en patología humana, casi todos comerciales y con alta definición, que por su probable reacción cruzada, o por ser extensivos a mamíferos, permitan un mejor reconocimiento celular y así una correcta tipificación del tumor.

El presente estudio tiene como objeto entender la biología neoplásica en el animal y saber si los distintos linfomas muestran rasgos diferenciales o comunes en su presentación clínica, diagnóstico morfológico, inmunofenotípico, biodinámico y respuesta al tratamiento. Para ello se han elegido casos representativos que aúnen material idóneo para el diagnóstico morfológico multidisciplinario, lo que exige tomas rápidas post mortem o biópsicas, así como protocolos completos clínico-evolutivos.

El material procede del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid-UCM y las técnicas se han realizado en el Departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid-UAM, Centro de Referencia de Patología Linfoide, con experiencia adecuada en el diagnóstico actualizado morfológico ganglionar.

Los objetivos concretos especificados se citan a continuación:

- 1.- Estudio clínico - evolutivo
- 2.- Estudio morfológico necrópsico, con técnicas de rutina, microscopía electrónica e inmunohistoquímica, con marcadores mono y policlonales.
- 3.- Estudio biodinámico de las biopsias con marcadores proliferativos para posterior cuantificación en un analizador de imagen CAS 200.
- 4.- Estudio del ADN con citometría de flujo y estática.
- 5.- Estudio estadístico de los resultados.

## **II. - INTRODUCCIÓN**

## A.- SISTEMA LINFOIDE; ORGANIZACIÓN.

Para una correcta comprensión de la inmunopatología de los procesos linfoproliferativos, se deben conocer los cambios tanto morfológicos como inmunofenotípicos que ocurren durante la transformación linfocitaria, la embriogénesis y diferenciación fisiológica así como la división de los linfocitos en subgrupos funcionales, con el patrón de circulación y anidamiento de los mismos [Taylor CR, 1982].

Desde que se hicieron las primeras descripciones del linfocito en 1774 hasta los últimos años, se ha avanzado mucho en el conocimiento dinámico del sistema celular linfoide, no hay que olvidar que hacia 1958 se dudaba de la función linfocitaria, o de aquella "célula con atributos morfológicos poco definidos" [Mitchell J et al, 1978].

Las células del sistema inmune, sobre todo los linfocitos, se distribuyen en órganos linfoides, donde forman microambientes intercomunicados con alta especialización, que facilitan el atrapamiento antigénico, su catabolismo, el tráfico linfocitario y la estimulación y diferenciación ordenada de células efectoras [Kay NE et al, 1979; Banks WJ, 1993].

Se pueden diferenciar tres compartimentos de maduración linfoide: A) células germinales, B) órganos linfoides centrales de maduración linfocitaria T o B antígeno-independientes (timo y equivalentes humanos de la Bursa de Fabricio de las aves) y C) órganos linfoides periféricos, de generación y difusión de respuesta inmune post-estimulo antigénico (ganglios linfáticos, bazo y sistema linfoide asociado a mucosas: MALT) [Linch PC et al, 1982; Isaacson PG et al, 1983; Spencer J et al, 1986].

La célula madre, totipotencial hematopoyética o célula STEM, se origina en los islotes hematopoyéticos del saco vitelino del embrión, en el hígado fetal y después del nacimiento en la médula ósea (MO), dando lugar a las diferentes series hematopoyéticas, incluida la linfoide, objeto de este trabajo [Ryser JE et al, 1974; Mitchell J et al, 1978; Kay NE et al, 1979; Miller JFAP, 1979; Quesenberry P et al, 1979; Magrith IT, 1981; Sanchez Fayos J et al, 1982; Nichols WS et al, 1983; Kempin SJ, 1984; Sanchez Fayos J et al, 1984; Fialkow PJ, 1988; Banks WJ, 1993].

La serie linfoide T madura en el timo. El contacto precoz de los linfocitos con las células epiteliales tímicas es fundamental para la adquisición de la autotolerancia. Alrededor de un 5% de la producción diaria tímica surge de la zona córtico-medular para después salir a la sangre y ser distribuida en las regiones T-dependientes de los órganos linfoides periféricos. Esta distribución ocurre en virtud de factores microambientales no totalmente conocidos, que en parte dependen de las agresinas o moléculas de adhesión y de la acción del endotelio de las vénulas de las áreas T. Los linfocitos T constituyen un 70-80% del total linfocitario de sangre periférica y un 90% de la linfa del conducto torácico [Levine GD et al, 1975; Rosai J et al, 1976; Müller-Hermelink HK, 1986; Knapp W et al, 1989; Henry K, 1992].

Se discute cual es el equivalente de la Bursa, órgano linfoide central de la serie B. En rasgos generales se acepta que debe ser la MO sobre todo en el individuo adulto. En ella maduran linfocitos B que constituyen un 12-15% de los linfocitos circulantes en sangre periférica, un 50% de los linfocitos esplénicos y un 75% de los de la MO [Mitchell J et al, 1978; Kay NA et al, 1979; Miller JFAP, 1979; Nichols WS et al, 1983; Parks DE et al, 1983; Roitt I, 1988].

Los órganos linfoides periféricos presentan áreas B y T dependientes, con una disposición específica en cada órgano. En el ganglio linfático el área T corresponde a las zonas paracorticales, centradas por la vénula postcapilar; el área B-dependiente corresponde a los folículos linfoides y a los cordones medulares, y en ella las células B muestran distinta morfología, modulación y función. En el bazo (dentro de la pulpa blanca o folículos de Malpighio) las áreas T son las vainas celulares periarteriolas, y las B las rodean formando folículos distintos a los del ganglio, ya que presentan un centro con vascularización capilaro-arteriolar, manto y área marginal. En el sistema MALT los folículos o áreas B se estructuran como en el bazo (sin vasos en su interior) y el área T es periférica a los mismos, con una disposición semejante a la que existe en los ganglios linfáticos [Rivas C et al, 1975; Rivas C et al, 1980; Isaacson PG et al, 1983; Rivas C et al, 1983; Fujita T et al, 1985].

En cada órgano señalado, las células linfoides están en una malla o estroma con distintos tipos celulares, que a su vez tienen diversas funciones. La función de sostén corresponde a elementos de hábito fibroblástico. Otras células, de estirpe monocitaria, o fagocitan o inducen la respuesta y los cambios linfoides de alrededor al atrapar en su superficie los antígenos; son las células presentadoras de antígeno, dendríticas foliculares (DRC) en el área B, o los complejos interdigitantes-células de Langerhans (IDC) de las áreas T [Linch DC et al, 1982; Rivas C et al, 1983; Feller AC, 1985; Fujita T et al, 1985].

## **B.- ÁREA B; FOLÍCULO LINFOIDE SECUNDARIO.**

Como ya se ha comentado, los folículos linfoides son unos agregados nodulares situados en la cortical de los ganglios linfáticos u otros órganos linfoides. Para su desarrollo se necesita una población T timo-dependiente normal. No ocurre una activación completa o correcta en estado alterado de la inmunidad [Roitt I, 1988].

Cuando no ha existido un estímulo antigénico previo, el folículo es homogéneo y está constituido por células linfoides de pequeño tamaño y aspecto maduro (células B1 sin memoria inmunológica), es el llamado *folículo primario*. Post acción del antígeno se constituyen los *folículos secundarios*, de mayor tamaño, con dos zonas bien definidas: una periférica estrecha de células pequeñas con núcleos densos, que constituye el *manto folicular*, y otra central o *núcleo claro* por poseer células mayores, de núcleos con menor densidad cromatinica, por lo que se destaca claramente del resto de la pulpa. Esta zona se llamaba antes germinal, porque se interpretaba como el lugar donde nacían en su mayor parte los linfocitos B [Fujita T et al, 1985].

En el sistema MALT o en los ganglios mesentéricos el folículo se rodea de una tercera capa concéntrica semejante a la que presentan las zonas B de los folículos de Malpighio esplénicos, el área marginal [Millikin PD, 1969; Linch DC et al, 1982; Feller AC, 1985; Fujita T et al, 1985; Wolf BC et al, 1989].

### Centro Folicular

Presenta células linfoides de gran tamaño resultado de la modulación de los elementos vírgenes linfocitarios B1, con una morfología característica que las identifica como "células del centro folicular". Las más pequeñas o más maduras son los "citos" (centrocitos CC) que miden de 10 a 12 micras. Las mayores o "blastos" (centroblastos CB) miden de 15 a 25 micras. Los CC tienen un núcleo hendido o de contorno irregular con cromatina densa, nucleolo pequeño y escasas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER) intracitoplásmicas. Los CB tienen núcleos de contorno liso, forma ovalada, cromatina laxa y nucleolos hiperplásicos generalmente marginados; el citoplasma es escaso con mínima cuantía de RE [Rivas C et al, 1980].

La inmunohistoquímica en tejido humano demuestra positividad para los anticuerpos monoclonales (AcMo) pan-B (CD19, CD20, CD79a) así como para los Ac policlonales (Po): IgM, kappa y lambda, expresando también el AcMo CD10. En tejido animal funciona bastante bien el AcMo CD79a y los AcPo kappa y Lambda.

Las células de estirpe histiomonocítica (HM) modificada constituyen las dendríticas del centro o DRC. Comparten marcadores con esa estirpe así como otros específicos (CD21-CD23). En tejido animal exhiben casi en su totalidad la proteína S-100, ya que otros Ac HM como el MAC 387 tiñen histiocitos sinusales.

Son en las DRC donde comienzan los cambios del centro folicular. Ante la llegada de ciertos antígenos, cambian su morfología y se hacen estrelladas, con cuerpo pequeño y largas prolongaciones que atrapan en superficie abundantes complejos antígeno-anticuerpo (gracias a que poseen receptores para IgFc de las inmunoglobulinas y complemento C3b) los cuales permanecen largo tiempo en su membrana, y facilitan la transformación de los linfocitos a blastos del centro: centroblastos y centrocitos (CB y CC) como un primer paso para la formación de la célula plasmática o elemento especializado para la formación de anticuerpos.

Probablemente existen otras células intermedias en la respuesta B, como son los inmunoblastos (IB) y las células linfoplasmocitarias (Lpl); también hay una serie de células B que tras su contacto con las DRC quedan sin transformar, pero conservando la memoria inmunológica (B2) y presentando la morfología de linfocito maduro. Las células CB mueren rápidamente y sus restos apoptóticos son fagocitados por macrófagos, responsables de la imagen en "cielo estrellado" del centro reactivo.

En estos folículos secundarios ocurre la activación B timo-dependiente. El macrófago capta el antígeno (por medio de sus receptores de membrana) y lo elabora en su citoplasma, presentándolo después a la célula

CD4 o colaboradora, en su superficie está unido al complejo de histocompatibilidad clase II (clase I si lo presenta al linfocito CD8 citotóxico). Con estos procesos así como con la producción de interleukina (IL)-I, el macrófago estimula al linfocito cooperador, que a su vez produce la IL-II, determinando la proliferación B y T. Este es un mecanismo inmunológico general [Roitt I, 1988; Ortiz Masllorens F, 1997], que está ausente en estados de inmunodeficiencia.

También se admite una activación timo-independiente que ocurre con algunos tipos especiales de antígenos (polímeros D-aminoácidos, polisacáridos, polivinilpirrolidona, etc...) que son capaces de estimular las células B sin que las T estén involucradas. Parece que en concentración suficiente, algunas sustancias persisten durante un tiempo prolongado en la superficie de macrófagos especializados (probablemente situados en el seno subcapsular ganglionar y en la zona marginal esplénica) consiguiendo transformaciones B efectivas pero no cuantitativamente suficientes.

En el ganglio linfático no se conoce exactamente si los cambios descritos se producen en la pulpa subsinusal o en la periferia de los folículos, en la zona del manto, donde las células HM (drc) constituyen la trama dendrítica del mismo, actuando también como células presentadoras antigénicas [Roitt I, 1988].

### Manto Folicular

En el folículo secundario la zona clara central se rodea de una periferia densa, con peculiaridades morfológicas e inmunofenotípicas. Si la morfología óptica era suficiente para definir las células CB, CC y DRC del centro, no ocurre lo mismo con los tres elementos del manto. Su célula dendrítica (drc) es menos característica que la DRC, con prolongaciones más cortas y gruesas, más vecinas a los histiocitos; las células linfoides parecen elementos mayores que un linfocito, con núcleo de contorno irregular, cromatina densa y nucleolo llamativo.

La inmunohistoquímica proporciona en tejido humano un inmunofenotipo distintivo del manto. Las drc son positivas con AcMo HM y negativas o débilmente positivas con AcMo anti-DRC aunque, en ocasiones muestran positividad con desmina y vimentina, careciendo, como las DRC, de fenómenos de fagocitosis. Las células linfoides son positivas para IgM, pero además muestran IgD, así como kappa y lambda, siendo negativas con CD10. Dichas células linfoides del manto pueden marcarse con el anticuerpo T restrictivo CD5 [Weisemburger D et al, 1985].

La actividad proliferativa tras el estímulo antigénico difiere en centro y manto: en el primero la positividad con ciclinas MIB1 (Ki67 en parafina) o PC10 puede ser casi de un 100% y en el segundo de un 5 a un 10%. Los valores obtenidos en tejido animal son algo más bajos [Gerdes J, Dallenbach F et al, 1984; Gerdes J, Lemke H et al, 1984; Gerdes J, Sabattini E et al, 1993].

La *Microscopía Electrónica* (ME) resalta las diferencias celulares entre el centro y el manto. Las DRC son de cuerpo pequeño y triangular, a veces doble, con cromatina fina y nucleolo poco llamativo; su citoplasma es escaso y no muestra lisosomas secundarios, prolongándose en finas extensiones unidas por desmosomas o hemidesmosomas que rodean estrechamente cada CB y CC. Las dendríticas del manto, drc, son menores, con prolongaciones anchas que siguen a un citoplasma más amplio que el de las DRC, con ocasionales microfibrillas o cuerpos densos que recuerdan a miofibroblastos; en las zonas más periféricas dichas prolongaciones se entremezclan tanto con las extensiones de las DRC como con los procesos citoplásmicos de las células interdigitantes (IDC) del área T.

Las células linfoides del manto (10 micras) tienen núcleo redondo o hendido, cromatina densa y nucleolo llamativo con citoplasma moderado y escasas cisternas de RER. Se diferencian ultraestructuralmente de los CC del centro, que son mayores (12 micras), con cromatina más dispersa y nucleolo menor, siendo excepcional el RER. El CB del centro es el blasto mayor (15-18 micras) con núcleo liso de cromatina dispersa y nucleolos prominentes, únicos o múltiples, generalmente marginados; su citoplasma es escaso con abundantes polirribosomas y despolarización mitocondrial [Mori Y et al, 1966; Millikin PD, 1969; Kaiserling E, 1977; Rivas C, 1980].

La formación del folículo secundario es la expresión morfológica de la activación del sistema inmune en respuesta al contacto con el antígeno. La estimulación de la célula B supone una proliferación y diferenciación hacia la célula plasmática, especializada en la formación de anticuerpos específicos para el antígeno en cantidad suficiente. La secuencia celular que va desde un linfocito "virgen", sin contacto con el antígeno, hasta la plasmática, es discutida. Probablemente un linfocito B1 pequeño da lugar a un CB que rápidamente muere, siendo sus restos eliminados por macrófagos del centro reactivo. Los inmunoblastos (IB) son muy similares a los CB pero poseen más cisternas de RER y nucleolo central; parece que estas dos células están muy relacionadas tanto por su morfología como por su inmunofenotipo. El CC es probablemente la primera célula efectora, aunque de corta duración. El siguiente escalón es la célula linfoplasmocitaria. Las células del manto tienen un desarrollo inicial de retículo endoplásmico rugoso RER, adoptando una morfología similar a la linfoplasmocitaria.

Experimentos animales han determinado que en las DRC permanecen los complejos antígeno-anticuerpo que condicionarían los cambios CB y CC. Células B2 de memoria llegarían al manto contactando con un nuevo antígeno en las drc, lo que a su vez estimularía los cambios hacia célula plasmática. Estos resultados en conejos no parecen totalmente extrapolables al hombre [Kaiserling E 1977].

El manto es una zona polimorfa donde, además de las mencionadas, existen otras B1 y algunas B2 recirculantes. Podría ser el lugar de la transformación B timo-independiente, donde antígenos especiales permanecerían en las drc condicionando la diferenciación a plasmática. Es evidente que, en parte es un área residual del folículo primario, pero la morfología descrita implica una función activa, y que es tanto mayor

cuanto más grande es la respuesta centrofolicular.

En cuanto a las células efectoras o plasmáticas, en ganglio son muy escasas en el folículo, más abundantes en el manto y predominantes en la pulpa terciaria. Van de la cortical a los senos medulares donde, probablemente por un mecanismo holocrino, segregan inmunoglobulinas al sistema de senos medulares y de ahí al torrente linfático y sanguíneo.

El folículo es predominantemente B, pero también tiene células T. Éstas se sitúan entre centro y manto; las CD4 (Helper ó cooperadoras) son aproximadamente el doble de las CD8 (Citotóxicas - supresoras) en respuestas ganglionares inespecíficas, pudiendo invertirse este cociente en situaciones no tumorales o tumorales. No se conoce exactamente cuál es su función [Wolf BC et al, 1989]. Es importante recordar que la activación morfoinmunológica no es superponible a la inmunológicamente conocida, de las células B o T [Roitt I, 1988; Ortiz-Masllorens F, 1997].

#### Área Marginal.

En áreas extranodales, bazo (pulpa blanca) y sistema asociado a mucosas (MALT - placas de Peyer), se observa una tercera zona externa al manto: la zona marginal [Isaacson PG et al, 1983; Spencer J, Finn T et al, 1986; Norton A, Isaacson PG, 1994]. Está formada por células B recirculantes con fisiología aún no totalmente conocida. Su forma es redondeada o estrellada, sin dendriticas intermedias, monótonas en la óptica, de núcleo redondo, con citoplasma claro. La electrónica demuestra un contorno irregular, moderado citoplasma, con escaso RER y núcleo poco activo.

La IHQ del área marginal es compartida parcialmente con el centro, toma los marcadores B pero no el CD10 y expresa IgM. Es negativa con CD5 e IgD, marcadores del manto folicular.

#### C.- ÁREA T O INTERFOLICULAR

En la zona cortical y entre los folículos se encuentra el área timo-dependiente o interfolicular. Está constituida por linfocitos T de predominio maduro, con distintas formas blásticas intermedias, hasta inmunoblastos T.

En muchos ganglios esta zona tiene una apariencia nodular que representa una reacción T con histiocitos no fagocitantes que recuerdan al folículo, por ello algunos autores la llaman "folículo terciario". Su hiperplasia ocurre en muchos procesos, sobre todo los de origen viral y en enfermedades inmunológicas [Knapp W et al, 1989]. En su seno hay dos estructuras especializadas que condicionan la morfología de esta zona: la vénula post-capilar y el complejo de células interdigitantes.

La vénula post-capilar está revestida por células endoteliales altas de forma trapezoidal, con riqueza en orgánulos citoplásmicos y microfibrillas semejantes a las de los elementos que revisten los sinusoides ganglionares. Parece que estos endotelios contienen un receptor de ubiquitina [Roitt I, 1988] que actúa como una lectina que reconoce complejos fosfatados de la superficie del linfocito, por lo cual existe una interacción entre ellas y los linfocitos que lleva a una adhesión de ambos elementos. Después de la unión y merced a la formación de pseudópodos, el linfocito se introduce en el citoplasma endotelial, se rodea del mismo, desciende a la basal, y sale a la pulpa por debajo del pericito. Este paso intraendotelial o "emperipolesis" que ocurre también en los capilares venulares [Rivas C, 1980], es característico del linfocito, ya que los polinucleares atraviesan la pared por las uniones inter-endoteliales.

Los linfocitos llegados por vía venular colonizan la pulpa T y se modifican por los antígenos expresados en superficie por las células interdigitantes.

El complejo de células interdigitantes-Langerhans (IDC) son a la zona T lo que las DRC al centro del folículo. Están constituidos por un grupo de células monocitarias transformadas cuya función es mantener distintos complejos antígenicos en la superficie de sus prolongaciones. Dichas proyecciones son gruesas y cortas y se extienden en ocasiones hasta los linfocitos del manto folicular [Rivas C, 1991]. El citoplasma es amplio, con abundantes organelas, lisosomas sin signos de fagocitosis y cuerpos de Birbeck (característicos de este elemento, de función discutida, situados en las vecindades de la membrana plasmática o en las cercanías del Golgi).

Las IDC expresan en membrana el antígeno CD1 que comparten con los timocitos corticales, y se tiñen también con el Ac anti-proteína S-100. Su dinámica es grande y cuando se introducen en la luz de los senos se habla de las células "veiled" o escondidas, sólo detectadas por IHQ. Fue descrita por Veldman [Lennert K et al, 1978] en conejos y su nombre se debe a las interdigitaciones que relacionan estos elementos entre sí y con los linfocitos vecinos.

Entre las células T hay abundantes elementos B transformándose a plasmáticas que caminan a los senos medulares para vertir en ellos los anticuerpos secretados; hay una célula no totalmente conocida, la llamada célula T plasmocitoide, característica en algunas respuestas del área T en linfadenitis (sobre todo la dermatopática), que se parece a las plasmáticas desde el punto de vista electrónico, por el desarrollo del RER aunque no forma inmunoglobulinas, y que es una modificación de los linfocitos T, que expresan anticuerpos CD3 y CD4 [Lennert K et al, 1978].

## D.- CONTRAPARTIDAS TUMORALES

### D.1) LINFOMAS B.

En patología humana el centro, manto y área marginal dan lugar a distintas neoplasias:

1. Del centro y por la acción del oncogen bcl-2, que en un porcentaje alto lleva a la traslocación t(14,18), surgen los linfomas CENTROFOLICULARES de bajo y alto grado [Pezzella F et al, 1990]. Es probable que puedan también originarse los linfomas INMUNOBLASTICOS ya que CB e IB, como se ha comentado previamente, son dos células relacionadas. Asimismo, se ha cuestionado si los linfomas LB tipo Burkitt pudieran ser del centro folicular, ya que los blastos EBV relacionados son parecidos al CB de menor tamaño que el reactivo con el mismo inmunofenotipo [Lennert K, 1978; Rivas C, 1982].
2. En el manto, debido a la traslocación (11,14) por la acción del oncogen bcl-1 surgen las neoplasias aceptadas sólo en humanos [Jaffe ES, 1987; Weisenburger DD, 1987] conocidas como linfomas del manto, llamados de "diferenciación intermedia", no comprobadas en animales. Esta neoplasia corresponde al *linfoma centrocítico* de la clasificación de Kiel [Lennert K et al, 1983].
3. Parece que el área marginal es la responsable de los linfomas extranodales del MALT (de los cuales los gastrointestinales son los más frecuentes). De reacciones extranodales inflamatorias o inmunes que estructuran tejido linfoide extranodal reactivo en el seno de distintos órganos (como piel, tejido tiroideo, pulmonar etc.), surgen así mismo linfomas superponibles a los MALT de predominio B. Sus células son diferentes a las del área marginal reactiva, modulándose desde linfocitos y plasmáticas a blastos medianos hendidos ("CC-like") y otros de mayor tamaño ("CB-like") que reciben esa denominación porque recuerdan al centrocito y al centroblasto con microscopía óptica. No obstante, con ME exhiben un desarrollo del RER superior a cualquier linfoma nodal de esa morfología, siendo los blastos mayores, semejantes a plasmablastos. Las células más maduras muestran epiteliotropismo en el cuello de las glándulas (estómago e intestino) constituyendo las lesiones linfoepiteliales, características para el diagnóstico [Isaacson et al, 1983; Spencer J, McDonald T et al, 1986; Isaacson PG et al, 1989; Castrillo JM et al, 1990; Isaacson PG, 1990; Rivas C et al, 1990; Rivas C et al, 1991; Rivas C et al, 1991; Castrillo JM et al, 1992; Norton AJ et al, 1994; Norton AJ et al, 1994; Montalbán C et al, 1995].
4. Células B precursoras semejantes a las de la MO serían las responsables de los linfomas-leucemias B linfoblasticas. El linfoma LB B tipo Burkitt se consideró en un principio constituido por estos mismo elementos; en la actualidad y como se ha comentado previamente, parece relacionado con el centro folicular [Lennert K et al 1978 y 1981].

## D.2) LINFOMAS T.

Los linfomas T son neoplasias polimorfas de células T periféricas o precursoras [Stein H, Tolksdorf G et al, 1981; Rivas C et al, 1982; Vicente J, 1982; Montalbán C et al, 1993], de localización primitiva o nodal, o extranodal. Para su identificación es imprescindible el estudio inmunohistoquímico, ya que la morfología citológica por sí misma puede llevar a errores diagnósticos. No se puede hablar de alto y bajo grado de forma comparativa a los LNH-B, dado que globalmente son siempre más agresivos. Entre los LNH-T periféricos, CD4+ y CD8+, hay que destacar: 1) Los NODALES, de mayor o menor agresividad, con células semejantes al linfocito T periférico pero con núcleo irregular, y 2) Los EXTRANODALES de predominio cutáneo, entre los cuales hay que incluir en la actualidad parte de los linfomas citotóxicos, algunos CD8 [Franks PT et al, 1986; Wellman ML et al, 1989; Moore PF et al, 1994; WHO 1997].

## E.- BIOPATOLOGÍA DE LAS NEOPLASIAS LINFÓIDES.

Se dice que los procesos linfoproliferativos, leucemias o linfomas, suelen presentarse exhibiendo un inmunofenotipo que reproduce en cierta manera a la biología de las células normales, dentro de la secuencia de modulación funcional de los sistemas linfoides B y T. De ahí parten las hipótesis de que las neoplasias constituyen una expansión clonal de un elemento celular mutado con un "stop" madurativo a nivel de un momento de su ontogenia [Sánchez Fayos J et al, 1982; Wright DH et al, 1983; Habeshaw JA et al 1988].

Esta idea que resulta de utilidad para la comprensión de los linfomas, no es siempre exacta. Es bien conocido que en la mayoría de las neoplasias linfoides de células pequeñas o bien diferenciadas, los elementos tumorales suelen reproducir la morfoinmunología normal o reactiva (aunque se demuestra que las células presentan alteraciones citogenéticas importantes), pero no sucede así en las más agresivas o dediferenciadas, donde se observan fenotipos aberrantes o defectivos. Así mismo la citogenética expresa alteraciones cromosómicas importantes incluso en las más diferenciadas [García R et al, 1994].

Para considerar todas estas neoplasias, durante mucho tiempo se han establecido distintas clasificaciones [Rappaport H, 1966; Gerard-Marchant R et al, 1974; Kim H et al, 1974; Lennert K et al, 1975; Lukes RJ, 1975; Dorfman RF, 1977; Lennert K et al, 1978; Weissman IL et al, 1978; Lennert K et al, 1981; Robb-Smith AH et al, 1981; Weisenburger DD et al, 1981; Working Formulation (National Cancer Institute), 1982; Stansfeld AG et al, 1988; Lennert K et al, 1990; REAL: Harris N et al, 1993; REAL: Chan JK et al, 1994; WHO 1997], muchas de ellas adaptadas a Medicina Veterinaria [Carter RF et al, 1986; Parodi AL, 1988; Greenlee PG et al, 1990; Teske E, 1993; Fisher DJ et al, 1995; Fournel-Fleury C et al, 1997]. En este trabajo se ha elegido de un lado la clasificación de Kiel [Lennert K et al, 1975; Lennert K et al, 1981; Lennert K et al, 1990], dado que en ella se perfilan rasgos morfológicos y clínicos dentro de los linfomas B, bajo y alto grado de agresividad, y también la WF [Working Formulation - National Cancer Institute -, 1982] muy utilizada en Patología Veterinaria [Carter RF et al, 1986; Couto CG 1985; Couto CG et al, 1995] en

su evolución natural sin terapia, que añade junto a los grados bajo y alto, el concepto de agresividad intermedia; aunque engloba sin embargo, de forma unitaria, los linfomas de estirpe B, T nodales y extranodales [Cattoretti G et al, 1992] (Tablas I, II y III).

Un *linfoma de bajo grado* o de evolución favorable es aquel que, desde su diagnóstico hasta que causa la muerte, tiene una evolución lenta; se presenta con extensión considerable y en estadios avanzados. Los portadores (datos en medicina humana) no responden totalmente a la terapia múltiple; los casos de edad avanzada o mal estado general pueden manejarse con tratamientos poco agresivos o sintomáticos, dado que el paciente "puede convivir" con su neoplasia.

El *linfoma de alto grado* sin tratamiento provoca la muerte en un plazo corto; puede estar localizado en el momento del diagnóstico, si el individuo acude pronto a consulta (estadios bajos), responde rápidamente a las terapias, pero tiende a recaer si no se utilizan protocolos agresivos. Puede alcanzar remisiones completas en un 60% de los casos.

El *grado intermedio* remeda en la clínica más a los linfomas de bajo grado, con una dinámica mayor que ellos y poca respuesta a terapias convencionales, con recaídas múltiples y curso tórpido.

El conocimiento de estos linfomas en la actualidad, se ha perfeccionado gracias a la aportación del inmunofenotipo o expresión en sus células de marcadores monoclonales de núcleo y citoplasma, indicativos de la estirpe y agresividad tumoral así como de la proliferación y diferenciación. Muchos casos, sobre todo en los de bajo grado se puede conservar el inmunofenotipo habitual de las contrapartidas celulares no tumorales, pero en el alto grado, los tumores presentan un inmunofenotipo variable que puede o no recordar a las células originarias o tan sólo expresar la estirpe B, T y signos proliferativos de agresividad.

La dinámica tumoral estudiada con marcadores proliferativos [Gerdes J, Dallenbach F et al, 1984; Gerdes J, Lemke H et al, 1984; Stein H, Gerdes J et al, 1987; Garcia RL et al, 1989; Hall PA et al, 1990; Kamel OW et al, 1991; Gerdes J, Sabbatini E et al, 1993; Fournel-Fleury C et al, 1997] es importante para conocer la respuesta a la terapia, la tendencia a las recaídas y la correlación con el estudio del ADN. Esta parte, más experimental se considerará con citometría de flujo y estática [Joensuu H et al, 1990; Alanen KA et al, 1993; Braylan RC, 1993; Marcos B et al, 1993; Wojcik EM et al, 1993; Garcia R et al, 1994; Lee S et al, 1994; Marcos B et al, 1998; Sanz C et al, 1998]. A priori, si se relacionan los conocimientos y avances de las diploidías y aneuploidías en el pronóstico de estos linfomas, intuiríamos peor pronóstico en los casos aneuploides y mejor en los diploides, pensando que deberían corresponder a tumores linfoides más o menos agresivos respectivamente.

La correlación y los valores estadísticos de agresividad, morfología y posible supervivencia serán datos considerados y valorados dado que su conocimiento es imprescindible como factor pronóstico en la evolución

de la enfermedad.

## **F) PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS**

### ***F.1) PRESENTACIÓN EN EL PERRO***

El linfoma en el perro es una de las neoplasias más frecuentes con una presentación anual de 30 : 100.000, lo que supone el doble de la incidencia humana y 2/3 de la presentada en gatos. Según los datos publicados [Hardy Jr WD et al, 1989; Moulton JE et al, 1990; Keller ET, 1992; Teske E, 1993; Valli VEO et al, 1993; Couto GC et al, 1995], existe una predisposición racial en el caso del Boxer, Basset Hound, San Bernardo, Scottish Terrier, Airedale terrier y Bulldogs. La edad media de presentación es de 6-7 años (edad media adulta) a diferencia de la presentación joven del gato, con un rango desde los 6 meses hasta los 15 años. No se observa una mayor incidencia por sexo que sea conclusiva, con una presentación similar en ambos [Hardy Jr WD et al, 1989; Moulton JE et al, 1990; Teske E, 1993; Valli VEO et al, 1993]. Aunque la etiología exacta del linfoma y leucemia linfoide canina es aún desconocida, se han hecho numerosas hipótesis de sus distintas posibilidades: infecciosas (sobre todo víricas), ambientales (carcinógenos y co-carcinógenos: herbicidas en linfomas [Cotran R et al, 1990; Teske E et al, 1993]), deficiencias en el sistema inmune, genéticas, etc.... Parece que los retrovirus están implicados en el desarrollo de linfoma/leucemia en numerosas especies como peces, serpientes, aves, roedores, gatos, vacas, primates y humanos. Diversos estudios muestran con ME partículas retrovíricas y niveles superiores a los normales de transcriptasa inversa en cultivos celulares de estos linfomas, hallazgos que podrían relacionarse con una posible etiología vírica, aunque no de forma concluyente [Hardy Jr WD et al, 1989; Teske E, 1993], ya que parecen haberse encontrado también en tejido linfoide de animales sanos.

### ***F.2) PRESENTACIÓN EN OTRAS ESPECIES; LINFOMA/LEUCEMIA EN GATO.***

La presentación del linfoma en otras especies es, en unos casos espontánea, y en otros inducida por virus. Vamos a centrar el interés en la especie felina, la cual, junto a la humana ha sido tomada como elemento comparativo, para así intentar encontrar semejanzas morfológicas, clínicas o cinéticas, con respecto a tumores linfoides caninos [Hardy Jr WD et al, 1989; Couto GC et al, 1995].

En el gato la etiología del linfoma/leucemia viene dada por la infección persistente, e incluso latente, del *virus de la Leucemia Felina (FeLV)*, perteneciente a la familia Retroviridae, que se caracteriza por tener la capacidad de copiar su cadena simple de ARN a una doble de ADN gracias a la acción de una enzima conocida como *transcriptasa inversa*. La copia de ADN vírico se integra dentro del genoma de la célula infectada. Hay dos subfamilias con trascendencia clínica, los oncovirus y los lentivirus. La subfamilia de oncovirus incluye virus inductores de leucemias y sarcomas en diversas especies como aves, muridos, félidos

(FeLV y FeSV), primates y hombre, y también carcinomas en muridos y primates. Los lentivirus engloban distintas acciones: anemiogénica (équidos), neurotrópica (virus Visna&Maedi en óvidos) e *inmunosupresora*, de gran importancia actual por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) por el virus HIV humano [Cui LX et al, 1995], con su homónimo en félidos, primates y bóvidos. El cuadro de inmunodeficiencia adquirida se presenta en gatos asociado a la infección por dos retrovirus, aislados o combinados: el oncovirus FeLV y el lentivirus FIV.

#### NOCIONES GENERALES DEL VIRUS FeLV:

**\* VIROLOGÍA DEL FeLV:** Existen dos grupos de formas víricas: las formas endógenas y exógenas. Las **secuencias endógenas** se transmiten genéticamente y no tienen ciclo de replicación en el hospedador, pero se pueden combinar con la forma más común del virus (FeLV A) para dar las otras variantes (B,C). Están presentes en el genoma de todos los individuos. Las **formas infectivas exógenas** del virus probablemente se formaron por infección cruzada de un retrovirus de rata con un ancestro del gato doméstico, como ya se ha demostrado en medicina humana. Hay tres formas principales de virus FeLV, identificadas por la proteína gp70 de la envuelta. Se forman por recombinación de la forma A con las secuencias endógenas relacionadas. El virus, en sí mismo, no tiene un oncogen transformador conocido. El genoma está formado por tres grupos de genes que transcriben las proteínas estructurales, transcriptasa inversa y envuelta, respectivamente [Hardy Jr WD et al, 1989; Moulton JE et al, 1990; Buracco P et al, 1992; Teske E, 1993; Valli VEO et al, 1993; Callanan JJ et al, 1996].

**\* CICLO BIOLÓGICO:** Las formas de exposición, y tipos de infección se detallan en el siguiente esquema [Hardy Jr WD et al, 1989]:

|                                                           |                                                                                                                     |                                |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>VIRUS FeLV</b>                                         |                                                                                                                     |                                |
| Formas de exposición:<br>saliva, lágrima, secreción nasal |                                                                                                                     |                                |
| <b>EXPOSICIÓN DEL GATO -</b>                              |                                                                                                                     |                                |
| Multiplicación en linfocitos<br>del ganglio regional      |                                                                                                                     |                                |
| <b>GATO INMUNIZADO</b><br>AcNV, AcFOCMA en sangre         | <b>INFECCION</b>                                                                                                    |                                |
|                                                           | <b>PERSISTENTE</b>                                                                                                  | <b>LATENTE</b>                 |
|                                                           | Extensión a MO y ganglios.<br>multiplicación en células<br>nucleadas de la serie<br>linfoide, mieloide y eritroide. | Provirus;<br>¿LINFOMA FeLV - ? |
|                                                           | <b>EXTENSION GENERALIZADA -</b>                                                                                     | útero, leche                   |
| saliva, secreción nasal ----<br>TRANSMISION HORIZONTAL    |                                                                                                                     | TRANSMISION VERTICAL           |

Para la detección de Ac en sangre se utilizan dos métodos: la IFI (inmunofluorescencia indirecta) y la

**ELISA** (enzyme linked immunosorbent assay). La IFI indica positividad (infecciosidad) en un 97% de los casos, y la ELISA produce un 30-50% de falsos positivos, ya que no tienen el virus en plasma ni en saliva, por lo que no se transmite.

**\* RESPUESTA INMUNE AL FeLV:** Para una correcta valoración de la respuesta inmune del hospedador frente a la infección por FeLV, hay que tener en cuenta los títulos del anticuerpo neutralizador del virus y del antígeno FOCMA .

*a. Anticuerpo frente al antígeno FOCMA* (Feline oncornavirus cell membrane antigen / Antígeno en membrana celular del oncornavirus felino): Se aisló de la superficie de células del linfoma B y T (FeLV+/-), leucemia linfóide, mieloide y eritroide, y también en la superficie de las células del fibrosarcoma inducido por FeSV (Feline Sarcoma virus). No se encontró en los linfocitos normales ni incluso en los infectados por FeLV A/B. Se supuso que dicho Ag se podría considerar como un Ag *específico tumoral* inducido por el FeLV / FeSV. Serológicamente era distinto, aunque relacionado, a la glicoproteína gp70 de la envoltura del virus. Parecía que altos títulos de Ac frente al FOCMA producía resistencia frente al desarrollo de tumor FeLV- o FeSV-inducido, pero no frente a las infecciones virus-dependientes y enfermedades no neoplásicas. Hoy en día también se han aislado en tejidos del animal infectado (de forma activa o latente) en tejidos no tumorales [Hardy Jr WD et al, 1989; Moulton JE et al, 1990; Valli VEO et al, 1993].

*b. Anticuerpo neutralizador del virus (VN Antibody):* corresponde al Ac contra la glicoproteína viral gp70. Títulos altos generan resistencia al efecto inmunosupresor y, por tanto, a las infecciones secundarias, pero no frente al desarrollo de tumor virus-inducido.

**\* ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR EL FeLV:** En la siguiente tabla se detallan las posibles enfermedades producidas por el FeLV, tanto proliferativas como degenerativas y los órganos que más frecuente implica.

*a. Mecanismo de inducción tumoral del FeLV:* No es del todo conocido; estudios moleculares muestran que los FeLV aislados del tumor contienen genes celulares progenitores *c-myc* (proto-oncogen) transducidos o *transformados* a *v-myc* (con secuencias de codificación para el gen celular). Ya que el retrovirus en sí tiene una transformación lenta y que carece de oncogen propio para una tumorigénesis, la capacidad de adquirir oncogenes celulares adquiere gran importancia para la posible transformación maligna sin que necesariamente produzca inmunosupresión, asimismo ocurre con el lugar de inserción en el ADN celular, activación de genes vecinos y tipo de secuencias (p.e. altamente repetitivas, regiones constantes, que se expresen en gran medida,...etc). Dicho proceso se ha verificado en el caso de linfomas B tipo Burkitt humano EBV relacionado y plasmocitomas de ratón; en el caso de linfomas B humanos se conocen las traslocaciones que envuelven al cromosoma 8 donde se localiza el *c-myc* y los que contienen los genes para las cadenas pesadas y ligeras lambda y kappa de las inmunoglobulinas (14, 2 y 22 respectivamente). El *c-myc*

se sitúa en la banda q24 del cromosoma 8; la proteína codificada (*myc protein*) tiene una función desconocida; se ha visto que aumenta en células en estado quiescente por estimulación con factores de crecimiento, aunque permanece constante en división celular. La inducción tumoral se produce con varios mecanismos, como la transducción del c-myc a un locus no funcional de la cadena pesada de las Ig. Otra explicación sería por la acción de la proteína myc, nunca alterada en las traslocaciones y encontrada a altos niveles en los linfomas tipo Burkitt, y que es capaz de estimular a las células en estado quiescente; otro supuesto es la proximidad del c-myc a los genes de las Ig: así podrían influenciarse de los puntos de rotura de la traslocación, la orientación de los genes, uso de los promotores de las Ig para el c-myc,... etc. La explicación más plausible de la implicación constante de los genes de las Ig con el c-myc en la inducción tumoral es que dichos genes son muy activos a nivel transcripcional, y las traslocaciones ocurren muy frecuentemente en los mecanismos de recombinación para la reconstrucción de los genes de las Ig [Hopkins NH, 1988; Hardy Jr WD et al, 1989; Mange AP et al, 1990; Moulton JE et al, 1990; Valli VEO et al, 1993].

El virus de la Leucemia T humano HTLV I es también un oncovirus, pero tiene un mecanismo de inducción tumoral totalmente distinto; no se integra en zonas concretas del ADN ni cerca de proto-oncogenes, sino por medio de un gen transformador conocido como *pX* o *lor* [Hopkins NH, 1988; Cotran R et al, 1990; Mange AP et al, 1990].

| tipo celular                     | enf. proliferativa                 | enf. degenerativa                          |
|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| linfocitos                       | linfoma                            | atrofia tímica/linfopenias/SIDA felino     |
| Médula ósea:                     |                                    |                                            |
| primitiva mesenquimal            | reticuloendoteliosis-histiocitosis |                                            |
| serie eritroide                  | eritroleucemia                     | Hipo- /aplasia /-penias                    |
| serie mieloide                   | leucemia mieloide                  |                                            |
| serie megacariocítica            | leucemia<br>megacariobástica       |                                            |
| serie monocítica                 | leucemia monocitoide               |                                            |
| stem+fibroblastos + osteoblastos | síndrome osteomieloproliferativo   |                                            |
| riñón                            | -----                              | glomerulonefritis por FeLV-inmunocomplejos |
| útero                            | -----                              | Aborto/reabsorciones                       |

**b. Las enfermedades no neoplásicas** inducidas por el virus serían secundarias al estado de inmunosupresión en la que se sume el animal infectado con FeLV y FIV. El mecanismo de dicha inmunosupresión FAIDS-FeLV asociada no es totalmente conocido, pero se cree que tiene distintas bases:

1. El proceso de replicación viral y exocitosis en el que el virus se recubre de la membrana celular, produce la lisis o sensibilización de la célula para su posterior destrucción por el sistema inmune. Las células T dependientes del timo son las primeras células diana.

2. Los Ag solubles, así como los inmunocomplejos que circulan en sangre pueden causar por sí mismos la

inmunosupresión; in vitro las proteínas de la envuelta como la p15E disminuyen la transformación blástica e interfieren en la producción de IL2, con consiguiente supresión de las células T helper. [Hardy Jr WD et al, 1989]

Aunque el mecanismo expuesto se ha demostrado sólo en gatos, nos ha parecido interesante insistir en su dinámica ya que las especies canina y felina están íntimamente relacionadas, a pesar de que como ya se ha comentado, no está demostrado a nivel canino.

### ***F.3) CLASIFICACIÓN CLÍNICO-ANATÓMICA EN ANIMALES DOMÉSTICOS.***

- \* Multicéntrico
- \* Alimentario
- \* Tímico o mediastínico
- \* leucemia verdadera (médula ósea-sangre solamente)
- \* Solitario (Cutáneo, renal, SNC-SNP, ocular,...)

#### ***Orden según frecuencia de aparición:***

PERRO: multicéntrico, Alimentario, Tímico y extranodal (cutáneo, ....)

GATO: tímico, alimentario, multicéntrico, forma leucémica y resto de presentaciones extranodales : ocular, del tracto respiratorio superior, renal, cutánea, SNC y SNP,...etc [Couto CG et al, 1989; Hardy Jr WD et al, 1989; Moulton JE et al, 1990; Teske E, 1993; Valli VEO et al, 1993; Couto CG et al, 1995].

### ***F.4) ESTADIOS CLÍNICOS EN MAMÍFEROS.***

#### **ESTADIAJE EN VETERINARIA:**

- I: Afectación de un ganglio, o tejido linfóide de un órgano, sin incluir la médula ósea.
- II: Afectación de varios ganglios dentro de un área regional (con/sin afectación amigdalina).
- III: Afectación generalizada de ganglios linfáticos.
- IV: Afectación de hígado y/o bazo (con/sin estadio III).
- V: Extensión a sangre y médula ósea (con/sin los estadios I-IV).

Y cada estadio se divide a su vez en: A) sin síntomas sistémicos, B) con síntomas sistémicos [Hardy Jr WD et al, 1989; Moulton JE et al, 1990; Teske E, 1993; Valli VEO et al, 1993; Couto CG et al, 1995].

#### **ESTADIAJE EN MEDICINA: (Clasificación de Ann Arbor)**

- I: Enfermedad limitada a una única región ganglionar o una localización extralinfática (I<sub>E</sub>).
- II: Enfermedad que afecta a dos o más regiones ganglionares a un lado del diafragma o con afectación limitada de un órgano o tejido extralinfático adyacente.

III: Enfermedad que afecta a regiones ganglionares a ambos lados del diafragma (III), lo que puede incluir afectación del bazo (III<sub>s</sub>) o afectación limitada de un tejido u órgano linfático adyacente (III<sub>ES</sub>).

IV: Enfermedad diseminada, que afecta a uno o más órganos extralinfáticos, con o sin afectación linfática [Carbone PP et al, 1971; Peto R et al, 1977; Fisher RI, 1981; Díaz Rubio E et al, 1991; González Baron M, 1992; España P, 1993; Souhami RL et al, 1993].

### F.5) HISTORIA CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico correcto de esta neoplasia y su forma de presentación, se valora la exploración física, la citología por punción aspiración con aguja fina (PAAF) [Carter RF et al, 1988; Delverdier M et al, 1988; Hawkins EG et al, 1993; Fisher DJ et al, 1995; Canniatti M et al, 1996], la analítica sanguínea, radiografía, ecografía abdominal y en último caso la biopsia.

Las formas *multicéntrica*, *alimentaria* y *mediastínica* del linfoma son las más frecuentes, suponiendo el 90% de todas las presentaciones [Dobson JM et al, 1993]. Las formas *cutánea*, *epidural* y *renal* son poco frecuentes en ambas especies, constituyendo un 10% de todas las formas de presentación. En su totalidad las localizaciones extranodales que aparecen en perro y gato son: cutánea, renal, ocular, del tracto respiratorio superior, del sistema nervioso central y periférico -linfoma epidural- [Spodnick GJ et al, 1992], o de cualquier órgano o tejido del organismo.

En la **exploración física**, el animal con la forma *multicéntrica* del linfoma presenta linfadenopatía superficial generalizada de todos los ganglios palpables (submandibular, cervical, preescapular, axilar, inguinal y poplíteo, y más excepcionalmente del facial, retrofaringeo e iliaco) con extensión frecuente a amígdalas incluidas las palatinas. Al tacto los ganglios son duros e indoloros, con un aumento de 5 a 10 veces su tamaño original, con temperatura normal ("linfadenopatía fría") y frecuentemente se presentan adheridos a planos profundos. La linfadenopatía generalizada puede asociarse a otros síntomas como apatía, cansancio, anorexia, pérdida de peso y actividad física. En la necropsia de un linfoma multicéntrico se observa que los ganglios mesentéricos, sublumbares y frecuentemente el bazo suelen tener las mismas características, aunque su afectación depende del estadio clínico de linfoma en el que sea diagnosticado. Es frecuente que el animal acuda a consulta en un estadio III o IV, donde todos los ganglios internos, bazo e hígado están afectados, o incluso en estadio V, con extensión a órganos vecinos, médula ósea y/o sangre [Dobson JM et al, 1993; Teske E et al, 1994].

· La forma *alimentaria* o *digestiva* suele presentar malabsorción, obstrucción intestinal, vómitos, y diarrea (en un 80% de los casos, incluso hemorrágica con sangre en heces). Los ganglios superficiales y el bazo pueden no estar involucrados. En estadios avanzados puede afectar todo el tracto digestivo, bazo, hígado, riñón, corazón, amígdalas, páncreas y médula ósea. Hay descritas metástasis en piel, ojo, músculo esquelético, SNC,... etc [Couto CG et al, 1989; Hart JR et al, 1994].

- La forma *tímica o mediastínica* es poco frecuente en el perro pero más habitual en gato; en su extensión pueden afectarse los ganglios esternales y mediastínicos, la pleura adyacente y el pulmón. Presentan síntomas generales: abatimiento, anorexia y pérdida de peso, así como respiratorios: tos, disnea o taquipnea. Muestran disminución de la tolerancia al ejercicio, disfagia o regurgitación y compromiso cardio-circulatorio con cianosis, desplazamiento del sonido cardíaco dorso-caudal, líquido serohemorrágico/hemorrágico, distintos grados de hidrotórax o quilotórax como resultado de la infiltración y ocupación del espacio torácico por el crecimiento tumoral en la región antero-superior del mediastino [Shimoda T, 1993].

- En la forma *cutánea* se diferencian dos grupos según su localización topográfica: *dermotrópicos o epidermotrópicos*. Los primeros están caracterizados por lesiones en piel a modo de placas que engloban la dermis papilar y en ocasiones la reticular, con inclusiones focales en la epidermis para formar los *abscesos de Pautrier* característicos de la *micosis fungoides* (MF) descrita en patología humana. Los linfomas con *epidermotropismo* causan un marcado adelgazamiento de la capa epidérmica con infiltración difusa de la capa córnea como en la enfermedad de Worringer-Klopp en medicina humana [Rivas C, 1980; Burg G et al, 1983; Lever WF, 1990; Norton A et al, 1994]. El cuadro clínico varía dependiendo del estadio y del animal. Generalmente se presenta como eritrodermia generalizada, dermatitis exfoliativa, placas dérmicas o nódulos, y úlceras mucocutáneas confluentes que pueden darse en cualquier fase de la enfermedad [Baker JL et al, 1989; Moore PF et al, 1994; Couto CG et al, 1995; Day MJ, 1995; French RA et al, 1996].

- La forma *epidural* se presenta con parálisis del tercio posterior (síndrome de neurona motora superior,...etc) por infiltración de médula espinal o espacio epidural [Turner JL et al, 1989; Spodnick GJ et al, 1992].

- La forma *solitaria renal* puede darse en ambas especies aunque con mayor incidencia en el gato. Presenta síntomas asociados a obstrucción urinaria renal y postrenal, insuficiencia renal aguda/crónica,...etc, ya que suele crecer de forma difusa sin respetar la fisiología del parénquima [Moulton JE et al, 1990].

La **analítica sanguínea** que comprenda fórmulas leucocitaria y eritrocitaria, perfil bioquímico, enzimas hepáticas y renales, así como un aspirado de médula ósea, puede presentar una gran gama de alteraciones hematológicas. La *leucocitosis* es un signo de aparición relativamente constante, a veces como *neutrofilia* hacia la izquierda por un incremento de neutrófilos circulantes, o como *linfocitosis*, debida a una leucemia linfocítica sin masa tumoral reconocible (representa menos del 10% de los linfomas en el perro); en estadios avanzados puede observarse una población linfoide inmadura en sangre en perro, en gatos también se da dicha forma leucémica en un 12% de los casos. También es posible encontrar una marcada *linfopenia* en un 50% de los linfomas felinos. La *anemia* es el signo más común dentro del síndrome paraneoplásico asociado a

procesos linfoproliferativos. Suele ser no regenerativa, normocrómica y normocítica en perro y normo/macrocítica en gato; en la forma digestiva es fácil hallarla por ulceración de la mucosa digestiva, y a veces con neutrofilia; se acompaña de *trombocitopenia* en casos de reemplazo de la médula ósea por infiltración tumoral, e incluso *pancitopenia*. La anemia autoinmune se da en casos de infecciones por retrovirus en gatos o en neoplasias primarias de médula ósea en ambas especies. La patogenia de la *hipercalcemia* (20%; poco frecuente en gatos) es confusa porque no presenta hiperplasia de la paratiroides, ni hipervitaminosis D ni ruptura ósea por metástasis óseas; puede deberse a la producción endógena de una pseudohormona paratiroidea (parathormona ectópica) con acción hipercalcemiante; se asocia a las formas mediastínica y multicéntrica, y con mayor frecuencia a linfomas de estirpe T. La nefropatía por hipercalcemia con posterior insuficiencia renal es un cuadro muy frecuente en los gatos con linfoma, que produce, entre otros, síntomas como polidipsia y poliuria. La *hiperglobulinemia* monoclonal ocurre en perros con leucemia linfática crónica y ocasionalmente en perros con linfoma. La policlonal también puede darse en linfomas [Couto CG, 1985; Teske E et al, 1990; Dobson JM et al, 1993; Furie WS, 1993; Teske E, 1993; Teske E, 1994; Teske E et al, 1994; Couto CG et al, 1995].

Las pruebas diagnósticas de rutina bajo la sospecha de un linfoma son la *radiografía*, sobre todo la torácica latero-lateral, para evaluar posible compromiso mediastínico o pulmonar además de posibles desplazamientos del esófago, tráquea o corazón; la *ecografía* abdominal, para el estudio del tracto digestivo, ganglios mesentéricos, periportales, etc... cualquier órgano con ecogenicidad anormal en el que pueda estar metastatizando el linfoma. La *citología* suele ser la forma más fiable para un diagnóstico definitivo de linfoma, caracterizándose en la mayoría de los casos por un infiltrado monomorfo de células linfoides inmaduras de tamaño superior al linfocito maduro, con la cromatina más laxa, y uno o varios nucleolos evidentes. La *biopsia de ganglio* se utiliza cuando la citología ha sido poco conclusiva, y para realizar el diagnóstico histológico exacto, base necesaria para aplicar un posible tratamiento quimioterápico [Hardy Jr WD et al, 1989; Teske E, 1994; Couto CG et al, 1995].

## F.6) TRATAMIENTO. QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia (QT) ha sido el principal método de tratamiento del cáncer en los últimos cincuenta años. Más de cincuenta agentes (incluidas las hormonas) tienen gran utilidad en medicina humana, pero el número utilizado en la práctica veterinaria es mucho menor [Crow SE, 1982; Hardy Jr WD et al, 1989; España P, 1993; Teske E, 1993; Rosenthal RC et al, 1995].

La cirugía es el tratamiento de elección para muchos tumores sólidos y en alguna ocasión la radioterapia es efectiva para neoplasias localizadas, pero en ningún caso pueden aplicarse en enfermedades generalizadas o con metástasis.

La finalidad de la QT es curar al paciente, pero la obtención de una cura real en medicina veterinaria es muy dudosa. El Tumor Venéreo Transmisible (TVT) parece ser la excepción a esta afirmación por obtenerse una curación total con distintas drogas anti-cáncer [Rosenthal RC, 1995]. En medicina Veterinaria la QT se aplica para obtener otros beneficios como el control de enfermedades generalizadas imposibles de operar o radiar aumentando el periodo libre de enfermedad, prevención de la progresión de una neoplasia tratando de evitar las metástasis tempranas, y produce una mejoría sintomática del paciente que presenta un síndrome paraneoplásico añadido.

Los fármacos anti-cáncer se suelen utilizar combinados, ya que cada uno produce la destrucción de una fracción constante de las células tumorales que es independiente a la destruida por otro fármaco, así se combinan las drogas para que actúen en las distintas fases del ciclo celular. Con ello también se intenta evitar la aparición por mutación, de cepas resistentes a los fármacos antitumorales (*resistencia tumoral*). Este fenómeno se desarrolla por varias razones, entre otras se cree debido a la desactivación de las células tumorales, impermeabilidad de las mismas a los fármacos, así como aparición de rutas alternativas de metabolismo y reparación celular.

A la hora de diseñar un protocolo de quimioterapia hay que aplicar los siguientes principios básicos en la utilización de fármacos: que sean efectivos en solitario, con distintos mecanismos de acción, con diferente toxicidad y con protocolo de tratamiento intermitente.

Previamente a la aplicación del tratamiento quimioterápico, hay que valorar una serie de factores como:

1. Historia clínica y exploración física detallada.
2. Diagnóstico histológico de malignidad.
3. Selección de drogas efectivas frente al tumor y conocimiento de su mecanismo de acción (factores como concentración necesaria, ruta de administración, biotransformación, interacciones, resistencias y toxicidades, así como su eliminación).
4. Análisis de efectos adversos; toxicidad; dosis en las especies canina y felina.
5. Entendimiento y cooperación del dueño.

Para obtener el éxito terapéutico hay que hacer entender al dueño que la curación (RC) no es la finalidad del tratamiento, sino inducir remisiones prolongadas, parciales (RP) o totales, que conlleven la menor toxicidad posible, intentando conservar la calidad de vida del paciente oncológico. Esta calidad de vida, más que la cantidad, se convierte en la consideración primordial en la práctica veterinaria a la hora de aplicar la QT como método realista de tratamiento contra el cáncer [Couto CG, 1985; Hardy Jr WD et al, 1989; Couto CG et al, 1995].

La estrategia quimioterápica se divide en cuatro fases principales:

1. Inducción a la remisión,
2. Intensificación,
3. Mantenimiento,
4. Reinducción de la remisión o rescate.

En la **inducción** se utiliza una terapia intensiva por combinación de drogas encaminadas a conseguir una remisión completa (RC) reduciendo de forma significativa la masa tumoral. Es un tratamiento fuerte y frecuente comparado con el impuesto en el periodo de *mantenimiento*. Si no se produce la RC, el animal se somete a la terapia de intensificación. En medicina veterinaria se utilizan distintos protocolos para la inducción en los linfomas, como las terapias **COP** (ciclofosfamida PO, vincristina IV y prednisona PO), **COAP** (ciclofosfamida PO, vincristina IV, citosina arabinósido IV/SQ y prednisona PO), **CHOP** (ciclofosfamida PO, adriamicina IV, vincristina IV y prednisona PO) o basados en **PEG-L-Asparaginasa/L-Asparaginasa** en el perro, y **COAP**, **CHOP** o **DOMAC** (dexametasona PO, vincristina IV, mitoxantrona IV, citosina arabinósido PO y ciclofosfamida PO) en el gato [Couto CG, 1985; Hardy Jr WD et al, 1989; McEwen EG, 1990; Teske E et al, 1990; Teske E, 1994; Teske E et al, 1994; Couto CG et al, 1995].

La **intensificación** se aplica cuando no se obtiene una RC en el periodo anterior; es un tratamiento agresivo continuado normalmente a base de L-asparaginasa SQ y Doxorubicina, siempre bajo control de toxicidades paralelas -fármacos no mielotóxicos o que ataquen a una fase celular distinta- [Hardy Jr WD et al, 1989; Couto CG et al, 1995].

La fase de **mantenimiento** se aplica cuando se ha alcanzado la RC y se basa en un protocolo de agresividad moderada, como el **LMP** (clorambucil, metotrexate y prednisona; oral y más cómodo) o el **COAP**, ambos para perros y gatos.

En el caso de que la enfermedad se reproduzca de forma progresiva (*recidiva*), se empieza la siguiente fase de la QT, la **reinducción de la remisión o rescate**, donde se aplican las mismas drogas utilizadas para la inducción si hubo RC (o combinaciones con doxorubicina o adriamicina) aunque es mucho más fácil mantener la primera remisión que producir la segunda. Si la RC no se alcanza, debe seguir el mismo tratamiento hasta que no haya una evidencia clara de la progresión tumoral. En el perro normalmente se utilizan los protocolos **ADIC** y **D-MAC**, ambos efectivos pero con mayor toxicidad que el **COAP** [Hardy Jr WD et al, 1989; Teske E et al, 1990; Teske E, 1994; Teske E et al, 1994; Couto CG et al, 1995; Rosenthal RC et al, 1995].

## G) TÉCNICAS ESPECIALES DE ESTUDIO

Uno de los objetivos principales de esta tesis es el conocimiento de la cinética y del ciclo celular de los linfomas caninos para comprender su comportamiento biológico y, por tanto, clínico [Teske E et al, 1993; Teske E, 1994]. La agresividad podrá condicionar la terapia administrada así como orientar al pronóstico de la enfermedad [García R et al, 1989; Marcos B et al, 1993; García R et al, 1994; Obeso G et al, 1994; Marcos B et al, 1997]. Así pues se utiliza la proliferación tumoral y la citometría.

La **proliferación** de un tumor se expresa por el tanto por ciento de células que se considera que están dividiéndose o bien están próximas a ello ( $G_1$ ,  $G_2$ , M); dicho porcentaje se obtiene gracias a los marcadores proliferativos PC10 y MIB1, ciclinas nucleares que se expresan en todas las fases del ciclo celular a excepción de  $G_0$  (fase de reposo). La cuantificación del área nuclear positiva a estos marcadores se realiza con el programa "proliferation index" del analizador de imagen CAS-200 sobre la preparación, con ello se pretende reducir el tiempo empleado y el posible error de medida a mano, ya que el número total de campos estudiados (10 campos analizados por cada preparación) hace la labor ardua y densa; además ofrece la expresión de los resultados estadísticos de forma automática.

El **estudio citométrico** informa sobre el contenido de ADN de una muestra problema. Es sabido que las células diploides en fase  $G_0G_1$  poseen una cantidad de ADN que va aumentando a medida que la célula progresa hacia la fase S, hasta que llega a la  $G_2+M$ . En esta última fase, la célula tiene el doble de cantidad de ADN que en la fase  $G_1$ . Atendiendo a los distintos contenidos de ADN, el citómetro permite identificar la proporción de células en cada fase del ciclo celular, así como la ploidía.

El uso práctico de la citometría se basa en tres principios básicos: 1) que las células tienen distintas cantidades de ADN en cada estadio del ciclo celular; 2) la disponibilidad de técnicas en las que se utilizan reactivos que se unen estequiométricamente con al ADN; 3) la gran mayoría de células normales son diploides [Lee S et al, 1994].

Actualmente, la citometría (de flujo y estática) de tumores sólidos puede efectuarse sobre células recuperadas del material parafinado [Hedley DW et al, 1985] además del tejido fresco convencional con prácticamente el mismo resultado, lo que supone una gran ventaja a la hora de utilizar material retrospectivo [Alanen KA, et al, 1989; Claud RD et al, 1989; Bauer TW et al, 1990; Alanen KA et al, 1993; Bowman R et al, 1993; Braylan RC, 1993; Böcking A et al, 1995; Boudry R et al, 1997].

La **citometría de flujo** se basa en una suspensión celular donde los núcleos son teñidos con Ioduro de propidio, fluorocromo que se une a los pares de bases del ADN. Al pasarlo al citómetro, un haz de luz láser excita la fluorescencia de los núcleos teñidos, donde la intensidad de la fluorescencia emitida es directamente proporcional al contenido de ADN, que es recogida y medida por un ordenador. Los resultados se expresan

con curvas que equivalen al porcentaje de células con contenidos de ADN diferentes [Frierson HF, 1988 y 1991].

En la *citometría estática* se parte de extensiones celulares o improntas, cuyos núcleos se marcan en la tinción de Feulgen, donde el ácido clorhídrico hidroliza las bandas ribosa-purina dando residuos azúcar-aldehído; El reactivo de Schiff (colorante azul) reacciona con dicho residuo, dando un precipitado de color azul (Azure A) que es reconocido por el analizador de imagen CAS-200 (programa de ploidía QDNA - quantitative DNA analysis-). Los resultados son expresados con curvas semejantes a las de citometría de flujo, nubes de puntos,...etc [Mascos et al, 1997].

En ambas citometrías los valores están referidos a los de ganglio control de perro y de gato procesados al mismo tiempo, ya que ambos programas están diseñados para linfocitos humanos, y se ha tratado de minimizar al máximo el posible error [Marcos B et al, 1993; Marcos B et al, 1997; Sanz C et al, 1998].

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**

## A.- CASUÍSTICA

El material utilizado procede del archivo del servicio de Anatomía Patológica e Histología del departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid; asimismo también se cuenta con biopsias llegadas al departamento de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid (Universidad Autónoma de Madrid).

Partimos de 30 linfomas caninos (Tabla IV), de los cuales 4 son sólo biopsias, y 26 son necropsias seriadas, del periodo 1995-1997. Los casos en que se ha podido realizar necropsia proceden de dos fuentes distintas: 19 casos del servicio de Patología Médica (Patología Animal II) de la facultad de Veterinaria de Madrid, y los 7 restantes de centros privados (los cuales cuentan con una historia clínica reducida). Todas las necropsias se realizan en el servicio de Anatomía Patológica del dpto. de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid. En ellas se recoge tejido linfoide y tejido hamatopoyético, y distintos órganos en función de la afectación por el linfoma. Posteriormente se fijan en formaldehído tamponado al 10% e incluyen en bloques de parafina.

Para el estudio proliferativo y comprobación de su fiabilidad, se recogen además 15 biopsias ya incluidas en parafina, pertenecientes al periodo 89-94.

De la historia clínica se recoge la información posible sobre distintos factores relativos al animal o a la propia enfermedad, como edad, sexo, sintomatología (asociada o no al linfoma), tumores secundarios, estadio clínico, analítica sanguínea básica, posibilidad de tratamiento, con tipo de respuesta y supervivencia.

Como controles se utilizan 8 linfomas felinos para verificar analogías o diferencias con las contrapartidas caninas. Se utilizan 7 ganglios control de perro y 3 de gato para consideración morfológica, óptica e inmunohistoquímica.

## B.- MORFOLOGÍA ÓPTICA

El estudio morfológico de rutina se realizó tras la inclusión del tejido en parafina y en secciones de cuatro micras teñidas con técnicas de: Hematoxilina Eosina (HE) convencional y Giemsa modificado (Lennert K, 1978).

### *TINCIÓN DE GIEMSA MODIFICADO (LENNERT)*

#### *Reactivos:*

1. Solución Giemsa: 80% agua destilada, 20% Giemsa puro (Merk, Alemania, ref. 9204)
2. 100 ml H<sub>2</sub>O destilada con 5 ó 6 gotas de ácido acético glacial.
3. Alcohol Isopropílico.

**Procedimiento:**

1. Desparafinar los cortes histológicos (pasándolos por xilol, alcohol al 100% - 96% - 70% sucesivamente) e hidratarlos en agua destilada.
2. Se sumergen en la solución de Giemsa durante una hora (la duración tiene un rango variable entre 20 min. y 1 h. en modificaciones posteriores).
3. Se sacan los cortes de la solución de Giemsa para pasar al H<sub>2</sub>O destilada acetilada, agitando unos 2 ó 3 segundos para su diferenciación (se debe controlar muy bien este paso).
4. Se pasan inmediatamente por alcohol de 96°, dejándolos hasta obtener el color deseado (controlar con microscopio óptico).
5. El proceso de diferenciación se para sumergiéndolo 3 veces (2 min. cada vez) los cortes en alcohol isopropílico.
6. Se pasan por xilol tres veces (2 min. cada vez)
7. Se montan en Eukitt.

**C.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Todos cortes electrónicos estudiados han sido seleccionados sobre secciones ópticas de control de una micra de grosor, teñidas con Giemsa.

**Material y Reactivos:**

1. Gelatine capsules. (size 1/6.5mm diametro/0.5ml). Cod. C089. TAAB.
2. Acetona.
3. Vestopal-W resin. Cod. V008. TAAB.

Solución de trabajo:

Solución madre de Vestopal:

Vestopal-W ..... 10 cc

Iniciador ..... 0.1 cc

Activador ..... 0.2 cc

Mezclar el Vestopal-W con el iniciador, agitar con una varilla de vidrio antes de añadir el activador.

4. Iniciador del V-W: Tert-butyl perbenzoate. Cod. B035. TAAB.
5. Activador del V-W: Cobalt naphthenate (6% cobalt). Cod. C031. TAAB.
6. Rejillas: (specimen grids-PKT/100). Cod. 4629A-4. LKB.
7. Tetróxido de osmio. Cod. 24505. Merck.
8. Buffer Cacodilato:

Cacodilato sódico ..... 85.6 gr

Agua destilada ..... 400 cc

Solución de trabajo:

De la solución anterior se toman 400 cc, en 1.600 cc de agua destilada. pH 7.3.

9. Glutaraldehído 25%. Cod. 49630. Fluka.
10. Citrato de plomo. pH 12 (en 100cc) según Reynolds:
11. Acetato de Uranilo. 3% en agua destilada.
12. Solución de Palade:  
Mezclar partes iguales de tetróxido de osmio al 2% y buffer cacodilato.
13. Otros: material de laboratorio fungible e inventariable: pipetas Pasteur, balanza, agitador magnético, estufa, "knife-marker" para cuchillas de vidrio, tiras de vidrio, lamparilla de alcohol, ultramicrotomo etc.

## PROCEDIMIENTO

### *Fijación:*

1. Fijar en glutaraldehído al 1.5 ó 2.5% un mínimo de dos horas en nevera a 4°C.
2. Seccionar la muestra, en bloques de 2 mm. 3 aproximadamente. Se aconseja un mínimo de 8 bloques de cada biopsia.
3. Lavar los bloques mediante varios cambios de buffer cacodilato. Dejar lavando durante media hora.
4. Añadir tetróxido de osmio (solución de Palade) de 1 a 2 horas a 4°C en nevera.
5. Lavar en buffer cacodilato de 5 a 10 minutos.

### *Inclusión:*

6. Deshidratar los bloques haciéndolos pasar durante 30 minutos por soluciones acuosas de acetona de concentraciones crecientes (50%, 70%, 80%, de 90% y de 100%) una hora en cada una.
7. Preparar una mezcla con tres partes de acetona y una de la solución de Vestopal-W. Mezclar bien y dejar evaporar la acetona hasta el día siguiente.
8. Cambiar el material a frascos limpios y secos, añadiendo a cada uno 10 gotas de la solución de Vestopal puro.
9. Incluir en cápsulas. Colocar 3 gotas de la solución de Vestopal-W. Transferir la muestra a la cápsula y llenar esta con Vestopal-W.
10. Dejar reposar de 1 a 2 horas a temperatura ambiente.
11. Meter las cápsulas en estufa a 62°C durante 48 horas para su polimerización. Una vez finalizado este paso están listas para los cortes en ultramicrotomo.

### *Ultramicrotomía:*

12. Antes de realizar las secciones en el ultramicrotomo, se tallan los bloques en pirámide para descubrir la muestra y delimitar la forma y dimensión de la sección que se desea obtener, controlándola posteriormente al microscopio óptico.
13. En el ultramicrotomo LKB se realizan cortes de 1 micra a 300 angström.
14. Tinción con Giemsa de los cortes de control pasándolos por xilol.
15. Cortes semifinos (color amarillo dorado) que se toman en una rejilla y dejar secar.

**Contraste:**

16. **Tinción con acetato de uranilo:** depositar en los los discos Petri, con ayuda de una pipeta Pasteur, tantas gotas de la solución de acetato de uranilo como rejillas deseen contrastarse.
17. Situar una rejilla sobre cada gota.
18. Cubrir el disco Petri y esperar 20 minutos.
19. Transcurrido este tiempo tomar las rejillas. Lavar 3 veces en agua destilada y secar en secar en papel de filtro.
20. **Tinción con citrato de plomo:** depositar sobre el disco de Petri tantas gotas de la solución de citrato de plomo como rejillas deseen contrastarse. (Es conveniente que el disco de Petri que se use contenga en su interior algunas lentejas de NaOH y haya estado cerrado desde algunos minutos antes, para reducir el nivel de CO<sub>2</sub>, que puede interferir en el proceso de "tinción" formando precipitados de carbonato de plomo).
21. Colocar las rejillas por el lado que contienen las secciones sobre la gota del reactivo.
22. Lavarlas tres veces con agua destilada. Secar en papel de filtro (en el interior de la placa de Petri).
23. Observación en M. Electrónico de transmisión Hitachi HU-12A.
24. Se fotografian las zonas demostrativas.

Se han estudiado 15 casos de CBCC, 2 de CB y 12 de LMF.

**D.- INMUNOHISTOQUÍMICA**

El estudio inmunohistoquímico fue realizado en todos los casos en tejido incluido en parafina utilizando los métodos de Avidina-Biotina (ABC) y Estreptavidina-Biotina (STABC) según la metodología explicada a continuación. Los anticuerpos utilizados, comerciales o experimentales, se citan en la Tabla V.

**D.1.- PROCEDIMIENTO IHQ MANUAL:****1.- Secciones de parafina y preparado de los cortes**

- a. Cortar secciones de 4-6 micras de grosor y extenderlas en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (SIGMA, Cod. P-1274). Mantener en estufa a 60°C durante una noche.
- b. Desparafinar e hidratar.
- c. Incubar 5 min. en agua oxigenada al 3%.
- d. Lavar en agua.
- e. Se realiza *Tratamiento con calor* como método recuperador antigénico según el AcMo. primario donde sea necesario.

**2.- Tratamiento por calor**

Utilización de calor como recuperador antigénico en:

- a. Casos de material antiguo o con parafinas no adecuadas

b. Con los anticuerpos débiles para incrementar su positividad: MIB1, p53,...[Cattoretti G *et al*, 1992; Norton AJ *et al*, 1994; Butler D *et al*, 1997].

#### *Tipos:*

\* Olla a presión.

\* Microondas.

#### *Buffer empleado (en ambos):*

\* Buffer citrato sódico pH 6 (citrato de tri-sodio dihidrato  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ; Merk Cod.A763243).

#### *Olla a presión*

- Colocar los cortes en cestillas metálicas dejando dos espacios entre ellas para dejar fluir cómodamente el buffer citrato entre ellas; se dejan en  $H_2O$  destilada hasta que la olla a presión esté preparada.
- La olla (capacidad: unos 2 litros) se coloca en un hornillo eléctrico sin cerrar hasta que entra en ebullición, entonces se introducen las cestillas en el interior totalmente sumergidas en el buffer y se cierra la olla.
- La olla dispone de un sistema de control manual para señalar la correcta presión con la subida de una válvula. Una vez alcanzada dicha presión se cronometran 2 minutos (tiempo aproximado en alcanzar la segunda válvula de presión). Transcurrido el tiempo se debe pasar la olla al agua fría para bajar su temperatura y presión y posterior apertura (no antes).
- Una vez abierta la olla se pasan las cestillas al agua destilada lo más rápido posible impidiendo que se sequen las preparaciones; éstas se pasan a buffer TRIS (T.B.S. Tris Saline Buffer Wash Concentrate; Lipshaw/immunon. Cod. 484850; 30 ml/botella a diluir en 1 litro de  $H_2O$  destilada; pH=7.2-7.8) y ya están listas para la técnica de inmunohistoquímica.
- Los anticuerpos que requieren la olla a presión como método recuperador antigénico de los aquí utilizados son el MIB1, CD3, CD79a, S100 (aunque también responde sin tratamiento) y J Chain. La mayoría se utilizaban antes con microondas, pero se obtiene mejor patrón de tinción sometiendo al calor por presión de la olla.

#### *Microondas*

- En este caso, las cestillas (de cristal o plástico) donde se colocan las preparaciones alternas, tienen que ir en un contenedor de plástico relleno con buffer Citrato Sódico pH 6 (el mismo buffer que para la olla a presión) que debe cubrir en exceso las mismas. El contenedor debe ir tapado para evitar en lo posible la salida del buffer, aunque no herméticamente para que pueda salir el vapor.
- Se utiliza un microondas de uso doméstico con la máxima potencia, y el número de pulsos dependerá del AcMo utilizado.
- Para los Ac KAPPA y LAMBDA se trata de tres pulsos de 10, 10 y 5 minutos respectivamente. Se controla entre cada paso para evitar la evaporación del buffer con el consiguiente secado de las preparaciones.

### *3.-Incubación con el anticuerpo primario*

- a. Anticuerpo monoclonal: incubar directamente el anticuerpo primario, a la dilución óptima del mismo

en T.B.S., durante 40-60 min. dependiendo del AcMo que se trate.

b. Ac policlonal: si el anticuerpo primario es policlonal, incubar en *Normal Swine Serum* (NSS) 1:10 (DAKO, X901) durante 10 minutos, para evitar inespecificaciones y fondo. Decantarlo sin lavar en T.B.S. e incubar el anticuerpo a su dilución específica durante 40-60 min.

#### **4.- Incubación con el anticuerpo secundario**

*Tipo de anticuerpo secundario:*

a. Si el Ac primario es monoclonal:

Biotinylated affinity isolated rabbit immunoglobulins TO MOUSE IMMUNOGLOBULINS. 1 ML. Cod. E354. Dako. Solución de trabajo: 1:250.

b. Si el Ac primario es policlonal:

Biotinylated affinity isolated swine immunoglobulins TO RABBIT IMMUNOGLOBULINS. 1 ML. Cod. E353. Dako. Solución de trabajo: 1:250.

*Duración:* se incuban las preparaciones de 40-60 minutos con posterior lavado en T.B.S.

#### **5.-Incubación con el anticuerpo terciario:**

*Reactivos:*

a. Técnica de Avidina-Biotina (ABC); ABCComplex/HRP (Dako. Code No. K355) que contiene:

- 1.Reactivo a: Avidin 1ml. en 0,01 M Phosphate buffer, 0,15 M NaCl, 15 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7.2.
- 2.Reactivo b: Biotinylated horseradish peroxidase 1ml en 0,01 M Phosphate buffer, 0,15 M NaCl pH 7,2, 15 mM NaN<sub>3</sub>.
3. Una botella para realizar la mezcla (1 mixing / storage bottle).

*Solución de trabajo:* una gota de a + otra de b + 5 ml buffer T.B.S.

b. Técnica de Streptavidina-Biotina (STABC); StreptABComplex/HRP (Dako. Code No. K377) que contiene:

- 1.Reactivo a: Streptavidin 1ml. en 0,01 M Phosphate buffer, 0,15 M NaCl, 15 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7.2.
- 2.Reactivo b. Biotinylated horseradish peroxidase 1ml en 0,01 M Phosphate buffer, 0,15 M NaCl pH 7,2, 15 mM NaN<sub>3</sub>.
3. Una botella para realizar la mezcla (1 mixing / storage bottle).

*Solución de trabajo:* una gota de a + otra de b + 5 ml buffer T.B.S.

*Técnica:*

- Los pasos previos son iguales en ambas técnicas; entre ellos se deben hacer intensos lavados en buffer T.B.S. de al menos 5 min. de duración.
- Se incuban las preparaciones con el anticuerpo terciario de 40-60 minutos y posteriormente se lavan en T.B.S.

**6.- Revelado con Diamino-Benzidina (DAB) y contraste final****Cromógeno:**

D.A.B. (3,3 $\alpha$ -Diamino-benzidin-tetrahydroclorid) (25 gr). Cod. 32750. Fluka.

**Solución de trabajo:**

Buffer TRIS para D.A.B. pH 7.6:

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| TRIS 0,2 molar .....          | 12 cc |
| Acido clorhídrico 0,1 N ..... | 19 cc |
| Agua destilada .....          | 19 cc |

Solución de D.A.B.:

a. D.A.B. 5 mgr + 10 cc buffer D.A.B.

b. Agua destilada 2,9 cc + 0,1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Mezclar y filtrar.

DAB comercial DAB TABLETS. (SIGMA FAST,D-4293):

1 tableta de DAB +

1 tableta de UREA H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +

5 ml H<sub>2</sub>O destilada

**Técnica:**

Las preparaciones se incuban en DAB durante 2 a 10 min. (control con microscopio) y posteriormente se lavan en TBS y se pasan al agua corriente para ser contrastadas con Hematoxilina de Carazzi. Se deshidratan y montan en medio no acuoso (Eukitt).

**Hematoxilina de Carazzi:**

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Hematoxilina .....     | 2 gr     |
| Yodato potásico .....  | 0,4 gr   |
| Alumbre potásico ..... | 100 gr   |
| Glicerina .....        | 400 gr   |
| Agua destilada .....   | 1.600 cc |

**D.2.- PROCEDIMIENTO AUTOMÁTICO.**

INMUNOTEÑIDOR: DAKO TECH.Mate™ 500/1000.

Reactivos: DAKO Chem-Mate™ Detection Kit. Code No. K 5001.

El funcionamiento del inmunoteñidor está basado en reacciones de capilaridad que hace ascender el reactivo dispuesto en bandejas especiales en cada paso del proceso, automatizado por un programa informático, por preparaciones enfrentadas verticalmente creando una cámara virtual entre ellas. Así se homogeneizan las condiciones de manejo durante todo el procesado, y por consiguiente se igualan los resultados.

El TECHMATE consta de 89 pasos automáticos. El Kit Dako Chem-Mate está basado en el método complejo Streptavidina-Biotina (STABComplex) como conjunto de anticuerpos secundarios utilizados para amplificar reacciones primarias de Ag-Ac en tejidos, creando una estructura terciaria de red en los lugares donde el Ac primario se ha unido al epítipo específico del Ag detectado. Las enzimas Peroxidasa del complejo STABC catalizan la reacción substrato-cromógeno para formar un producto de reacción coloreada.

La automatización y estandarización del proceso intenta obtener una mejor calidad y reproducibilidad de la tinción. El TECH-MATE está diseñado para proporcionar volúmenes adecuados de reactivo en tiempo y forma precisos. La secuencia de lavado automática disminuye el potencial de reactividad no específica. Se disminuye el coste ya que los reactivos se dispensan mediante un sistema de capilaridad. Los protocolos del ordenador proporcionan una adecuada guía al usuario y para control de calidad. Las titulaciones de los reactivos han sido seleccionadas para un óptimo resultado.

#### ***Principios del procedimiento***

El Kit CHEM-MATE utiliza una técnica inmunohistoquímica conocida como "técnica sandwich", en la que el tejido reacciona primero con una proteína bloqueante que disminuye la unión inespecífica a otros Ag, seguida por la incubación con el Ac primario, que se une a los Ag específicos que haya presentes. El Ac secundario biotilado reacciona con el primario, y se sigue con la incubación con la solución estreptavidina - biotina - enzima, para unir la enzima a cualquier lugar que haya reaccionado previamente con el Ac primario y secundario. Se añade el cromógeno DAB (3, 3' Diamino Benzidina) que reacciona con la peroxidasa unida al complejo Ac - Enzima STABC. La actividad de la peroxidasa sobre el cromógeno produce un depósito de precipitados marrones-negros en los lugares antigénicos que contienen los epítipos específicos reconocidos por el Ac primario [Abbott CD, 1997].

### ***D.3.- CONSIDERACIONES TÉCNICAS PARA LA REALIZACIÓN Y VALORACIÓN DE LA IHQ.***

El empleo de anticuerpos monoclonales permite la identificación de tipos celulares basados en el reconocimiento de antígenos (epítipos) de superficie, intracitoplasmáticos y nucleares, que caracterizan no sólo una determinada estirpe, sino distintos estados funcionales dentro de un mismo tipo celular.

Para poder comprender el porqué de las diferentes variantes de las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y su metodología, se debe tener presente los conceptos básicos de inmunidad adquirida y la respuesta antígeno-anticuerpo.

Se han utilizado las técnicas de avidina-biotina y estreptavidina-biotina por tratarse de métodos con mayor sensibilidad. Los resultados en parafina permitido realizar un estudio retrospectivo y prospectivo [Knapp W et al, 1989; Hedley DW et al, 1983]. Para obtener resultados óptimos, las técnicas IHQ tienen una serie de

requerimientos durante toda la metodología que son indispensables para una posterior valoración:

\* **La fijación del material** deberá ser correcta y rápida, así se preservará la integridad de los antígenos (Ag), la morfología celular y tisular, se impide la difusión de Ag de un compartimento celular a extracelular lo que puede interferir en la reacción Ag-Ac. Un fijador de elección fue el formol preferentemente tamponado en buffer a Ph 7,2. El proceso de fijación se puede alterar por distintos factores; pH del fijador, temperatura, concentración y tiempo de fijación.

\* Deben ser considerados los **Tratamientos previos** a las técnicas de IHQ: como desparafinación y rehidratación del tejido. En ocasiones, si el fijador utilizado es del tipo aldehído, se pueden formar enlaces con el Ag que se quiere detectar; por este motivo es preciso efectuar una digestión proteolítica (tripsina) en aquellos antígenos que lo requieran. Otro proceso a efectuar es el bloqueo de enzimas endógenas (peroxidasa endógena o fosfatasa), debiéndose enmascarar/eliminar o inhibir la actividad enzimática endógena que presenta el tejido normal (ésto se realiza con  $H_2O_2$ ).

\* **Control de la propia técnica de IHQ**; tiempos de incubación, lavados, revelado, evitando que en ningún momento del proceso la preparación se quede seca, incubando siempre en cámara húmeda a temperatura ambiente.

\* **De los anticuerpos monoclonales utilizados** se considerarán: características, calidad, requerimientos, especificidad, concentración y, dilución óptima. Se deben tener en cuenta dos hechos: la tinción específica y el fondo no-específico que se debe evitar.

\* **Los reveladores o cromógenos** como el DAB ( $\beta$ ,  $\beta$  diaminobenzidina tetrahidroclorada) que produce un precipitado de color marrón, ha sido utilizado como sustrato de las técnicas de avidina-biotina y estreptavidina-biotina.

\* **Los controles**, tanto positivos como negativos ensayados en paralelo con las muestras son exigidos con el fin de comprobar posibles reacciones inespecíficas.

Lo más complejo de las técnicas de IHQ es la **valoración final** (tinción específica, inespecífica, intensidad de tinción, artefactos ...), aunque las premisas técnicas y la experiencia suministra una información indispensable para interpretar los hallazgos en los LNH.

#### ***D.4.- ANTICUERPOS UTILIZADOS EN INMUNOHISTOQUÍMICA***

El listado completo de todos los Ac utilizados en esta tesis se detallan en la tabla V.

**PROLIFERACION:** Descripción detallada en sección *proliferación*.

### **MARCADORES LINFOHISTIOCITARIOS:**

**1.- CD3, Pan T** (Dako Rabbit Anti-Human T Cell, Code No.A 452). Policlonal. Dilución 1/50.

**ESPECIFICIDAD:** Reacciona con la porción intracitoplasmática del antígeno CD3 expresado en las células T. La proteína consiste en una cadena de cinco polipéptidos designados como gamma, delta, epsilon, zeta y eta de 16 a 28 kD. El antígeno CD3 se detecta en principio en los timocitos tempranos, lo que representa una de las primeras señales de la estirpe linfóide. En timocitos corticales el antígeno está presente sobre todo como componente intracitoplásmico. Aparece en la superficie celular en el estadio de timocito medular. Las células de Purkinje del cerebelo parecen expresar también el antígeno CD3. Es el marcador más específico para células T en material fijado y parafinado.

**REACTIVIDAD:** Células T tímicas y de tejidos linfoides periféricos. Reacciona con la mayoría de los linfomas T, a excepción de parte de los anaplásicos de alto grado.

**2.- CD79a** (DAKO clon HM57; Code No.M 7051). Monoclonal. Dilución 1/50

**CARACTERISTICAS:** Es un heterodímero formado por los polipéptidos mb1 y B29, asociado de forma no covalente con el receptor de membrana de las Ig de las células B; es por tanto un complejo antigénico de membrana de las células B. Cuando el antígeno se une a este complejo se produce una transducción intracitoplásmica acompañada de una fosforilización de distintos componentes. Así pues el dímero mb-1/B29 es a la célula B lo que el CD3 es a la célula T.

**ESPECIFICIDAD:** Es un antígeno temprano de la estirpe B y que persiste desde el estadio pre-B al de célula plasmática en el que aparece a nivel citoplasmático. Aparece en humanos y en distintas especies de mamíferos. Marca leucemias B de células precursoras, linfomas B y algunos mielomas. Este anticuerpo es válido en cortes de parafina y extensiones citológicas, pero no para cultivo de tejidos [Milner RJ et al, 1996].

**3.- S-100** (DAKO Code No. Z 311). Policlonal. Dilución 1/400.

**CARACTERISTICAS:** S100 se ha aislado del cerebro de vaca (según el método de BW Moore) con distintos buffers que contienen 2.5 mM de EDTA y 0.1 mM de 2-Mercaptoetanol. Se realiza posterior purificación por cromatografía de afinidad, utilizando anticuerpos para contaminar las proteínas cerebrales. El suero se ha purificado por absorción con fase sólida con plasma humano y suero bovino.

**ESPECIFICIDAD:** El suero reacciona con la S100 A y B bovina, y tiene una fuerte reacción cruzada con la S100 A y B humana. También se ha demostrado esta reacción cruzada con la rata y el canguro. El suero se ha testado en varios tejidos incluidos en parafina y mostraron ser específicos de forma estricta a la S100; también son positivas las células de Schwann del sistema nervioso periférico, en piel los melanocitos, tumores melanocíticos y las células de Langerhans. En ganglio linfático, las células reticulares interdigitantes son positivas a este Ac [Fondevila D et al, 1989].

**4.- MAC 387 histiocitario (DAKO. Code No. M 747). Monoclonal. Dilución 1/100.**

**ESPECIFICIDAD:** Dako MAC 387 reacciona con el antígeno leucocitario L1 expresado en neutrófilos, monocitos, algunos macrófagos reactivos, epitelio escamoso en mucosa y epidermis reactiva. El antígeno L1 está formado por tres cadenas polipeptídicas unidas por enlaces no covalentes, con un peso molecular total de 365 kD.

**REACTIVIDAD:** Se encuentra en citoplasma de muchas células mielomonocíticas. El Ac reacciona con el sustrato predominante de macrófagos reactivos y también se observa en histiocitosis (maligna o síndrome hemofagocítico).

**5.- Kappa Light Chains (DAKO. Code No. A 191). Policlonal. Dilución 1/400.**

**PRESENTACION:** Fracción de inmunoglobulinas purificadas del suero de conejo anti- cadenas ligeras KAPPA humanas.

**INMUNOGENO:** Cadenas ligeras KAPPA humanas aisladas de orina de pacientes con proteinuria Bence Jones (mieloma Bence Jones)

**ESPECIFICIDAD:** El Ac reacciona con la cadena Kappa libre, así como las unidas a moléculas de inmunoglobulinas. Tiñe preferentemente la Ig intracitoplasmática.

**APLICACIONES:** Tipificación de cadenas KAPPA libres o unidas a Igs.

**6.- Lambda Light Chains (DAKO. Code No. A 193). Policlonal. Dilución 1/400.**

**PRESENTACION:** Fracción de inmunoglobulinas purificadas del suero de conejo anti- cadenas ligeras Lambda humanas.

**INMUNOGENO:** Cadenas ligeras LAMBDA humanas aisladas de orina de pacientes con proteinuria Bence Jones (mieloma Bence Jones)

**ESPECIFICIDAD:** El Ac reacciona con la cadena LAMBDA libre, así como las unidas a moléculas de inmunoglobulinas. Tiñe preferentemente la Ig intracitoplasmática.

**APLICACIONES:** Tipificación de cadenas LAMBDA libres o unidas a Igs.

**7.- J-Chain policlonal prediluida. Biomeda.**

La cadena J es un componente unido a las inmunoglobulinas poliméricas. Tiene un peso molecular de 15000 y una estructura diferente a los demás polipéptidos de las Ig. Es rica en residuos de cisteína y está unida por puentes disulfuro a las subunidades IgA e IgM en relación de una cadena J por polímero, independientemente del tamaño de éste.

**E.- ACTIVIDAD PROLIFERATIVA NUCLEAR****Reactivos:****1. Anticuerpos monoclonales:**

PC-10 ó PCNA. 2 ML. Cod. M879. Dako.

MIB1. 1 ML. Cod. 0505. Immunotech.

## 2. Analizador de Imagen CAS-2 en el PROGRAMA DE PROLIFERACION NUCLEAR

### **Procedimiento:**

Se determina la actividad proliferativa del tejido con IHQ utilizando los AcMo. PC-10 y MIB1 [Gerdes J, Dallenbach F et al, 1984; Gerdes J, Lemke H et al, 1984; Hall PA et al, 1990; Waseem NH et al, 1990; Gerdes J et al, 1991; Marcos B et al, 1993; Sabattini E et al, 1993; Mazerolles C et al, 1994; Li T-J et al, 1995; Ross W et al, 1995]. Antes de proceder a la cuantificación con el analizador de imagen CAS-200 se han de seguir una serie de condiciones:

1. Comprobar la calidad de la IHQ.
2. Evitar mediciones en áreas periféricas, zonas desvitalizadas, con componentes inflamatorios, calcificaciones, necrosis ó artefactos.
3. Seleccionar áreas con más cantidad de núcleos por campo y mayor actividad proliferativa.

### **E.1.- ANTICUERPOS MONOCLONALES DE PROLIFERACIÓN. CARACTERÍSTICAS.**

#### **\*. PCNA . PC-10 (Dako Code No.M 879)**

**CARACTERÍSTICAS:** El antígeno de proliferación nuclear (PCNA o ciclina) se define como un polipéptido nuclear, cuya síntesis alcanza su máximo durante la fase S del ciclo celular. Se ha identificado recientemente como una proteína accesoria de la polimerasa Delta. El PCNA es esencial para la síntesis de ADN celular y es requerida para la replicación y reparación del ADN. El gen humano PCNA ya ha sido aislado y secuenciado (Travalli). PC-10 reacciona con PCNA de todas las especies de vertebrados, insectos y levaduras (*Schizosaccaromyces pombe*).

**CLON:** PC.10 (inmunógeno: PCNA de rata hecho en proteína A expresado en el vector pR1T2T).

**SUBCLASE:** Ig G2a, Kappa.

**CONCENTRACION DE Ig DE RATON:** 480 mgug/l

**CONCENTRACION DE PROTEINA:** 15,1 g/l

**REACTIVIDAD:** El PC-10 reacciona con células proliferantes en todos los tejidos. En los linfomas no-Hodgkin, se ha comprobado que existe una relación lineal entre el MIB1 y el PCNA<sup>1</sup>. Pueden existir ciertas alteraciones en la regulación de la expresión del gen del PCNA debido al incremento de la vida media del RNAm, de forma que puede aumentar también el nivel de PCNA en algunas células neoplásicas [García RL et al, 1989; Hall PA et al, 1990; Kamel OW et al, 1991; Mc Cormick D et al, 1992].

#### **\*. MIB1 (Ki-67 en parafina) . Immunotech. Code No. 0505**

**ESPECIFICIDAD:** El anticuerpo monoclonal MIB1 reacciona con el antígeno nuclear Ki-67 asociado a la proliferación nuclear y al desarrollo del ciclo celular (fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M) y ausente en la fase de reposo nuclear (G<sub>0</sub>). Este anticuerpo reconoce la forma nativa del antígeno Ki-67 y los fragmentos recombinantes

de la molécula del Ki-67.

**CLON:** Mieloma X63 Ag 8,653 x Balb/c de células de bazo.

**SUBCLASE:** IgG1 de ratón.

**REACTIVIDAD:** Reacciona con células proliferantes de todos los tejidos. En el timo, la mayoría de los timocitos corticales lo expresan, mientras que los de la médula sólo ocasionalmente. En el tejido linfóide: los centros germinales lo expresan en gran cantidad de sus células, siendo inferior el número en otras áreas. En el tracto gastrointestinal reacciona con las células epiteliales mucosas en el cuello y la región basal (las células más superficiales son negativas). En el epitelio escamoso se unen preferentemente a las células basales [Gerdes J, Dallenbach F et al, 1984; Gerdes J, lemke H et al, 1984; Gerdes J et al, 1991; Gerdes J et al, 1992; Cattoretti G et al, 1992; Fournel-Fleury C et al, 1997].

## **E.2.- ANALIZADOR DE IMAGEN.**

Un Analizador de Imagen es la unión del microscopio óptico y del ordenador al mundo de la Patología diagnóstica, con el fin de facilitar la medida, cuantificación y análisis de las células por medio de la densitometría y el análisis estadístico [Bacus JW et al, 1987].

El Analizador de Imagen cuenta con:

- a. *Microscopio óptico convencional* modificado al incorporar dos cámaras de televisión que producen señales en función de la longitud de onda que transmite el microscopio al observar las muestras. Convierte la señal en distintas longitudes de onda, las digitaliza y las diseña en imágenes.
- b. *Un ordenador* con al menos 30 Mbytes en disco duro.
- c. *Dos monitores en color* para el sistema de control y selección de los menús y otro para recuperar las imágenes, tanto digitalizadas como normales, del procesador de imagen. Ambos monitores cuentan con una resolución de 256x256 "píxeles" o número de puntos.

El sistema de imagen consta por lo tanto de:

1. Sistema de captación de imagen (microscopio óptico).
2. Procesador digital que transforma las imágenes para el manejo por el sistema informático.
3. Dispositivo de presentación de la imagen (monitor).
4. Sistema de almacenamiento y/o de transmisión de imágenes.
5. Ordenador que ejecuta los programas de análisis y manipula las imágenes hasta obtener los resultados deseados.

El Analizador de Imagen contiene varios programas de software, de los cuales han sido utilizados para esta tesis: programa de proliferación nuclear o índice proliferativo (proliferation index programme -PI-) y el programa de análisis del ADN (Quantitative DNA Analysis). Se efectuó una cuantificación de la actividad

proliferativa en cada uno de los subtipos histológicos con el programa "Índice proliferativo" (PI) para valorar los anticuerpos monoclonales: MIB1 y PC-10.

### ***Programa de Proliferación nuclear (PI).***

· Nos va a permitir cuantificar el área de proliferación nuclear expresado en tanto por ciento. En este programa se puede elegir la opción de cuantificación sobre improntas, extensiones o cortes histológicos.

· El programa muestra una regleta con distintas opciones; antes de realizar la cuantificación, es necesario calibrar las cámaras y el analizador (*Set Light*), ajustando los sensores de las dos cámaras de TV incorporadas al microscopio. Este paso se lleva a cabo con el portaobjetos en la platina donde se enfoca un área libre de tejido. A continuación, se procede a incluir los datos de identificación (*Label*). El siguiente paso, es ajustar el perímetro nuclear (*Nuclear Threshold*) delimitando los núcleos del citoplasma o estroma celular, remarcando en color verde. Dentro de esta opción se encuentran varias posibilidades:

- a) TOGGLE, enseña de forma intermitente la muestra, conforme ajustamos el perímetro nuclear.
- b) INCREASE, aumenta el contraste del perímetro nuclear.
- c) DECREASE, disminuye el contraste del perímetro nuclear.
- d) SET STEP SIZE, tamaño estandarizado de contraste. Viene prefijada por defecto en 0,01
- e) HELP, opción de ayuda.
- f) EXIT, salida al menú inicial.

A continuación, se procede a fijar los umbrales de positividad (*Antibody Threshold*) en los que se diferencian los núcleos marcados positivamente con el AcMo de los negativos. Los núcleos quedan en color marrón sobre el verde anterior. Finalizados estos ajustes, se procede a cuantificar la actividad proliferativa (Análisis) de forma semiautomática en la opción *MEASURE* o conformidad para la medida, dentro de la cual se ofrece ayuda con:

- 1.- IMAGE SEGMENTATION permite eliminar zonas con necrosis o artefacto, evitando falsas positivities.
- 2.- AVERAGE NUCLEAR AREA Y AVERAGE ANTIBODY AREA tamaño medio de  $54$  y  $27\mu^2$  prefijado, que se corresponden con el tamaño medio del linfocito.
- 3.- TOGGLE MASK, UNDO CIRCLED AREAS y CLEAR AVERAGE AREAS permite borrar partes del campo.

La opción posterior *MERGE* acumula los resultados de cada uno de los campos medidos. En cada uno de los casos, se medieron 10 campos de  $1000\mu^2$  cada uno, para conseguir uniformidad de medida.

### ***Expresión de los resultados.***

El analizador de imagen valora la actividad proliferativa el programa "Índice de proliferación" (Proliferation index) cuantificando o valorando el área nuclear positiva en relación al área nuclear total

expresado en tanto por ciento (% ANP).

Los resultados aparecen expresados con dos regletas; la primera, refleja los resultados de todos los campos y la inferior, los datos del último campo medido.

a) Total de campos contados,

b) Suma de la proliferación nuclear expresada en %, es decir, núcleos positivos contabilizados en función del área total,

$$\frac{\text{núcleos positivos}}{\text{área total}} \times 100$$

c) Total de núcleos contabilizados,

d) Área de proliferación nuclear, es decir, núcleos marcados positivamente entre núcleos totales y partido del área total, expresado en %.

$$\frac{\text{núcleos positivos / núcleos totales}}{\text{área total}} \times 100$$

e) Área nuclear total expresada en micras ( $\mu^2$ ).

## F.- ESTUDIO CITOMÉTRICO.

### *Material requerido*

· Para el estudio en ambos métodos citométricos se utilizó tejido incluido en parafina, para lo cual se procedió a una desparafinación, hidratación y disgregación hasta obtener células aisladas en *suspensión celular* tanto para estudios de citometría de flujo (CMF) como estática (CME).

· El tejido incluido en parafina produce histogramas de peor calidad [Esteban JM et al, 1991], pero se pretendía obtener resultados mas homogéneos teniendo solo en cuenta material en parafina [Frierson HF, 1988; Kallionemi OP, 1988; Alanen KA et al, 1989; Laskey RA, 1989; Esteban JM et al, 1991; García R et al, 1994;]. Se empleó el método de Hedley y cols. [Hedley et al, 1984; Hedley et al, 1985] para procesar el material, aunque la digestión con pepsina puede alterar la valoración del ADN, disminuyendo la sensibilidad del núcleo al fluorocromo, dando falsas diploidías en verdaderas aneuploidías [Alanen KA et al, 1989; García R et al, 1994].

***Tratamiento del material incluido en parafina para obtener la suspensión celular según el método de Hedley y cols (1985).***

1. Realizar varios cortes a 25 micras.
2. Desparafrinar en xilol durante 24 a 48 h. dependiendo de la antigüedad del material e hidratar sucesivamente en alcoholes 100%, 70%, 50% y 30% durante 30 min cada uno.
3. Dos cambios en T.B.S. o P.B.S.
4. Disgregar el material mecánicamente en 2 ml. de pepsina 0,5% a pH 1,5 e incubar a 37°C durante 30 min. en un baño de agua que previamente tiene esta temperatura.
5. Aumentar el volumen a 20 ml. con medio RPMI-1640 (en frío). Parar la reacción con unas gotas de TRIS pH 11.
6. Esta suspensión celular es la base para ambos métodos citométricos, y se separa en dos partes porque a partir de ella se procesan por separado.

***PEPSINA***

- \* Pesar 250 mg. de pepsina (SIGMA).
- \* Disolver en 50 ml. de ClNa 0,9%
- \* Ajustar a pH=1,5 (con ClH 12N)
- \* Incubar a 37° C durante 30 min. (agitando de vez en cuando)
- \* Guardar en alícuotas de 2 ml. a -20°C

***TRIS pH=11***

- \* Pesar 12,11 gr. de Tris(hydroxymethyl)-aminomethan. (Merck)
- \* Disolver en 100 ml. de agua destilada.
- \* Ajustar a pH=11.

***F.1.- CITOMETRÍA ESTÁTICA (CME).***

Esta técnica permite marcar y reconocer el ADN, mostrando las distintas fases del ciclo celular. Está basada en la técnica de Feulgen, reacción específica y cuantitativa de tinción de ADN donde el ácido clorhídrico (5N) hidroliza las bandas ribosa-purina dando residuos azúcar-aldehídos y el reactivo de Schiff (colorante azul) reacciona con el aldehído-azúcar dando un precipitado de color azul (Azure A), reconocida por el analizador de imagen CAS-200. Es importante el análisis del contenido del ADN, en relación con la proliferación de las células neoplásicas, habiéndose comprobado una cierta tendencia a un contenido anormal en numerosos tipos de tumores: mama, pulmón, tracto gastrointestinal, linfomas,...etc [Montironi R et al, 1992; Grace J et al, 1993; Lee S et al, 1994; Böcking A et al, 1995].

**Procedimiento:** Tomando como base la suspensión celular ya citada:

- Filtrar el material por una malla de  $0,2 \mu^2$ .
- Lavar por centrifugación suave durante 6 min.
- Decantar el sobrenadante.
- Lavar en PBS o ClNa 0,9%
- Citocentrifugar durante 5 min.
- Decantar el sobrenadante.
- Secar las preparaciones de 10 min. a 2 h.
- Fijar en formol neutro al 10% durante 30 min.
- Lavar en agua destilada y secar las preparaciones a T° ambiente.
- Posteriormente las preparaciones se tiñen con una variante de la técnica de Feulgen, que lleva Azure A como colorante para el contenido en ADN, ya que produce la longitud de onda que reconoce el Analizador de Imagen CAS 200, con con el programa de ploidía QDA (Quantitative DNA Analysis - Análisis cuantitativo del ADN).

#### **TÉCNICA DE FEULGEN (variante de la técnica clásica) :**

##### **Material**

Extensiones celulares, slide de calibración con hepatocitos de rata, agitador magnético, papel de filtro, erlenmeyer, pinzas...

##### **Reactivos:**

##### *1. Solución de coloración*

|                                                                          |          |
|--------------------------------------------------------------------------|----------|
| Azure A (Cod. A6270 Sigma).....                                          | 2,28 gr. |
| Bisulfito Sódico $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Cod. 9000 Sigma).... | 8gr.     |
| Acido Clorhídrico 12N .....                                              | 5 ml.    |
| Agua destilada .....                                                     | 595 ml.  |

##### *2. Solución de lavado*

|                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------|------------|
| Bisulfito Sódico $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Cod. 9000 Sigma).. | 7,68 gr.   |
| Ácido Clorhídrico 12N .....                                            | 7,5 ml.    |
| Agua destilada.....                                                    | 1792,5 ml. |

##### *3. Alcohol ácido*

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Ácido Clorhídrico 12N ..... | 6 ml.   |
| Etanol al 70%.....          | 600 ml. |

##### *4. Ácido clorhídrico 5N*

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Ácido Clorhídrico 12N ..... | 300 ml. |
| Agua destilada.....         | 720 ml. |

La solución de coloración debe estar protegida de la luz, agitándose durante 2 h. como mínimo, filtrarla con cuidado porque se evapora el  $\text{SO}_2$ . La solución de coloración y la de lavado son estables durante 4-6 h. a T° ambiente.

Es una técnica donde el nucleolo y el citoplasma no se tiñen; el contenido normal de ADN es 1; en las células malignas el contenido de ADN puede incrementarse o incluso disminuir.

***Procedimiento (variación de la Tinción de Feulgen clásica):***

- Sumergir en HCl 5N durante 65 min. agitando.
- Pasar a la "solución de coloración" durante 60 min. agitando.
- Hacer tres lavados en "la solución de lavado" durante 30 sg, 5 min y 10 min, sucesivamente.
- Hacer tres cambios de 5 min. en agua destilada.
- Alcohol ácido durante 5 min.
- Alcohol de 100 durante 10 min.
- Xilol durante 10 min.
- Montar en medio sintético (Eukitt).

***Programa de ploidía.***

Este programa requiere calibrar las cámaras como en el programa PI ya comentado.

Se calibra el índice de ADN con un control de hepatocitos de rata ya que tienen una cantidad de ADN semejante al humano (el programa está diseñado en función de la cantidad de ADN humano), y con una extensión control de ganglio canino para ajustar los límites normales de diploidía en perro. Es necesario hacer un recuento nuclear en correctas condiciones de conservación, es decir, con núcleos enteros y uniformes, para valorar los casos. El coeficiente de variación de los hepatocitos no debe ser superior al 3%.

Las opciones que presenta este programa para la valoración del ADN son:

- LABEL: Fichar los datos
- SET-LIGHT: Calibrar las cámaras
- MEASURE:
  - valor 0 - acepta todos los núcleos automáticamente
  - valor 1 a 8 - acepta los núcleos clasificándolos por distintos tamaños de forma totalmente subjetiva (los fija el observador)
  - valor 9 - anula ese núcleo para que no sea contabilizado
- ANALYZE: procede a la medición de las muestras donde nos encontramos con las siguientes opciones:
  - CHECK-LIGHT: comprobar la iluminación de los casos
  - BOUNDARY: ajusta el perímetro nuclear para ser identificados.
  - CLASSIFY: clasifica los núcleos en seis categorías distintas, numeradas de 1 a 6.

Dentro de esta opción, se permite cortar y aislar núcleos que se encuentren muy próximos evitando

dobletes y tripletes así como el recuento de núcleos rotos o solapados.

- SELECT-2ND: posibilita identificar un segundo pico de ADN.
- SCALE: escala los histogramas.
- AREA ABCD: marca las distintas áreas de contenido de ADN en  $G_0G_1$ , S,  $G_2$ +M.
- ESTADÍSTICA
- CLEAR: borrado de los datos.

Los resultados se expresan por medio de distintos parámetros:

- a.- en forma del histograma
- b.- cantidad de ADN en cada una de las áreas
- c.- coeficiente de variación del área A
- d.- presencia de más de un pico de ADN dentro del histograma.

## F.2.- CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF).

La Citometría de Flujo se realizó sobre la suspensión celular obtenida del material parafinado, sometiendo el tejido a un proceso de desparafinización e hidratación ya detallado para citometría estática. Las muestras fueron teñidas medidas en un citómetro de flujo EPICS-C (Coulter) con el programa PARA-1, que calcula el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular  $G_0$ ,  $G_1$ , S y  $G_2$ M [Hedley W et al, 1983, 1984 y 1985; Frierson HF, 1988; Rutteman GR et al, 1988; Garland P et al, 1989; Joensuu H et al, 1990; Minke JM et al, 1990; Frierson HF, 1991; Scanziani E et al, 1991; Macartney JC, 1993; Teske E et al, 1993; García R et al, 1994; García R et al, 1997].

### Tinción de las muestras.

- Suspender las células aisladas del tejido en P.B.S. Se tratan con Ribonucleasa A antes de la tinción con Ioduro de Propidio utilizando 1 ml. de muestra en aproximadamente un millón de células al que se le añade 10  $\mu$ l. de RNasa, dejando actuar el enzima durante 30 min. a 37 °C en agitación.
- Lavar las células tres veces en P.B.S.
- Teñir las células con 500  $\mu$ l. de Ioduro de Propidio (mantener la muestra a 4 °C).
- Leer en el Citómetro de Flujo entre 30 min. y 24 h. después de la tinción.

Se utilizaron como controles de ploidía, suspensiones de ganglio linfático canino tratadas de la misma forma que las muestras. La tinción del ADN con Ioduro de Propidio se utiliza para calcular el ciclo celular, determinando el porcentaje de células que se encuentran en fase  $G_0$ ,  $G_1$ , S ó  $G_2$ +M. Los resultados aparecen en forma de histogramas.

El análisis del ciclo celular ha sido estudiado mediante el programa PARA-1, con el que se calculó el porcentaje de células que estaban en cada fase del ciclo celular. El análisis del contenido en ADN -índice de ADN- se realiza según una fórmula establecida:

$$\text{Índice de ADN} = \frac{\text{Canal de la muestra problema}}{\text{Canal de la muestra control}}$$

Según esta fórmula, se calculan los rangos para la diploidía y aneuploidía.

### ***F.3.- VALORACIÓN DEL CICLO CELULAR EN CITOMETRÍA:***

El criterio considerado en ambos métodos citométricos se ha basado en un estudio cualitativo conjunto del histograma y el índice numérico (Tabla VI). La mayor información sobre el ciclo está en la *forma, contenido y simetría* de la gráfica, dato que prepondera en sí mismo (ya que a veces una diploidía puede estar definida por una gráfica simétrica o una aneuploidía por una gráfica asimétrica aunque los índices numéricos se escapen de los límites establecidos para diploidía y aneuploidía).

El índice de una población **diploide** normal es 1, y toda variación mayor o menor constituye una aneuploidía. Sin embargo, los controles normales producen rangos variables cuando se trata con tumores sólidos que requieren un tratamiento enzimático en su procesamiento. Una muestra se considera **aneuploide** cuando el índice de ADN -*DNA Index: DI*- es mayor de 1,2 (HIPERDIPLOIDE), o cuando el índice DI es menor de 0,8 (HIPODIPLOIDE), o bien cuando el pico  $G_0+G_1$  sea asimétrico aunque su DI se encuentre dentro del rango de diploidía para el material en parafina [García R et al, 1994; Obeso G et al, 1994; García R et al, 1997].

Se define otro grupo conocido como DIPLOIDE CON FASE S ALTA, en caso de diploidías con un alto valor en la fase S (mayor del 15%), como si mostraran el solapamiento con otra población con mayor tasa proliferativa que pudiera enmascarar una aneuploidía [García R et al, 1997; García R et al, 1994; Laskey RA et al, 1989; Obeso G et al, 1994]. Se considera una fase S baja la media del valor de la fase S en los ganglios reactivos control (5-6%), intermedia (6-15%) y alta mayor del 15%.

*Los Coeficientes de Variación (CV)* se desestiman en el caso de la Citometría Estática por tratarse de gráficas continuas de menor resolución, donde no es posible la división real en fases del ciclo celular, excepto en controles diploides tratados con las condiciones óptimas de manejo. Además, el material en parafina da peores histogramas con mayores CV [Claud RD et al, 1989]. En Citometría de Flujo, el criterio normal de los CV se mantiene (10-12% para material en parafina) [García R et al, 1994; Obeso G et al, 1994; Böcking A et al, 1995; Marcos B et al, 1998].

## G.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos han sido analizados con el programa de estadística SPSS para variables biológicas. Además de la estadística básica, con correlación estadística por los métodos Pearson, Kendall y Spearman, realiza las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, para las cuales considera un nuevo grupo formado por todos aquellos animales que hayan superado en días de vida el día 1, es decir, desecha todos los animales que han sido sacrificados el mismo día del diagnóstico. Se considera día 1 la entrada o admisión en el centro veterinario, descartando la visión subjetiva del dueño sobre la fecha de comienzo de la sintomatología propia del linfoma, para intentar homogeneizar todos los resultados. El otro problema añadido es que todos los animales han sido sacrificados, por lo que la supervivencia se transforma en un dato relativo. Las distintas variables recogidas como edad, sexo, raza, estadio, tratamiento (sí/no),... se analizan con respecto a la posible supervivencia observada. Los casos felinos no han sido considerados en el estudio estadístico por ser sólo ocho en número.

Los resultados obtenidos en proliferación, CMF y CME se han analizado estadísticamente mediante dos pruebas no paramétricas: la prueba de Wilcoxon para variables dependientes y la prueba de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis para comparar la homogeneidad de dos medias en el caso de muestras diferentes o independientes.

Estas pruebas no presuponen ningún tipo de distribución de probabilidades para los datos, de ahí que reciban el calificativo de no paramétricas y son aplicables a muestras de pequeño tamaño. Para este análisis se ha utilizado el programa R-SIGMA.

La prueba de Wilcoxon no sólo considera el signo de las diferencias sino también, en cierta medida, su magnitud. Se utiliza en caso de muestras interrelacionadas; los individuos de las dos muestras son los mismos, ante dos situaciones diferentes.

La prueba de Mann-Whitney permite determinar si existen diferencias, en cuanto a las medidas de centralización entre dos muestras independientes.

En cada parámetro se ha tomado como nivel valorable de significación:  $p < 0,05$  o  $p < 0,01$  que son los valores habituales estadísticos en un trabajo con datos tan dispares en cantidad y heterogeneidad [Kaplan EL et al, 1985; Carrasco JL, 1989].

#### **IV.- RESULTADOS**

## **A. HALLAZGOS CLÍNICOS (edad, sexo, raza, laboratorio, estadio clínico, tratamiento):**

\* **EDAD:** Las edades de este grupo de animales oscilan entre 2 y 12 años, con un valor medio de 8.5 y una mediana de 9. En cuanto a las frecuencias de aparición según las décadas, un 22.2% tiene 12 años (6/27), un 7.4% 11 años (2/27), un 14.8% (4/27) 10 años, 11.1% (3/27) 9 años, 11.1% (3/27) 8 años, 7.4% (2/27) 7 años, 3.7% (1/27) 6 años, 14.8% (4/27) 5 años 3.7% (1/27) 3 años y 3.7% (1/27) 2 años.

\* **SEXO:** la proporción de presentación del linfoma en este grupo es de 20 machos por 10 hembras (2:1); es decir, un 66.6% en machos frente a un 33.3% en hembras.

\* **RAZA:** las frecuencias de aparición de las distintas razas es de 8/30 (26.6%) para el Pastor Alemán; 3/30 (10%) para Cocker, Boxer y cruces diversos; 2/30 (6.6%) en el Labrador, y 1/30 (3.3%) para las razas Spaniel Breton, Pequinés, West Highland, Chow-Chow, Pastor Belga, Airdale Terrier, Caniche, Griffon, Pastor Alsaciano, Podenco y Bulldog.

\* **ANALÍTICA SANGUÍNEA:** La anemia se observó en 9 casos de los 21 análisis estudiados (42.8%), aunque sólo en 6 de esos 9 casos había una clara afectación tumoral medular. En 7/21 ocasiones, se recogió un leucograma de stress con neutrofilia y linfopenia, pero sólo 4 casos mostraban afectación medular neoplásica. Los glóbulos blancos elevados se presentaron en 10/21 casos, con correspondencia medular en 8 (origen diverso: casos severos de disnea y tos, infecciones ...). Los 6 casos de linfocitosis (de un total de 17 análisis con posibilidad de valorar los linfocitos en sangre; 35.2%) coincidieron con 6 afectaciones medulares, y en 4 de ellos se presentó un cuadro leucémico con blastos linfoides en sangre. Neutrofilia se produjo en 14/17 casos (82.3%) y de ellos sólo 8 presentaban la médula infiltrada.

\* **ESTADIO CLÍNICO:** La valoración del estadiaje clínico de este grupo de linfomas se expresa bajo el perfil veterinario y médico, ya que el estadio IV en veterinaria incluye bazo y/o hígado dentro de un mismo bloque por considerar ambos órganos paralelos en la evolución del tumor, y en medicina humana se gradúan por separado por dar más importancia al hígado como órgano hematógeno (III bazo y ganglios; IV hígado y otros órganos). El estudio estadístico demostró que la supervivencia global de los animales fue significativamente superior en el caso de no estar el hígado afecto, factor que no se refleja en el estadiaje en veterinaria, ya que se considerarían en estadio IV. De los 26 casos en los cuales el estadio clínico pudo ser evaluado, un 76.9% (20/26) presentaban un estadio V (IV en medicina humana), un 19.2% (5/26) estadio IV (III en patología humana) y un 3.8% (1/26) fue estadio IV (también IV en humana).

\* **TRATAMIENTO:** Sólo nueve de los 30 animales recibieron poliquimioterapia por combinación de vincristina, ciclofosfamida y prednisona (COP), con metotrexate o adriamicina intercalado en ocasiones. Las supervivencias globales de tratados y no tratados, oscilaron en un rango de 0 días (sacrificio en el mismo día del diagnóstico) hasta un total de 203 días. Los tratados tuvieron un rango de duración de 12 a 203 días, con

un valor medio de 92.4 días. El tipo de respuesta en la inducción fue completa (RC) en 5/9, parcial en 1/9 y no hubo respuesta en 3/9.

**\* FORMAS CLÍNICAS ENCONTRADAS:**

*A) perro:* 20 multicéntricos (66.6%), 4 multicéntricos con expresión principalmente leucémica (13.3%), 4 tímicos (13.3%), un cutáneo (3.3%) y un intestinal (3.3%).

*B) casos felinos control:* De los 8 casos recogidos como control, 2/8 (25%) fueron linfomas primarios renales de naturaleza B, 3/8 (37.5%) primarios tímicos de naturaleza T, 1/8 (12.5%) del SNC B y los dos últimos multicéntricos B (25%).

**B. AFECTACIÓN NECRÓPSICA TUMORAL:**

*Macroscopía de los distintos órganos con infiltración por linfoma.*

**1. GANGLIO:** 30/30 (100%) de los casos en perro están infiltrados. Se observa un marcado incremento de tamaño, de 3 a 10 veces el original. El ganglio con linfoma es fácilmente palpable, firme, bien definido, indoloro, frío (Tª corporal) y generalmente móvil por no estar adherido a piel o a planos profundos. La cápsula está tensa y lisa, y al corte protuye el interior, que se caracteriza por tener un patrón de crecimiento sólido difuso con coloración blanquecino-rosácea; es un tejido carnoso friable, menos estructurado y firme que el ganglio normal, que desprende gran cantidad de material "lechoso" denso. Si el tamaño es muy grande, suele haber necrosis central con mucha menor consistencia, incluso semisólida. En mediastino y mesenterio, cuando varios ganglios vecinos están infiltrados, pueden unificarse a una sola masa grande (bulky mass). El tipo de infiltración tumoral es difuso con permanencia mayor o menor de la estructura normal del ganglio dependiendo del grado, estadio y tipo histológico.

De los 8 gatos controles, en 6 casos se ha podido valorar el ganglio, donde el crecimiento era difuso, y en un caso con naturaleza T todavía estaban los folículos conservados (**Figura 2c**).

**2. BAZO:** Todos los casos donde el bazo ha sido valorable (26/26) ha estado implicado por el linfoma. Se caracteriza por un aumento de tamaño en mayor o menor grado - esplenomegalia - que en ocasiones puede hasta hacerse palpable, permaneciendo indoloro. La cápsula se presenta tensa, con superficie rugosa ("grumosa") que deja ver pequeños nódulos múltiples. Al corte protuye al exterior; el tejido es friable, sin estructura, blando y carnoso, que desprende abundante material "barroso". Muestra un claro incremento de la pulpa blanca formando nódulos múltiples de 5-10-20 mm, con incremento también de la pulpa roja, que toma un aspecto carnoso húmedo con coloración rosácea (6/26); en corte histológico se observa un infiltrado homogéneo blástico difuso (14/26) o también en pulpa blanca que se extiende a senos de la pulpa roja (6/26); cuando ésta última no está comprometida presenta hemorragia, congestión, edema y fibrosis muy avanzada (5/26). Puede haber infiltración difusa con un aumento homogéneo del parénquima sin diferenciar pulpa

blanca y roja (15/26). Raramente hace nódulos macroscópicos (2/26), aunque pueden identificarse en cabeza y cola, con coloración blanquecina y tamaños de incluso 5 ó 6 centímetros. En ocasiones se produce una atrofia total de la pulpa blanca con infiltración parcial de la roja (1/26) (Figuras 1d y 1e). El bazo en el gato control se ha comportado de forma similar, con crecimiento difuso nodular (dos ocasiones), atrofia total esplénica (1 caso) o parcial de la pulpa blanca (1 caso) o de la pulpa roja (dos casos) con hemorragia y edema, paralelo a un incremento de la blanca.

**3. HÍGADO:** Aumento de tamaño - Hepatomegalia - general y uniforme, incluso puede hacerse palpable por debajo del arco costal. La infiltración masiva dibuja el patrón lobulillar, portal y periacinar del parénquima hepático hasta hacerse claramente visible (16/26). Aunque es muy rara, se ha visto una infiltración difusa parenquimatosa con la formación de nódulos macroscópicos subcapsulares. En los casos de no haber infiltración neoplásica, sí suele darse una marcada degeneración grasa con típico aspecto amarillento friable (10/26). En el gato se han dado dos casos de infiltración periportal, con además infiltración difusa parenquimatosa, con nódulo macroscópico, en 3 ocasiones (Figura 1b).

**4. AMÍGDALAS:** En todos los casos estudiados (16/16 - 100%) al igual que en el ganglio, también se produce un aumento de tamaño generalizado, con crecimiento difuso sólido que protuye hasta hacer desaparecer las criptas, desplazando completamente la glándula salivar accesoria. La superficie está tensa, y al corte se observa una coloración blanquecina. En corte histológico se observa un infiltrado difuso, donde en ocasiones permanecen folículos, mantos o trabéculas (2/16) (Figura 2a).

**5. MÉDULA ÓSEA:** Toma el aspecto homogéneo de "médula empaquetada": macroscópicamente corresponde a una médula rica, carnosa, blanda y más pálida de lo habitual. Histológicamente es un infiltrado difuso intraparenquimatoso (11/18), que en ocasiones conserva cierta proporción de tejido hematopoyético normal todavía funcionando y tejido graso habitual (5/18). Puede no estar infiltrada (2/18). En el gato sólo dos presentan incremento de tamaño con crecimiento difuso, y en un caso los folículos están conservados. Las cinco médulas recogidas de gato presentan infiltración por el linfoma en mayor o menor grado.

**6. INTESTINO:** No ha presentado afectación en 14/21 de los casos. La macroscopía del intestino afectado en la forma primaria de linfoma intestinal (1/30) muestra nódulos blanquecinos aislados de 5-10 cm, o incluso segmentos/tramos enteros de 20-30 cm, donde todo el grosor de la pared está comprometido, desde mucosa a serosa, protuyendo en la forma severa a ambos lados, con ulceración de la mucosa (con diarrea hemorrágica en la mayoría de los casos) y rigidez característica. Dependiendo del grado de compromiso de la pared produce o no obstrucción intestinal. Las placas de Peyer del tejido intestinal adyacente suelen estar claramente visibles por afectación tumoral. Cuando no es la forma intestinal del linfoma, puede haber un infiltrado tumoral con una marcada diferenciación plasmacítica-plasmablástica sobre la lámina basal, o incluso rompiéndola, que se extiende en mayor o menor medida a la submucosa del epitelio, o a muscular y serosa (6/21 en perro - 1/8 en gato control). El páncreas vecino suele estar también comprometido cuando hay

infiltración en digestivo (4/5 páncreas recogidos en perro). En gato sólo un tímico T presentaba infiltración del páncreas, que no coincidía con infiltración intestinal (Figuras 2b,2c,2d y 2e).

**7. RIÑÓN:** El riñón con la *forma primaria de linfoma renal* (0/30; 2/8 en los controles felinos) aparece con cierto aumento de tamaño, dependiendo del grado de infiltración. La frecuencia en perro es muy inferior a la presentada en el gato. Muestra nódulos pálidos en corteza, elevados con respecto a la superficie renal normal. Al corte muestra áreas/segmentos blanquecinos, generalmente corticales, que se difunden al interior medular. El riñón también puede aumentar de forma global por infiltración difusa, dando un aspecto pálido. La cápsula queda adherida y se desprende con dificultad. En linfomas generalizados encontramos infiltrados perivasculares o intraparenquimatosos, tanto en médula como en cápsula (10/21). No ha habido afectación alguna en 11/21 de los casos caninos.

**8. FORMA TÍMICA (MEDIASTINO):** (4/30 perros). La forma tímica T se caracteriza por ser una masa firme, blanquecina-pálida que ocupa la región torácica craneo-ventral. En gatos puede ser tan grande que desplace dorsalmente la tráquea y esófago, y caudalmente corazón y pulmón. En estos casos puede presentar implantes blanquecinos múltiples en pleura parietal y visceral, peri y miocardio, diafragma, con incluso metástasis nodulares en pulmón y atelectasias. En los linfomas felinos de estirpe T se ha infiltrado el pulmón adyacente. En en perro el desplazamiento no es tan llamativo. El mediastino también puede estar comprometido en linfomas generalizados de naturaleza B por la cadena ganglionar y presentar también extensión a estructuras vecinas.

**9. FORMA EPIDURAL:** el espacio epidural aparece puntualmente relleno de un material blanquecino semisólido con compresión medular (presenta el cuadro clínico correspondiente), LCR algo aumentado por deformación del espacio virtual normal. No se suele encontrar la masa primaria que origina la metástasis, así que se considera primario. La forma primaria de *linfoma epidural* sólo se ha presentado en un caso de gato control.

**10. PIEL:** El linfoma primario *cutáneo* (1/30 en perro) presenta desde un engrosamiento de la piel en placas con eritema-mácula-pápula, hasta la formación de nódulos tumorales verdaderos con ulceración y posibles piodermas secundarias. La forma *multicéntrica* presenta con frecuencia un edema subcutáneo marcado con aspecto gelatinoso por compromiso del sistema linfático. Ningún gato control ha presentado ni forma primaria ni extensión a piel de otra forma de linfoma.

**11. GENITALES/PRÓSTATA:** Dos perros presentan además tumores de Leidig testiculares, y de las 6 próstatas recogidas, 3 mostraban infiltración por el linfoma, además de una hiperplasia marcada. No ha habido infiltración por linfoma en ningún caso de linfoma felino.

**12. OTROS ÓRGANOS:** El *páncreas* suele estar comprometido de forma paralela al duodeno, ya sea con afectación primaria o generalizada; en un caso presenta un quiste asintomático en cabeza, pero no corresponde con infiltración clara duodenal. La glándula *adrenal* ha estado infiltrada en el caso de infiltración masiva renal, no en un riñón con infiltración inicial. La *vejiga* presentó émbolos tumorales en un caso de los cinco estudiados; en dos casos hubo una marcada displasia epitelial con cistitis aguda abscesificada. La *mama* estuvo infiltrada de forma difusa en un caso de linfoma multicéntrico generalizado. Un hallazgo de necropsia fue la calcificación distrófica de la *epiglotis* en un caso con marcado compromiso respiratorio.

**\* TUMORES SECUNDARIOS:** En varias ocasiones el linfoma se ve acompañado por la presencia de otros tumores: un caso con un hepatocarcinoma; otro con un tumor mamario previamente extirpado; en dos ocasiones el perro presenta una patología politumoral con adenocarcinoma bronquiolo-alveolar y tumor de células de Leydig testicular; u otro caso con 2 mastocitomas, tumor de células de Leydig testicular y adenocarcinoma de glándulas perianales.

### C. MORFOLOGÍA ÓPTICO - ELECTRÓNICA

Todos los casos estudiados han sido de alto grado, donde se diferencian citologías de los distintos subtipos: 13/30 (43.3%) linfoblásticos LB - de los cuales 5 son B (Figuras 3 a 6) y 7 son T (Figuras 7 a 9), 10/30 (33.3%) inmunoblásticos IB (Figuras 10 a 12), 5/30 (16.66%) centroblásticos CB (Figuras 13 a 15), y 2/30 (6.6%) extranodales, uno cutáneo T (Figuras 16 a 18) y otro un MALT intestinal plasmablástico B de alto grado (Figuras 19 y 20). Por tratarse de neoplasias de alto grado, el patrón de cielo estrellado se encuentra de forma constante sin relación alguna con los distintos subtipos histológicos (Figura 21).

El **linfoblasto LB** es un blasto linfoide mediano (10 micras) con núcleo redondo u oval en la estirpe B y convoluto o cerebriforme en la estirpe T. Los B muestran nucleolos múltiples e hiperplásicos y cromatina dispersa, en parte marginada. Los T exhiben cromatina en acúmulos densos irregulares siendo los nucleolos pequeños y múltiples, lo que les confiere un aspecto de núcleo denso, hiper cromático e hiperlobulado con M.O. El citoplasma es mediano y basófilo por la cuantía polirribosómica, así mismo con escasas organelas, aunque destacan las mitocondrias despolarizadas, algunos acúmulos lipoides, centriolos y excepcionales lisosomas. Puede observarse cierta diferenciación a plasmática en la estirpe B. Suele ir acompañado con un patrón de cielo estrellado por lisis celular debido a la dinámica tumoral con mitosis abundantes y a la fagocitosis de restos nucleares por histiocitos. Se diferencian dos grupos principales: el tipo *Burkitt* B (Figuras 3, 4, 5 y 6) y el tipo *convoluto* T (Figuras 7, 8 y 9).

El **inmunoblasto IB** tiene un tamaño grande (aprox. 12 micras), con núcleo de 8 a 10 micras, cromatina de predominio dispersa, escasa marginada a membrana nuclear y nucleolo hiperplásico en número variable (1-3) más frecuente en el centro del nucleolema; el citoplasma es amplio y basófilo con poca densidad de

organelas, abundantes ribosomas, escasas mitocondrias y en la estirpe B, frecuente diferenciación plasmacítica con gran desarrollo del RER, paralelo a la membrana celular, con dilatación de las cisternas rellenas de material proteico, formando estructuras de aspecto "cristaloide", visibles al M.O. como acúmulos gutulares (Figura 20). En algunos casos (Figuras 11 y 12), el crecimiento tumoral se acompaña de un notorio desarrollo de células plasmáticas con distinto grado de diferenciación (plasmablastos). En la estirpe T el citoplasma exhibe una claridad característica por imbibición de solutos (Ib de células claras).

El centroblasto CB es similar al fisiológico del centro germinal pero más anaplásico; también es una célula de tamaño grande (10-12 micras) con núcleo similar al IB, más claro por la cromatina aún más dispersa y los nucleolos suelen estar en la periferia; excepcionalmente el contorno nuclear puede estar hendido. El citoplasma es escaso, también basófilo por la cuantía de polirribosomas, con muy escasas organelas entre las que son constantes las mitocondrias despolarizadas, siendo mínimo el RER (Figuras 14 y 15). El linfoma centroblástico recibe la denominación *monomorfo* o *polimorfo* (Figura 13) si dicha línea celular se encuentra mezclada con inmunoblastos o centrocitos en mayor o menor cuantía. En esta serie corresponden a linfomas centroblásticos polimorfos, siempre acompañados no sólo por inmunoblásticos sino también por células plasmáticas.

No se han observado signos característicos ultraestructurales nucleares en relación con los cambios neoplásicos. No obstante existen cambios nucleolares compatibles con "nuclear bodies" o segregación: separación de los componentes proteico y fibrilar. En cuanto a las imágenes de muerte celular programada o apoptosis no se han visto aumentadas y exhiben disminución del tamaño, desnaturalización de las organelas y picnosis nuclear, sin signos inflamatorios vecinos (Figura 22).

En todos los casos la arquitectura ganglionar está borrada, mostrando el linfoma un patrón difuso, a veces "pseudonodular" por infiltración medular y sinusal que sólo respeta parcialmente las trabéculas (Figura 23 c); la arquitectura general no se conserva y presenta cierto aumento de la trama reticulínica, y suele haber infiltración de la cápsula en los estadios más avanzados.

#### D. PATRONES DE TINCIÓN EN INMUNOHISTOQUÍMICA

Un 80% de los linfomas de esta serie ha sido B y un 20% T.

1.- *CD79a (clon HM57)*: Reacciona con el antígeno (dímero mb-1/B29) de membrana temprano de la estirpe B y que persiste desde el estadio pre-B al de célula plasmática en el que aparece a nivel citoplasmático. Aparece en humanos y en distintas especies de mamíferos. En patología humana marca leucemias B de células precursoras, linfomas B y algunos mielomas. En ganglio reactivo animal marca las células B del folículo, senos medulares y manguitos perivasculares. Dentro del folículo, las células del manto lo expresan con una

clara positividad en citoplasma, en forma de anillos perinucleares y/o acúmulos en RER y Golgi; el centro germinal marca los blastos B preferentemente en forma de anillo perinuclear, y el citoplasma de las células plasmáticas fuertemente teñido. En linfomas animales (perro y gato) marca del 60 al 70% de las células tumorales B, con una intensidad de tinción variable (débil-moderada-intensa), que depende de la fijación y condiciones del material. La positividad a este marcador coincide con la positividad a la cadena Lambda de las Ig, aunque el CD79a en perro es mucho más específico. En gato presenta también, en muchos casos, una reacción cruzada con proteínas nucleares, no sólo del tejido linfóide, lo que dificulta su lectura (Figura 23). De los 24 linfomas B en perro, el Ac HM57 (CD79a) ha sido positivo en 22, de los cuales 10 casos han presentado positividad muy fuerte, y 12 de ligera a moderada.

## 2.- *KAPPA LIGHT CHAINS / LAMBDA LIGHT CHAINS*: cadenas ligeras KAPPA /LAMBDA humanas.

Se utilizan para hacer diagnóstico diferencial entre infiltrados homogéneos de naturaleza B: tumoral monoclonal que sólo exprese una cadena (Kappa o Lambda), o reactivo policlonal que exprese ambas. En hombre la mayor proporción de tumores de estirpe B es Kappa+/Lambda-, a excepción de los linfomas MALT digestivos que son Lambda+/Kappa-. Nuestra experiencia en animales es la contraria: todos los linfomas B son Lambda+/Kappa-, y el único caso de linfoma intestinal es Kappa+/Lambda-. El Ac reacciona con las cadenas Kappa/Lambda libres, así como las unidas a moléculas de inmunoglobulinas. Tiñe preferentemente la Ig intracitoplasmática. Se aplica para tipificar las cadenas KAPPA/LAMBDA libres o unidas a Igs presentes, por separado, en las células linfoides B en distinto grado de maduración. En nuestros tejidos animales marca con gran intensidad en las plasmáticas sinusales, foliculares y en el manto; con menor intensidad y en acúmulos intracitoplasmáticos y/o anillo perinuclear se dispone el Ac en los blastos linfoides del folículo y manto. En los blastos tumorales dibuja un halo alrededor del núcleo, y en ocasiones forma de acúmulos de diferente tamaño en la zona del aparato de Golgi y del retículo rugoso (Figuras 24, 25 y 26). De los 24 casos de linfomas B en perro, 23/24 han mostrado positividad para la cadena Lambda, de los cuales 6 muestran positividad excesiva no valorada, y sólo 1/24 muestra una clara positividad a la cadena Kappa.

3.- *J CHAIN policlonal prediluida*: La cadena J es un componente unido a las inmunoglobulinas poliméricas y está unida por puentes disulfuro a las subunidades IgA e IgM en relación de una cadena J por polímero, independientemente del tamaño de éste. Las células positivas a este anticuerpo en ganglio reactivo son preferentemente plasmáticas sinusales, foliculares y del manto; en gato ha marcado ocasionales plasmáticas sinusales. En linfomas las plasmáticas positivas se disponen pobremente en el tejido conjuntivo y restos sinusales que quedan entre los nódulos tumorales linfoides (Figura 27). Sólo 5 casos han mostrado positividad parcial a este Ac.

\* Un ensayo con IgM e IgD específicas de perro marcó en ganglio reactivo las células plasmáticas excepcionalmente. El resultado esperado en células B inmaduras fue escaso y defectuoso, inferior incluso a las cadenas K y L, y con el inconveniente de encontrar un gran fondo base.

**4.- CD3, PAN T:** Reacciona con el receptor de membrana de células T tímicas y de tejidos linfoides periféricos. En patología humana reacciona con la mayoría de los linfomas T, a excepción de parte de los anaplásicos de alto grado. En ganglio reactivo de perro marca la zona T interfolicular; en ocasiones dicho infiltrado T coloniza el manto adyacente y dispone de forma dispersa (15%) dentro del centro germinal del folículo B. En ganglio reactivo de gato el infiltrado T sobre las zonas B (folículo y senos medulares) es más numeroso (25%) donde los folículos se disponen de forma más desordenada en la arquitectura del ganglio, no solo en la corteza. Tanto en perro como en gato, ha teñido casi el 100% de las células de los linfomas T; en los linfomas B las células T se han dispuesto "salpicadas", dispersas de forma intermitente dentro del infiltrado homogéneo B (Figuras 28 y 29). Los 6 casos de linfoma T en perro y 3 en gato presentan 100% de positividad para el Ac CD3.

**5.- S-100:** El anticuerpo reacciona con la S-100 A y B bovina, humana, de rata y canguro. El Ac se ha testado en varios tejidos incluidos en parafina y mostraron ser específicos de forma estricta a la S100; también son positivas las células de Schwann del sistema nervioso periférico, en piel los melanocitos, tumores melanocíticos y las células de Langerhans. En ganglio linfático, las células reticulares interdigitantes son positivas a este Ac. En ganglio reactivo animal marca las dendríticas foliculares y del manto con sus prolongaciones citoplasmáticas, y en menor medida las dendríticas medulares. En linfomas caninos marca células de estirpe monohistiocitaria redondas y estrelladas de forma variable: monocitos sinusales, dendríticas interfoliculares y sinusales. No sigue un patrón constante; depende de la agresividad, grado de fibrosis, cielo estrellado, etc... (Figura 30). Sólo ha sido negativo en 2 de los 30 linfomas, y el resto presentaba distintos grados de positividad de leve-moderado-alto en función del patrón que presentara en cada caso.

**6.- MAC 387 HISTIOCITARIO:** El Ac MAC 387 reacciona con el antígeno leucocitario L1 expresado en neutrófilos, monocitos, algunos macrófagos reactivos, epitelio escamoso en mucosa y epidermis reactiva. Se encuentra en citoplasma de muchas células mielomonocíticas. En tejidos humanos el Ac reacciona con el sustrato predominante de macrófagos reactivos y también se observa en histiocitosis (maligna o síndrome hemofagocítico). En ganglio reactivo de perro y gato marca histiocitos sinusales con fuerte positividad (células monocitarias redondas). En el linfoma canino y felino parece estar relegado a monocitos-histiocitos sinusales con menor positividad que el anterior (Figura 31). Ha marcado en 25 de los 30 linfomas de perro.

**7.- MIB1 (Ki-67 en parafina):** Reacciona con células proliferantes (fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M) de todos los tejidos. En el timo, la mayoría de los timocitos corticales lo expresan, mientras que los de la médula sólo ocasionalmente. En el tracto gastrointestinal reacciona con las células epiteliales mucosas en el cuello y la región basal (las células más superficiales son negativas). En el epitelio escamoso se unen preferentemente a las células basales. En el tejido linfoide: los centros germinales lo expresan en gran cantidad de sus células, siendo inferior el número en otras áreas. En ganglio reactivo animal, dentro del área B, el centro germinal parece mostrar una positividad del 60% (notablemente inferior a la descrita en humana, que es casi de un 100%), el manto de 5 a 10%, y los senos medulares un 20% en perro y un 30% en gato. El área T expresa el

Ac en un 10% de las células. En linfomas se detectan valores falsamente inferiores al Ac PC10 por el patrón de tinción heterogéneo, en nucleolo y cromatina marginada, que es captado con mayor dificultad por el analizador de imagen CAS 200 (Figura 32). Ha teñido todas las muestras, aunque en una ocasión no ha sido valorable por estar retraído el tejido.

**8.- PCNA/PC-10:** El Ac PC-10 reacciona con células proliferantes en todos los tejidos (el Ac PC-10 reacciona con el Ag de la ciclina PCNA de todas las especies de vertebrados, insectos y levaduras). En la práctica, aunque la ciclina PCNA alcanza su síntesis máxima en la fase S del ciclo celular, los niveles detectados en tejidos normales y tumorales igualan o incluso exceden a los detectados con el Ac MIB1, el que marca todas las fases del ciclo celular con excepción de la G<sub>0</sub>. De todas formas, ambos marcadores tienen una relación lineal de los valores del Ac. El patrón de tinción es homogéneo, nuclear-nucleolar, y no permite visualizar las estructuras nucleares (Figura 33). Ha presentado positividad en todos los cortes, aunque en tres casos no ha alcanzado la intensidad necesaria para el sensor del CAS 200.

## E) CINÉTICA TUMORAL: PROLIFERACIÓN Y CITOMETRÍA

Todos los resultados obtenidos en proliferación y ambas citometrías de los 30 casos se detallan en la tabla VII.

El patrón de tinción con ambos marcadores proliferativos (PC10 y MIB1) es nuclear y nucleolar, homogéneo en el caso del PC10 y marginado-irregular en el caso del MIB1, con positividad variable dependiendo del caso a considerar.

El estudio proliferativo con estos marcadores se ha realizado en un *analizador de imagen CAS-200*. Los resultados finales se han agrupado según varios criterios como:

\* **Histología:** Primera división en los distintos grupos histológicos descritos en la clasificación de Kiel (Lennert, 1990) para corroborar la similar cinética:

- Los linfomas linfoblásticos (13/30) tienen un rango de 25 a 42%, con un valor medio de 33.75% y una mediana de 34% con el marcador PC10. Con el marcador MIB1 tienen un rango de 25 a 47%, una media de 36.75% y una mediana de 38.5%.
- Los linfomas centrolásticos (5/30) tienen con el marcador PC10 un rango de 21 a 43%, una media de 32% y una mediana de 32%. Con MIB1 tienen un rango de 25 a 39%, un valor medio de 33.6% y una mediana de 35%.
- Los linfomas inmunoblásticos (10/30) muestran un rango de 19 a 42%, una media de 34.375% y una mediana de 35.5% con el Ac PC10; con el Ac MIB1 tienen una media de 38.1%, una mediana de 40% y un rango de 26 a 46%.

- Los linfomas extranodales (2/30) tienen un valor medio (y mediana) de 38% y un rango de 26 a 50% con el Ac PC10. Con el Ac MIB1 tienen una media (y mediana) de 30.5% y un rango de 17 a 44%.

**\* *Estirpe tumoral: B / T :***

- Los linfomas B (24/30) tienen un rango de 19 a 50%, una media de 34.72% y una mediana de 35% con el PC10, y un rango de 25 a 46%, media de 35.75 y mediana de 41 con el MIB1.
- Los linfomas T (6/30) tienen un rango de valores de 25 a 42%, una media de 30.4%, y una mediana de 26% con el PC10; con el MIB1 los linfomas T tienen un rango de 17 a 47%, una media de 29.8% y una mediana de 27%.

Si consideramos los 30 casos en conjunto, con el Ac PC10 tiene un valor medio de 33.92% y con el MIB1 tiene un valor medio de 36.24%.

La proliferación en el grupo de 15 casos constituido por material antiguo (Tabla VIII) tiene un intervalo de valores de 20 a 73%, media de 29.7% y mediana de 27% con el PC10; con el MIB1 tiene un rango de 26 a 72%, media de 36.46% y mediana de 33%.

En el estudio citométrico, con CME (programa quantitative DNA analysis del analizador de imagen CAS 200), de los 30 casos de linfoma estudiados, 40% eran diploides (12/30) y 53.3% aneuploides (16/30), con 2/30 no valorables (Figura 34). Con CMF (programa PARA-1 del citómetro de flujo EPICS-C) la diploidia se ha encontrado en 46.6% (14/30) de los casos y aneuploidia en 43.3% (13/30) de los casos, con 3/30 no valorables (por necrosis, manejo inadecuado del material o excesiva fijación en formol) (Figura 35).

Los ocho casos felinos control han presentado un comportamiento mucho más agresivo e inestable: la aneuploidia con CMF ha estado presente en 6/7 (un caso no ha podido valorarse por lisis de la muestra) y con CME en 6/8. La proliferación con PC10 tiene un rango de 53 a 26%, con una media de 38.8 y una mediana de 37%. Con el marcador MIB1 tiene un rango de 54 a 37%, con media de 45.4 y mediana de 47%.

## **F. ESTUDIO ESTADÍSTICO:**

Todos los datos han sido analizados con el programa de estadística SPSS para variables biológicas. Además de la estadística básica, realiza las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, para las cuales considera un nuevo grupo formado por todos aquellos animales que hayan superado en días de vida el día 1, es decir, desecha todos los animales que han sido sacrificados el mismo día del diagnóstico (Figura 36). Se considera día 1 la entrada o admisión en el centro veterinario, descartando la visión subjetiva del dueño sobre la fecha de comienzo de la sintomatología propia del linfoma, para intentar homogeneizar todos los resultados. El otro problema añadido es que todos los animales han sido sacrificados, por lo que la supervivencia se transforma en un dato relativo. Las distintas variables recogidas como edad, sexo, raza, estadio, tratamiento

(si/no),... se analizan con respecto a la posible supervivencia observada. Los casos felinos no han sido considerados en el estudio estadístico por ser sólo ocho en número.

\* La diferencia entre la supervivencia de los animales tratados frente a la de los no tratados sí fue claramente significativa ( $p=0.0002$ ), por lo que obviamente la variable **tratamiento** sí tiene valor pronóstico. La variable **tratamiento** con el protocolo COP no se analiza desde un punto de vista cualitativo, es decir, no se busca conocer ni el tipo de respuesta que pueda producir ni la fiabilidad del mismo, sólo si ha variado la supervivencia total en alguna medida con respecto al grupo de animales no tratados (**Figura 37**).

\* Al dividir el grupo total en función de valores medios de la **edad** como media y mediana (8, 9) y en función de cada tipo de edad, no se han encontrado diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los intervalos resultantes, por lo que no se puede decir que la **edad de presentación** tenga valor pronóstico en este grupo de estudio (**Figura 38**).

\* Con respecto a la variable **sexo**, las curvas de supervivencia tienen un comportamiento similar en ambos, por lo que no se ha encontrado su valor pronóstico. La proporción de presentación según el sexo es de 2:1 de machos frente a hembras, pero no tiene significación estadística como dato aislado (**Figura 39**).

\* Aunque el Pastor Alemán tiene una frecuencia muy superior al resto de razas, su curva de supervivencia es similar con respecto a la de los demás, considerados en conjunto por tener todas frecuencias muy bajas. Por no encontrar diferencias significativas, no se puede decir que la **raza** tenga valor pronóstico en este grupo de estudio.

\* No se encontró valor pronóstico en la variable **inmunofenotipo** ya que las curvas de supervivencia de los casos B y T fueron similares; en parte pudo ser debido al escaso número de casos T (6) frente a los B (24) (**Figura 40**).

\* La **afectación hepática** sí tiene valor pronóstico en este grupo de animales, ya que la supervivencia global de los casos en los que el hígado no estaba implicado es significativamente mayor ( $p=0.0009$ ) que la de los casos en los que el hígado sí estaba afecto. Por lo tanto, no se debe considerar al bazo y al hígado en el mismo estadio clínico, no sólo por la diferencia en su supervivencia, sino por la mayor importancia del hígado como órgano hematógeno (**Figura 41**).

\* El valor de la **proliferación con el marcador PC10** resultó tener valor pronóstico frente a la supervivencia global; La proliferación con el marcador PC10 dividida en dos intervalos según la mediana ( $> 34$ ;  $\leq 34$ ), mostró supervivencias significativamente diferentes ( $p=0.017$ ) (**Figura 42**). Incluso en el grupo de animales tratados con quimioterapia, la supervivencia fue significativamente superior para el intervalo PC10:  $\leq 34$  ( $p=0.016$ ) (**Figura 43**). No fue así con el marcador MIB1, donde la división por intervalo de valores según

la mediana ( $> 38$ ;  $\leq 38$ ) no dio supervivencias significativamente distintas (Figura 44).

\* No hay diferencias significativas entre los valores de la proliferación con ambos marcadores en las distintas divisiones aquí establecidas (globalmente, por grupo histológico, inmunofenotipo, tiempo de fijación...). La correlación por los métodos Pearson, Kendall y Spearman del programa SPSS es de 0.61, 0.429 y 0.61 respectivamente, con nivel de significancia de 0.01 (Figura 45). Aunque los índices con el PC10 parecen más altos considerando cada caso por separado, ambas medias permanecen homólogas. Aunque a simple vista tiene valores absolutos inferiores, el marcador MIB1 muestra un mejor patrón de tinción inmunohistoquímico, con independencia al tiempo de fijación en formol y mejor respuesta a la olla a presión como método recuperador antigénico.

\* Existe correlación estadística entre el índice de proliferación con PC10 y el índice numérico de contenido de ADN por citometría de flujo, con valores de 0.54, 0.323 y 0.426 por Pearson, Kendall y Spearman respectivamente, con nivel de significancia de 0.01 y 0.05 (Figura 46).

\* Si consideramos la ploidía como una variable cualitativa, existe una correlación precisa entre ambas técnicas citométricas en 25/27 -92.6%- (ya que tres casos de los 30 no fueron valorables). La correlación es de 0.862 por Pearson, Kendall y Spearman, con nivel de significancia de 0.01 (Figura 47). No hubo correlación entre los valores con ambas técnicas en 2/27 -7.4%-. Los dos casos de discordancia entre ambas técnicas eran de estirpe T, aunque no se puede establecer ninguna relación por el escaso número de casos (Tabla IX).

\* No existe correlación alguna entre la fase S y la proliferación, grado histológico e inmunofenotipo, por lo que se considera una variable independiente. Si se relaciona la fase S con la valoración global cualitativa de la ploidía con ambos métodos citométricos (correlación estadística de 0.6, 0.5 y 0.6 con nivel de significancia de 0.01) (Figura 48). En este estudio los altos valores de fase S se han relacionado con la aneuploidía (Fase S  $> 15\%$ ), aunque no todas las aneuploidías tienen fase S alta. Los altos valores de fase S no se han relacionados con los valores más altos de proliferación.

\* No hay correlación estadística significativa entre la ploidía y la proliferación, ni tampoco con el grupo histológico. La proliferación mantuvo un rango medio independientemente de la ploidía que presentaba cada caso; no hubo diferencias significativas entre los valores medios de proliferación de los casos diploides y aneuploides tomados por separado. La posible asociación entre diploidía con bajo índice proliferativo o aneuploidía con alto índice proliferativo no ha podido demostrarse, ya que el número total de casos estudiados es muy pequeño, y además la mediana se aproxima mucho al valor medio, lo que significa que la mayoría de los valores se sitúan alrededor de la media (son similares).

## **V.- ICONOGRAFÍA**

TABLA I

| CLASIFICACIÓN DE KIEL REVISADA (Lennert, 1989)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>LINFOMAS NO-HODGKIN DE BAJO GRADO B</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Linfoma Linfocítico               <ul style="list-style-type: none"> <li>Leucemia Linfática Crónica (LLC)</li> <li>Leucemia Prolinfocítica</li> <li>Leucemia de células Peludas</li> </ul> </li> <li>* Linfoma Linfoplasmacítico (inmunocitoma)</li> <li>* Plasmocitoma</li> <li>* Linfoma Centrocítico (CC) *</li> <li>* Linfoma Centroblástico-Centrocítico (CB-CC)</li> <li>Nodular o Difuso</li> </ul> | <b>LINFOMAS NO HODGKIN DE BAJO GRADO T</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Linfoma linfocítico               <ul style="list-style-type: none"> <li>Leucemia linfática crónica</li> <li>Leucemia prolinfocítica</li> </ul> </li> <li>* Linfoma de célula pequeña cerebriforme               <ul style="list-style-type: none"> <li>Micosis fungoide, síndrome de Sézary</li> </ul> </li> <li>* Linfoma linfocitocítico (linfoma de Lennert)</li> <li>* Linfoma Angioinmunoblástico</li> <li>* Linfoma de la zona T</li> </ul> |
| <b>LINFOMAS NO-HODGKIN DE ALTO GRADO B</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Linfoma Centroblástico</li> <li>* Linfoma Immunoblástico</li> <li>* Linfoma Anaplásico de Células Grandes (Ki-1+)</li> <li>* Linfoma Linfoblástico</li> <li>* Linfoma de Burkitt</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                | <b>LINFOMAS NO HODGKIN DE ALTO GRADO T</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Linfoma pleomorfo de célula mediana y grande (HTLV-1 +/-)</li> <li>* Linfoma Immunoblástico (HTLV-1 +/-)</li> <li>* Linfoma Anaplásico de célula grande (Ki-1+)</li> <li>* Linfoma Linfoblástico</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                        |

\* Considerado hoy semejante al Linfoma de Células del Manto (Weisenburger DD et al, 1981)

TABLA II

| CLASIFICACIÓN DE LA WORKING FORMULATION                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>LINFOMAS DE BAJO GRADO:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Linfocítico de célula pequeña</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Con LLC</li> <li>. Plasmocitocitoide</li> </ul> </li> <li>2. <i>Folicular</i>, con predominio de células pequeñas hendidas               <ul style="list-style-type: none"> <li>. Áreas difusas</li> <li>. Esclerosis</li> </ul> </li> <li>3. <i>Folicular</i> de célula pequeña hendida y célula grande               <ul style="list-style-type: none"> <li>. Áreas difusas</li> <li>. Esclerosis</li> </ul> </li> </ol>                                                                                                                                         |
| <b>LINFOMAS DE GRADO INTERMEDIO</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Folicular</i> con predominio de células grandes               <ul style="list-style-type: none"> <li>. Áreas difusas</li> <li>. esclerosis</li> </ul> </li> <li>2. <i>Difuso</i> con células pequeñas hendidas               <ul style="list-style-type: none"> <li>. Esclerosis</li> </ul> </li> <li>3. <i>Difuso</i>, mixto con células pequeñas y grandes               <ul style="list-style-type: none"> <li>. Esclerosis</li> <li>. Células epitelioideas</li> </ul> </li> <li>4. <i>Difuso de células grandes</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>. Células hendidas</li> <li>. Células no hendidas</li> </ul> </li> </ol> |
| <b>LINFOMAS DE ALTO GRADO</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Immunoblástico de célula grande               <ul style="list-style-type: none"> <li>. Plasmocitocitoide</li> <li>. De células claras</li> <li>. Polimorfo</li> <li>. Con células epitelioideas)</li> </ul> </li> <li>2. Linfoblástico               <ul style="list-style-type: none"> <li>. Convuluto</li> <li>. No convuluto)</li> </ul> </li> <li>3. De célula pequeña no hendida               <ul style="list-style-type: none"> <li>. Tipo Burkitt</li> <li>. Con áreas foliculares)</li> </ul> </li> </ol>                                                                                                                                |
| <b>MISCELÁNEOS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Micosis Fungoides</li> <li>Histiocítico</li> <li>Plasmocitoma Extramedular</li> <li>Inclasificables</li> <li>Otros</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

TABLA III

| CLASIFICACIÓN DE LNH (REAL, 1994 - OMS, 1997)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. Linfomas B</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>II. Linfomas T</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1. Leucemia/Linfoma Linfoblástico B precursor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1. Linfoma / leucemia Linfoblástica de célula T precursora                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 2. Tumores de células B periféricas:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 2. Tumores de células T periféricas y células NK:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia Linfocítica Crónica B /Linfoma de linfocitos pequeños B</li> <li>• Leucemia Prolinfocítica</li> <li>• Linfoma Linfoplasmocitoide</li> <li>• Linfoma del Manto Folicular</li> <li>• Linfoma Centro Folicular</li> <li>• Linfoma B de la zona marginal: Extranodal (MALT de bajo grado B) / Nodal / Esplénica</li> <li>• Leucemia de Células Peludas</li> <li>• Linfoma B de Células grandes</li> <li>• Linfoma B primario de mediastino</li> <li>• Linfoma Burkitt</li> <li>• Linfoma B de alto grado, Burkitt-like</li> <li>• Linfoma de células grandes anaplásico, T o Nulos.</li> </ul> | <p><i>2a. Formas predominantemente leucémicas/diseminadas:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia prolinfocítica T (célula pequeña o cerebriforme)</li> <li>• Leucemia linfocítica granular</li> <li>• Leucemia agresiva NK</li> <li>• Síndrome de Sézary</li> <li>• Linfoma/leucemia de células T del adulto (HTLV1+)</li> <li>• Linfoma T hepatoesplénica <i>gamma/delta</i></li> </ul> <p><i>2b. Formas predominantemente ganglionares</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfoma T angioinmunoblástico</li> <li>• Linfoma de células T periféricas no específico (Linfoepiteliode/de zona T/pleomorfo/Inmunoblástico)</li> <li>• Linfoma anaplásico de célula grande (LACG)(T y null)</li> </ul> <p><i>2c. Formas predominantemente extranodales</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfoma nasal y tipo nasal de células NK</li> <li>• Micosis fungoide (Reticulosis pagetoide/mucinoso folicular asociada/enf. cutánea laxa granulomatosa)</li> <li>• Enf. Linfoproliferativas cutáneas primarias CD30+ (Papulosis linfomatoide A y B/LACG cutáneo primario/lesiones "border-line")</li> <li>• Linfoma T subcutáneo tipo paniculítico</li> <li>• Linfoma intestinal de células T (+/- enteropatía)</li> </ul> |
| 3. Enfermedades inmunosecretoras (variantes clínicas o morfológicas)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mieloma</li> <li>• Plasmocitoma</li> <li>• Gammapatía monoclonal</li> <li>• Macroglobulinemia de Waldenstrom (Inmunocitoma)</li> <li>• Enfermedad de las cadenas pesadas</li> <li>• Enfermedad de depósito de Igs</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

TABLA IV

| MATERIAL UTILIZADO |               |             |                |
|--------------------|---------------|-------------|----------------|
| Nº BIOPSIA FJD     | NECROPSIA UCM | PAT. MÉDICA | M. ELECTRÓNICA |
| 1. 87A55           | C.P.          | C.P.        | 87E113         |
| 2. 87A61           | C.P.          | C.P.        | 87E106         |
| 3. 95A48           | N253/95       | 3923/94     | 95E12          |
| 4. 95A49           | C.P.          | C.P.        | 95E13          |
| 5. 95A70           | N325/95       | C.P.        | ----           |
| 6. 95A86           | N344/95       | 1613/94     | 95E20          |
| 7. 95A197          | N473/95       | 5950/95     | 95E40          |
| 8. 95A238          | C.P.          | C.P.        | 95E48          |
| 9. 95A248          | BIOPSIA       | BIOPSIA     | 95E66          |
| 10. 95A264         | N107/96       | 5806/95     | 95E74          |
| 11. 95A266         | N126/96       | 6689/95     | 95E79          |
| 12. 96A6           | N249/96       | 943/94      | 96E4           |
| 13. 96A7           | N253/96       | 7556/96     | 96E6           |
| 14. 96A23          | N262/96       | 7552/96     | 96E8           |
| 15. 96A28          | BIOPSIA       | BIOPSIA     | -----          |
| 16. 96A30          | N326/96       | 7917/96     | 96E46          |
| 17. 96A32          | N339/96       | 7175/95     | 96E48          |
| 18. 96A50          | N455/96       | 8604/96     | 96E29          |
| 19. 96A51          | N457/96       | 8090/96     | 96E31          |
| 20. 96A52          | N469/96       | 8032/96     | 96E37          |
| 21. 96A53          | N445/96       | 8524/96     | 96E49          |
| 22. 96A105         | N576/96       | 7883/96     | 96E54          |
| 23. 96A108         | N614/96       | 9592/96     | 96E            |
| 24. 96A109         | N650/96       | 9746/96     | 96E66          |
| 25. 97A6           | N54/97        | 10150/97    | 97E12          |
| 26. 97A11          | N138/97       | 10673/97    | 97E31          |
| 27. 97A12          | N154/97       | 10755/97    | 97E34          |
| 28. 97A13          | N150/97       | 10745/97    | -----          |
| 29. 97A45          | N268/97       | 10444/97    | -----          |
| 30. 96A48          | BIOPSIA       | BIOPSIA     | -----          |

**Nº Biopsia F.J.D.:** Número de protocolo dado en el Dpto. de Anatomía Patológica de la Fundación Jimenez Díaz. **Necropsia UCM:** Número de necropsia asignado en el Dpto. de Anatomía Patológica de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de la UCM. **Pat. Médica:** Número de protocolo asignado en el Dpto. de Patología Médica de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de la UCM. **M. Electrónica:** Número de protocolo de Microscopía Electrónica dado en el Dpto. de Anatomía Patológica de la Fundación Jimenez Díaz. **CP:** Procedencia de Centro Privado, directamente a la Fundación Jimenez Díaz. **Biopsia:** Caso sin necropsia seriada. (-----) carece de estudio de M.Electrónica.

TABLA V

| ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE LINFOMAS ANIMALES |      |       |          |         |                             |
|-----------------------------------------------------------|------|-------|----------|---------|-----------------------------|
| Ac                                                        | Tipo | CD    | Dilución | Fuente  | Especificidad               |
| Pan T                                                     | Po   | CD3   | 1/50     | DAKO    | Linfocitos T                |
| HM57                                                      | Mo   | CD79a | 1/50     | DAKO*   | Linfocitos B                |
| S-100                                                     | Po   | -     | 1/100    | DAKO    | Histiocitos                 |
| MAC387                                                    | Mo   | -     | 1/100    | DAKO    | Histiocitos                 |
| KAPPA                                                     | Po   | -     | 1/400    | DAKO    | células B                   |
| LAMBDA                                                    | Po   | -     | 1/400    | DAKO    | células B                   |
| J-Chain                                                   | Po   | -     | Predilut | BIOMEDA | células B                   |
| MIB1                                                      | Mo   | -     | 1/50     | DAKO    | núcleos en G <sub>1</sub> , |
| PC10                                                      | Mo   | -     | 1/50     | DAKO    | núcleos en G <sub>1</sub> , |

\* Cortesía del Dr. David Mason.

TABLA VI

| VALORACIÓN DEL CICLO CELULAR |                          |                                  |
|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| DIPLOIDE                     | ANEUPLOIDE               |                                  |
|                              | DIPLOIDE-FASE S ALTA     | ANEUPLOIDE                       |
| GRÁFICA SIMÉTRICA            | CICLO DIPLOIDE           | GRÁFICA ASIMÉTRICA               |
| Y                            | Y                        | Y / Ó                            |
| $0.8 < \text{DNA.I} > 1.2$   | FASE S ALTA<br>(S > 15%) | DNA < 0.8: HpD<br>DNA > 1.2: HrD |

(HpD:Hipodiploide; HrD:Hiperdiploide)

TABLA VII

| PLOIDÍA Y PROLIFERACIÓN |      |        |         |      |         |               |      |
|-------------------------|------|--------|---------|------|---------|---------------|------|
| Nº DE AP                | CMF  |        |         | CME  |         | PROLIFERACIÓN |      |
|                         | LADN | FASE S | PLOIDÍA | LADN | PLOIDÍA | PC10          | MIB1 |
| 1.87A55                 | 0.69 | 28.2   | A       | 0.99 | A       | 43            | 39   |
| 2.87A61                 | N.V. | N.V.   | N.V.    | 0.5  | N.V.    | N.V.          | 44   |
| 3.95A48                 | 1.55 | 11.1   | A       | 0.51 | A       | 42            | 44   |
| 4.95A49                 | 1.11 | 11.9   | D       | 1    | D       | 36            | 39   |
| 5.95A70                 | 0.95 | 15.8   | D       | 0.8  | D       | 26            | 27   |
| 6.95A86                 | 0.95 | 13.6   | D       | 0.91 | D       | 31            | 43   |
| 7.95A197                | 0.98 | 8      | D       | 0.90 | D       | 29            | 26   |
| 8.95A238                | 0.97 | 12.3   | D       | 1.09 | D       | 35            | 38   |
| 9.95A248                | 0.71 | 17.3   | A       | 1.02 | A       | 21            | 25   |
| 10.95A264               | 1.2  | 10.4   | A       | 1.21 | A       | 34            | 25   |
| 11.95A266               | 1.3  | 16.3   | A       | 0.96 | A       | 32            | 29   |
| 12.96A6                 | 1.19 | 20.1   | A       | 1.03 | A       | 35            | 46   |
| 13.96A7                 | 1.28 | 18.8   | A       | 1.35 | A       | 42            | 37   |
| 14.96A23                | 1.29 | 10.7   | A       | 1.38 | A       | 38            | 32   |
| 15.96A28                | 1.03 | 7.5    | D       | 0.94 | D       | 40            | 41   |
| 16.96A30                | 0.99 | 20.4   | A       | 0.88 | A       | 25            | 32   |
| 17.96A32                | N.V. | N.V.   | N.V.    | N.V. | N.V.    | 25            | 16   |
| 18.96A50                | 0.96 | 7.2    | D       | 0.85 | D       | 26            | 17   |
| 19.96A51                | 1.01 | 2.4    | D       | 0.92 | D       | 16            | 27   |
| 20.96A52                | 1.05 | 6.9    | D       | 0.84 | D       | 19            | 34   |
| 21.96A53                | 1.02 | 13     | D       | 0.81 | D       | 39            | 45   |
| 22.96A105               | 1.2  | 33.9   | A       | 0.53 | A       | 34            | 46   |
| 23.96A108               | 1.87 | 0      | A       | 1.21 | A       | 50            | 44   |
| 24.96A109               | 1.13 | 13.2   | D       | 2.29 | A       | 42            | 47   |
| 25.97A6                 | 1.09 | 11     | D       | 0.85 | A       | 33            | 31   |
| 26.97A11                | 0.97 | 7.3    | D       | 0.98 | D       | 39            | 35   |
| 27.97A12                | 0.94 | 10.8   | D       | 1.09 | D       | 33            | 41   |
| 28.97A13                | 0.96 | 6      | D       | 1.04 | D       | 35            | 39   |
| 29.97A45                | 0.97 | 16.6   | D*      | 1.09 | D*      | 32            | 37   |
| 30.96A48                | N.V. | N.V.   | N.V.    | N.V. | N.V.    | N.V.          | 41   |

**CMF:** Citometría de Flujo. **CME:** Citometría Estática. **Proliferación:** Índice Proliferativo en el Analizador de Imagen CAS-200 con los marcadores MIB1 y PC10. **Ploidía:** Valoración cualitativa de los índices de ADN en ambos métodos citométricos.

TABLA VIII

| PROLIFERACIÓN EN MATERIAL RETROSPECTIVO |      |      |
|-----------------------------------------|------|------|
| Nº BIOPSIA                              | MIB1 | PC10 |
| 1.- 94A197                              | 31   | 21   |
| 2.- 94A199                              | 43   | 32   |
| 3.- 94A200                              | 26   | 21   |
| 4.- 94A204                              | 26   | 20   |
| 5.- 94A209                              | 40   | 48   |
| 6.- 94A224                              | 36   | 25   |
| 7.- 94A226                              | 31   | 20   |
| 8.- 94A231                              | 38   | 28   |
| 9.- 94A232                              | 33   | 27   |
| 10.- 94A234                             | 30   | 30   |
| 11.- 94A239                             | 72   | 73   |
| 12.- 94A240                             | 42   | 22   |
| 13.- 94A244                             | 31   | 24   |
| 14.- 94A260                             | 29   | 28   |
| 15.- 94A261                             | 39   | 27   |

TABLA IX

| LA CITOMETRÍA ESTÁTICA FRENTE A LA CITOMETRÍA DE FLUJO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VENTAJAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | INCONVENIENTES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>* Método muy simple.</li> <li>* Se requiere muy poca cantidad de material.</li> <li>* Posibilidad de utilizar material parafinado.</li> <li>* la parafina no interfiere con el manejo del equipo.</li> <li>* Elige las células que van a ser analizadas directamente.</li> <li>* Puede clasificar las células en función de su forma, tamaño,...etc.</li> <li>* Capacidad para eliminar directamente núcleos rotos, debris, dobletes, elementos inflamatorios,... etc.</li> <li>* Posibilidad de identificar poblaciones pequeñas aneuploides enmascaradas por una diploide mayoritaria.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>* Problemas en manejo: los cambios en la intensidad de tinción puede dar falsos resultados</li> <li>* La objetividad puede disminuir al elegir las células; es preciso medir los suficientes campos para evitar el sesgo.</li> <li>* Al ser una curva continua de menor resolución, es difícil identificar las distintas fases del ciclo celular <math>G_0G_1</math>, S y <math>G_2+M</math>.</li> <li>* Los coeficientes de variación son mayores con material parafinado, por lo que se desestiman en el caso de la citometría estática.</li> <li>* El número total de células necesarias para el análisis del ADN es mucho menor, lo que supone un ahorro de tiempo y de material, aunque podría disminuir su eficacia (CME:300 células aproximadamente; CMF:50000).</li> </ul> |

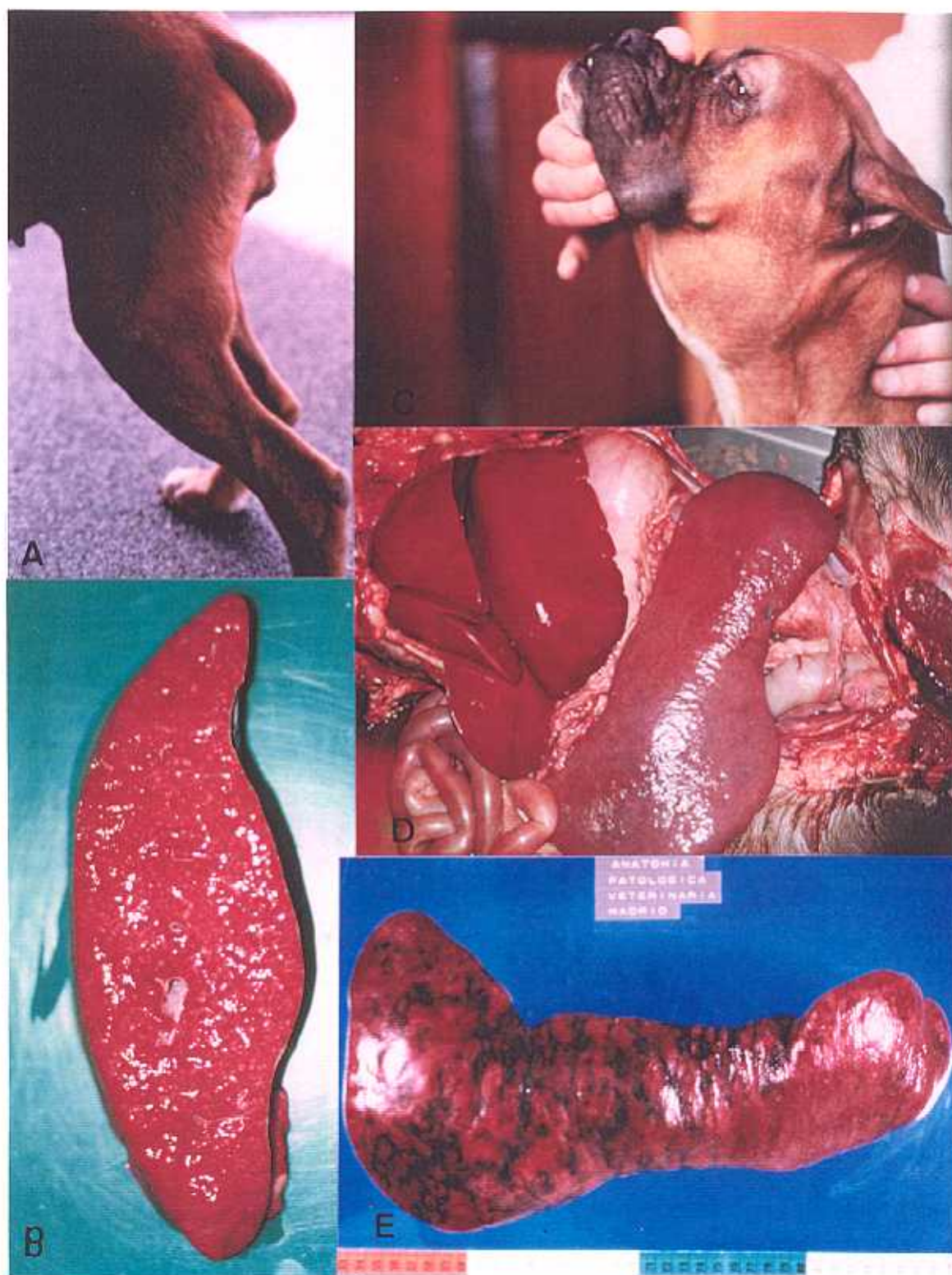


Figura 1: Macroscopía de distintos órganos. A-C: Adenomegalias de ganglios periféricos popliteo y submandibular. B: Macroscopía hepática con infiltración periportal y perivascular. D-E: Bazo; esplenomegalia masiva. Bazo de linfoma con zonas hemorrágicas subcapsulares.

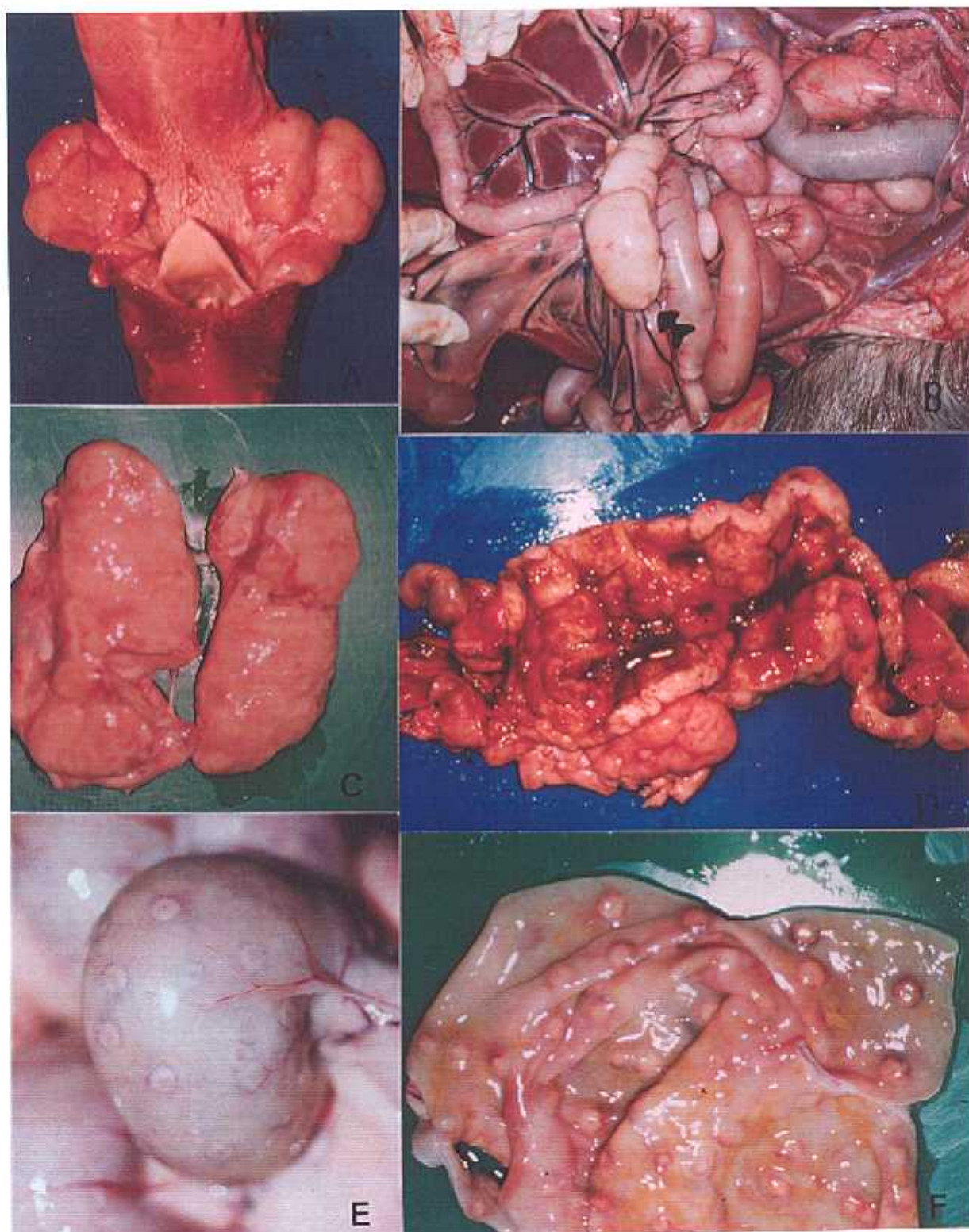


Figura 2: Macroscopía de distintos órganos. **A:** Tumoración amigdalar bilateral. **B:** Adenomegalias tumorales mesentéricas. **C:** Adenomegalia con desestructuración homogénea tumoral. **E-F:** Tumoración inicial en placas de Peyer. Engrosamiento parietal homogéneo difuso de íleon distal y colon.



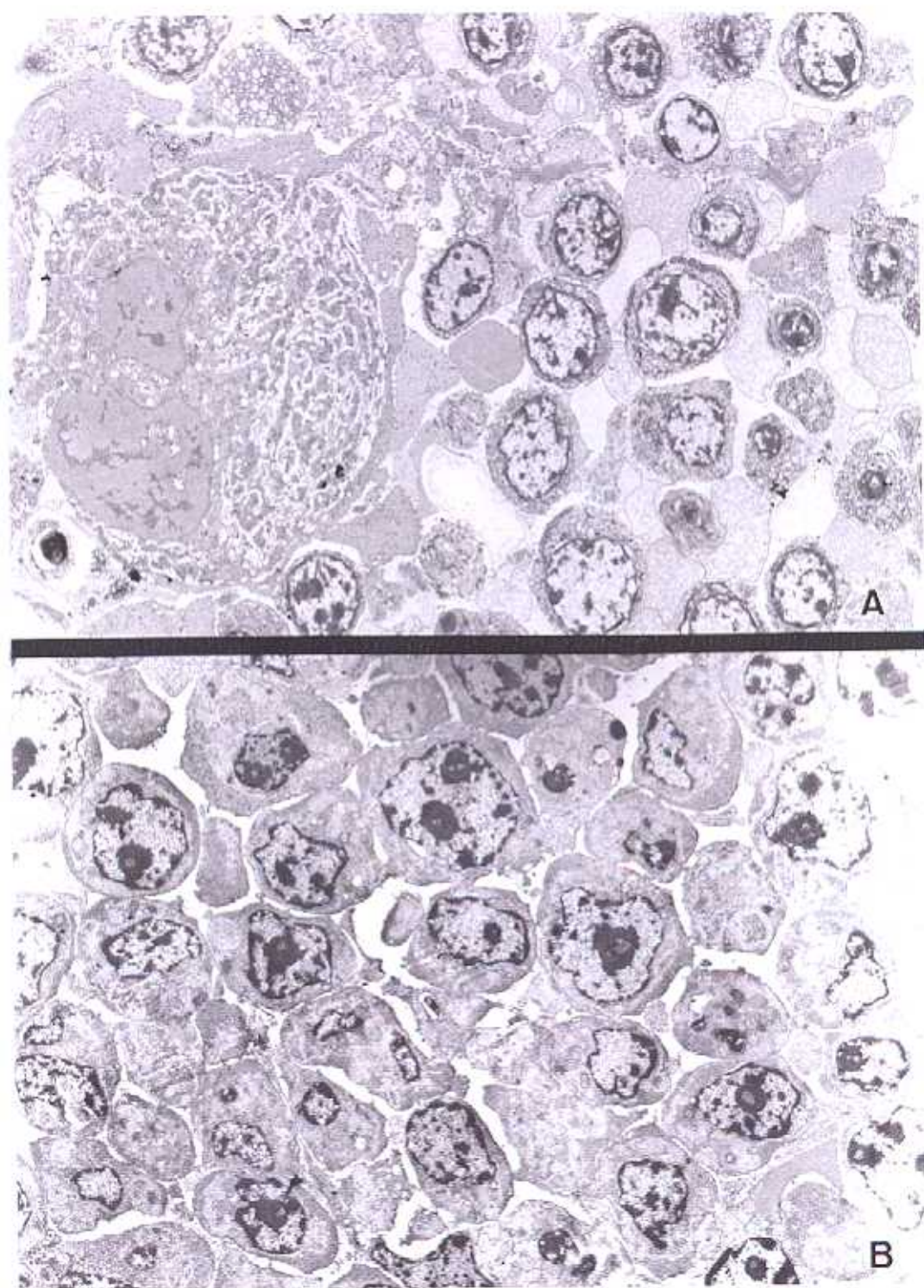


Figura 4: Linfoma linfoblástico B. ME. A) panorámica de médula ósea con megacariocito degenerado y blastos intermedios de cromatina irregular con nucleolos hiperplásicos 96E49 (96A53) x 2.500. B) detalle de celularidad con mayor atipia nuclear 97E34 (97A12) x 2.500.

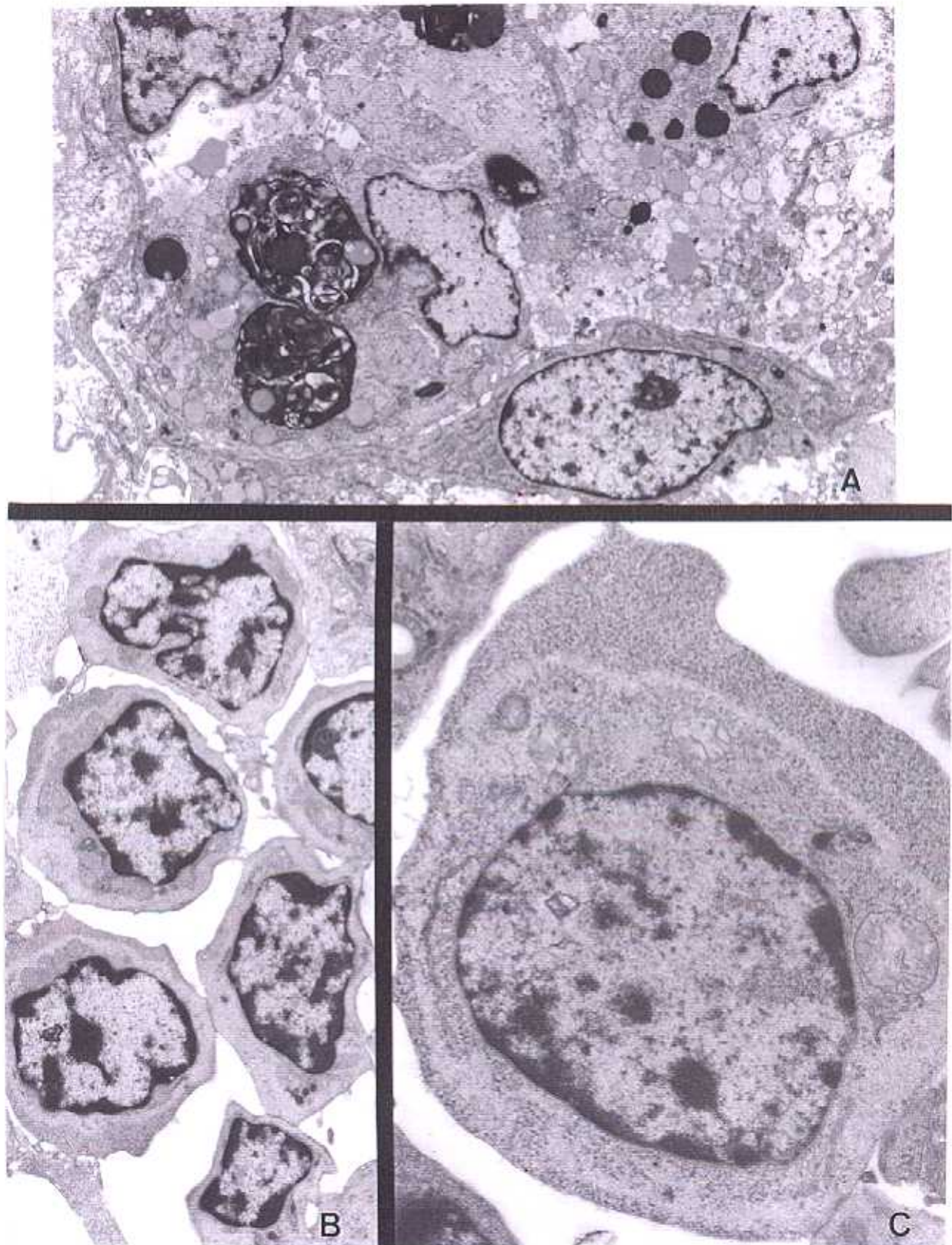


Figura 5: Linfoma linfoblástico B; ME: 87E113 (87A55). A) fagocito con lisosomas secundarios y restos apoptóticos: x 8.000. B y C) detalle celular con halo citoplásmico periférico ribosómico ; escasez de orgánulos x 5.000 y x 10.000.

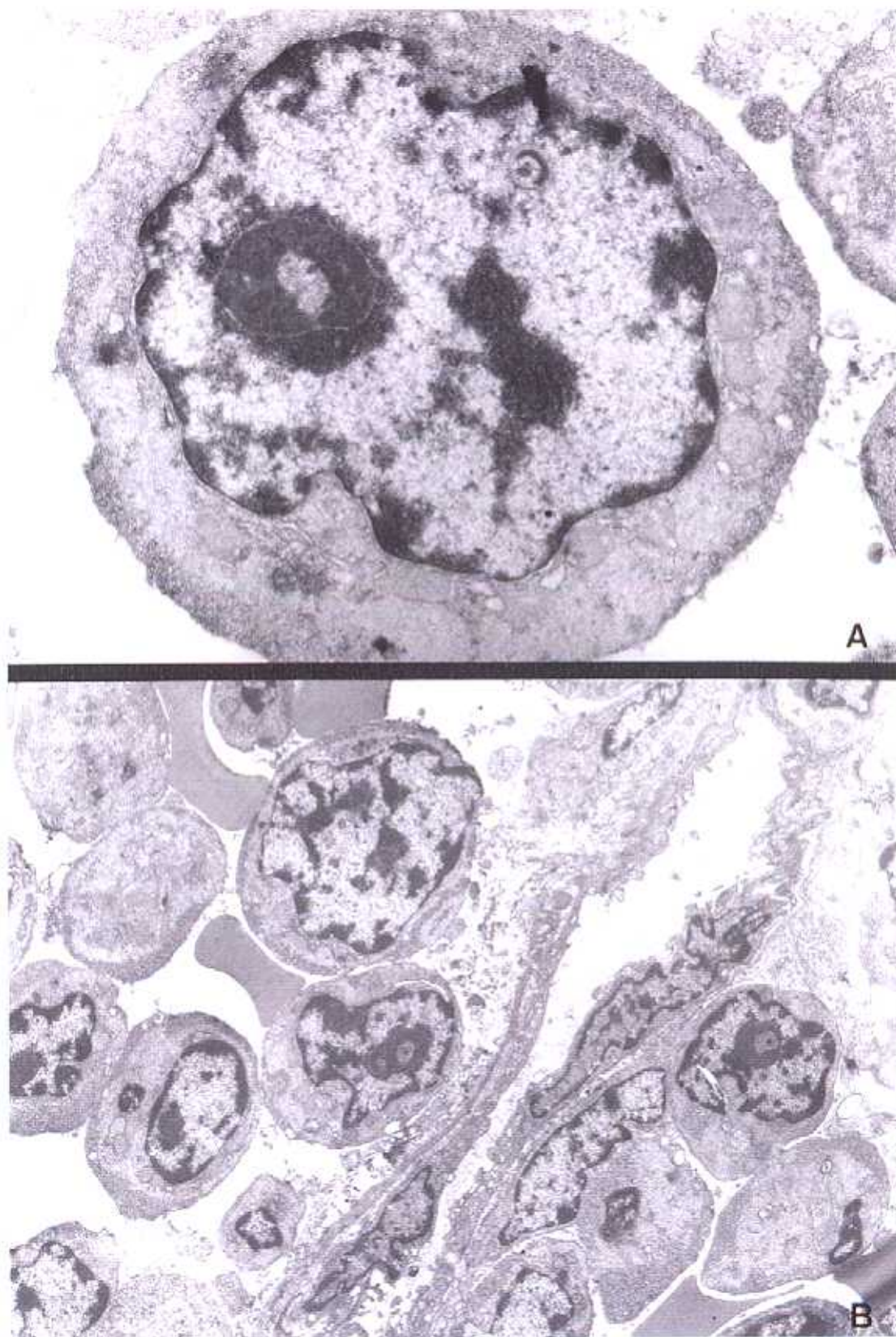


Figura 6: Linfoma linfoblástico B; ME: 97E34 (97A12). A) célula tumoral con núcleo de cromatina marginada con hiperplasia nucleolar de la pars fibrosa y despolarización mitocondrial. B) linfoblastos rodeando un capilar de endotelio hiperplásico x 12.500 y x 4.500.

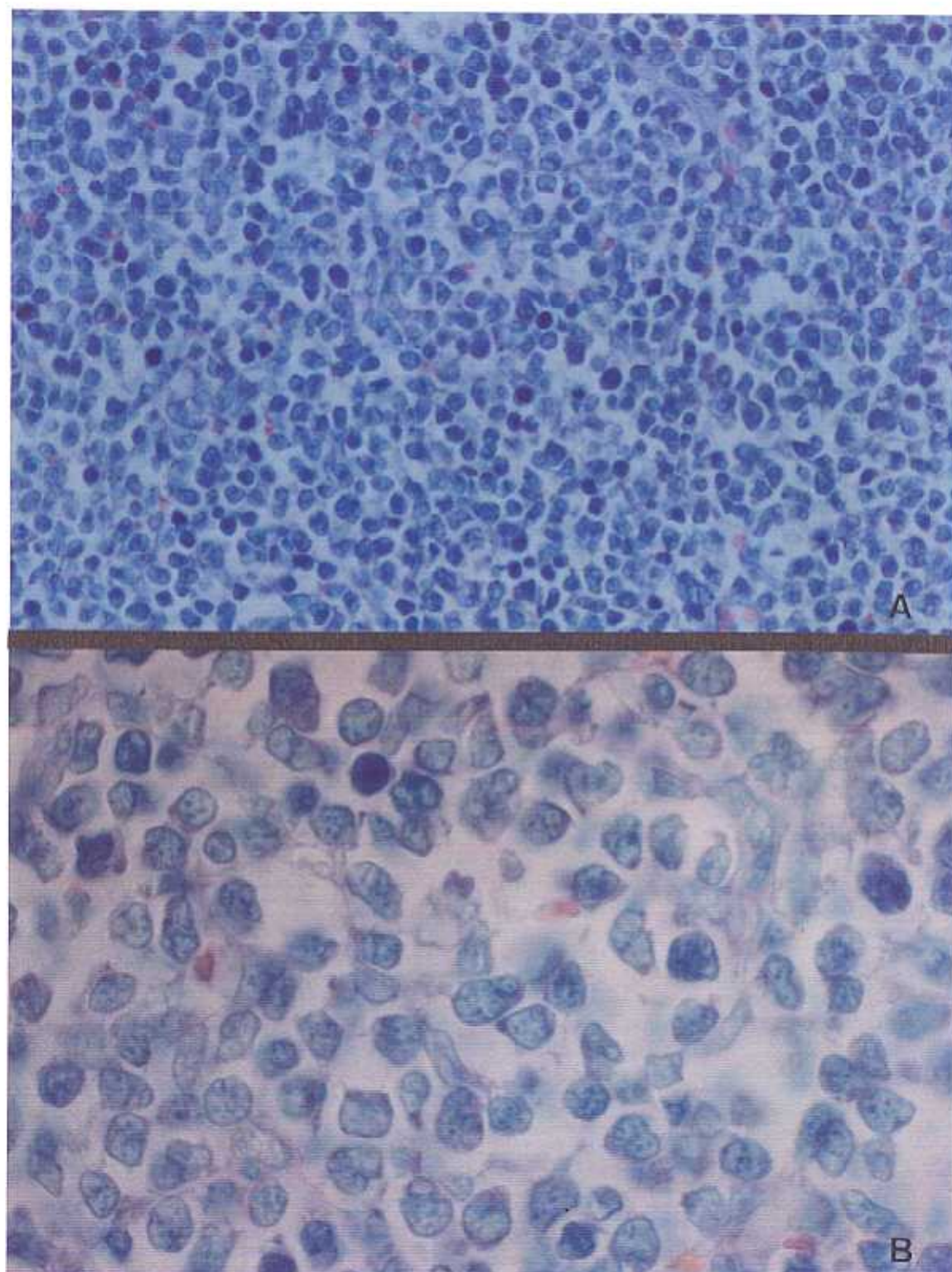


Figura 7: Linfoma linfoblástico T; MO: 96A109; panorámica y detalle celular óptico que muestra la irregularidad nuclear y el escaso citoplasma. Giemsa. A x20; B x100.

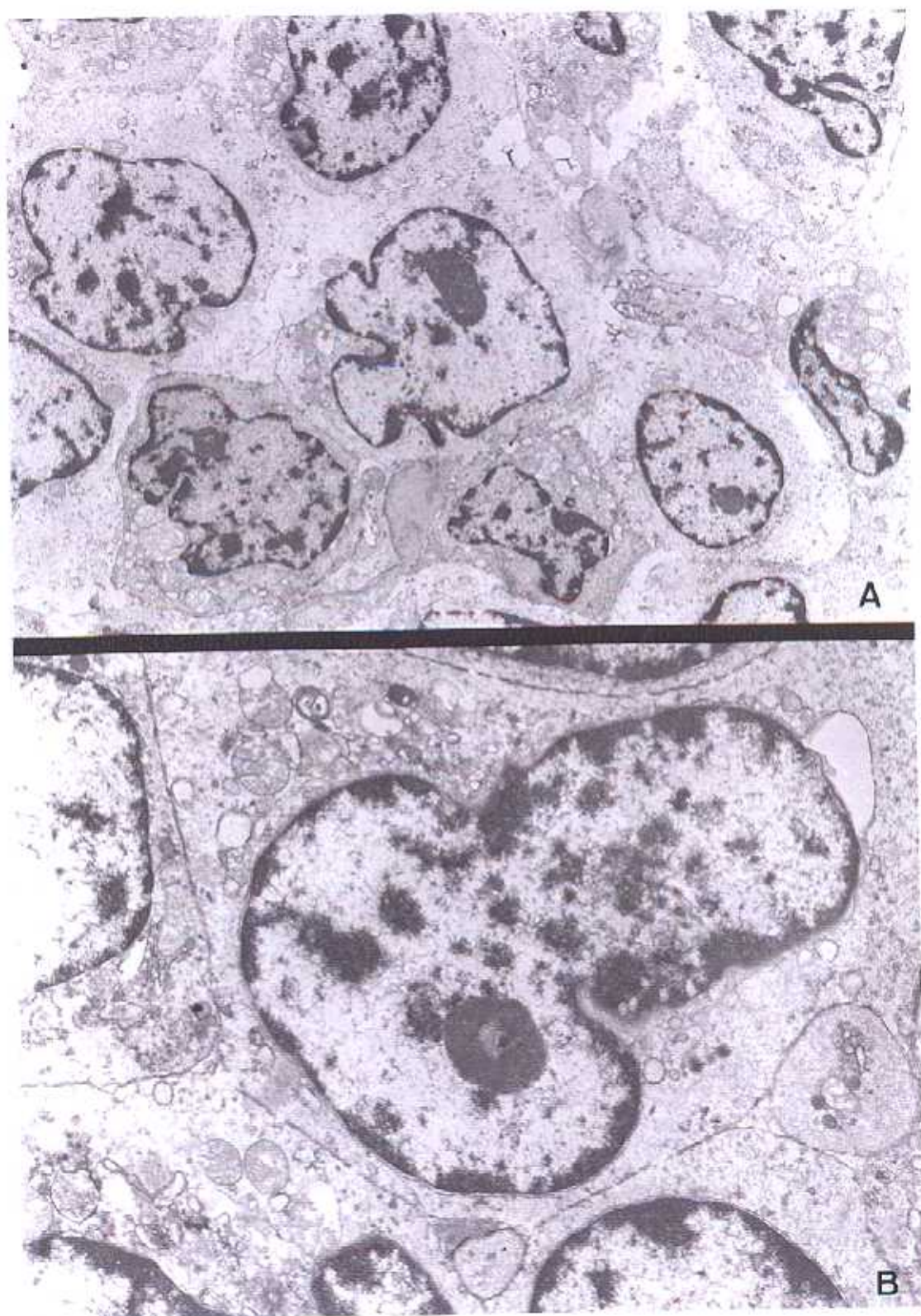


Figura 8: Linfoma Linfoblástico T timocítico: ME 97E66 (96A109). A) Panorámica x 4.125. B) Núcleo de contorno convoluto con acúmulos irregulares de la cromatina, Golgi hiperplásico, escasos lisosomas polares x 12.500.

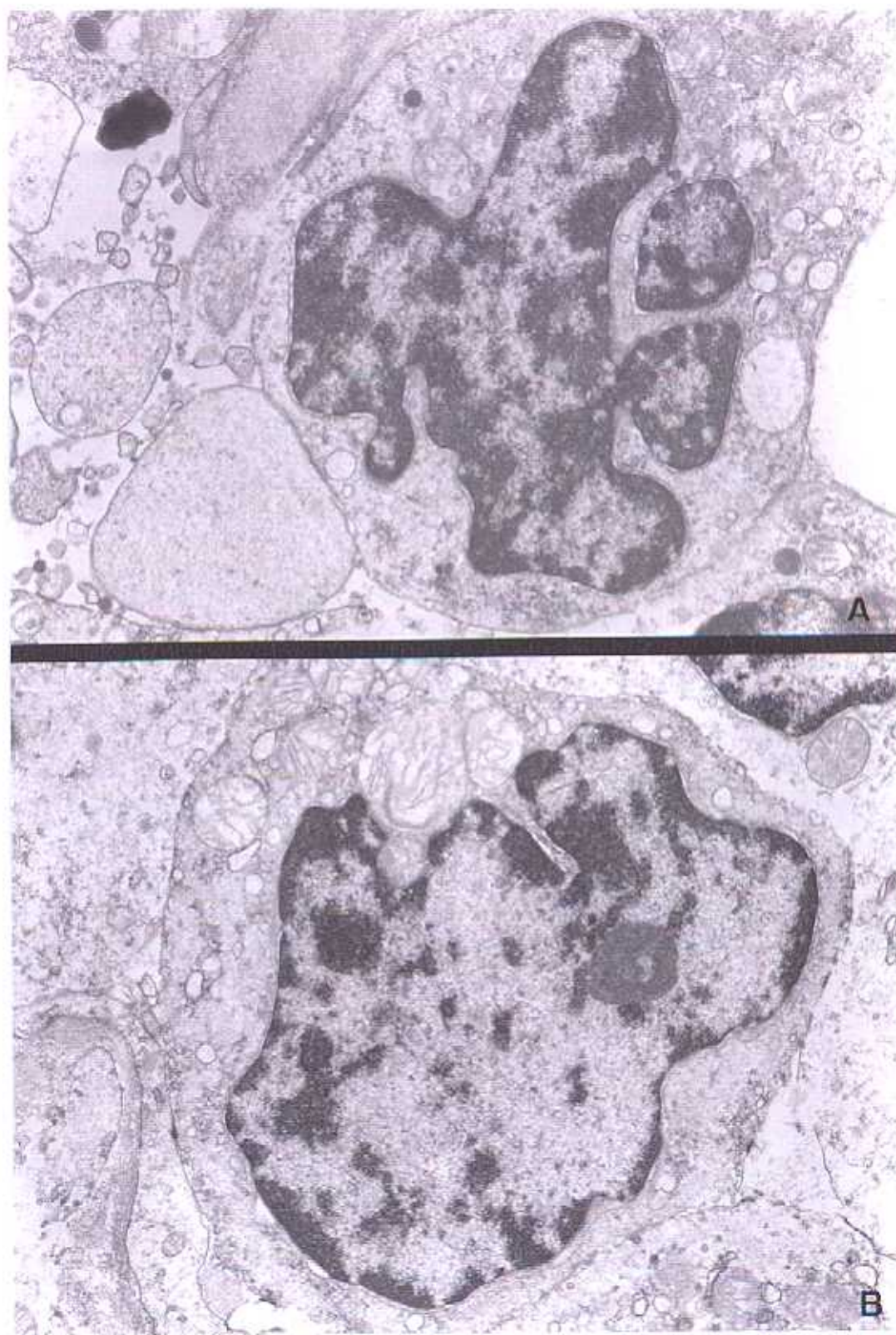


Figura 9: Linfoma linfoblástico T, ME 96E66 (96A109). A y B) detalle celular x 12.500.

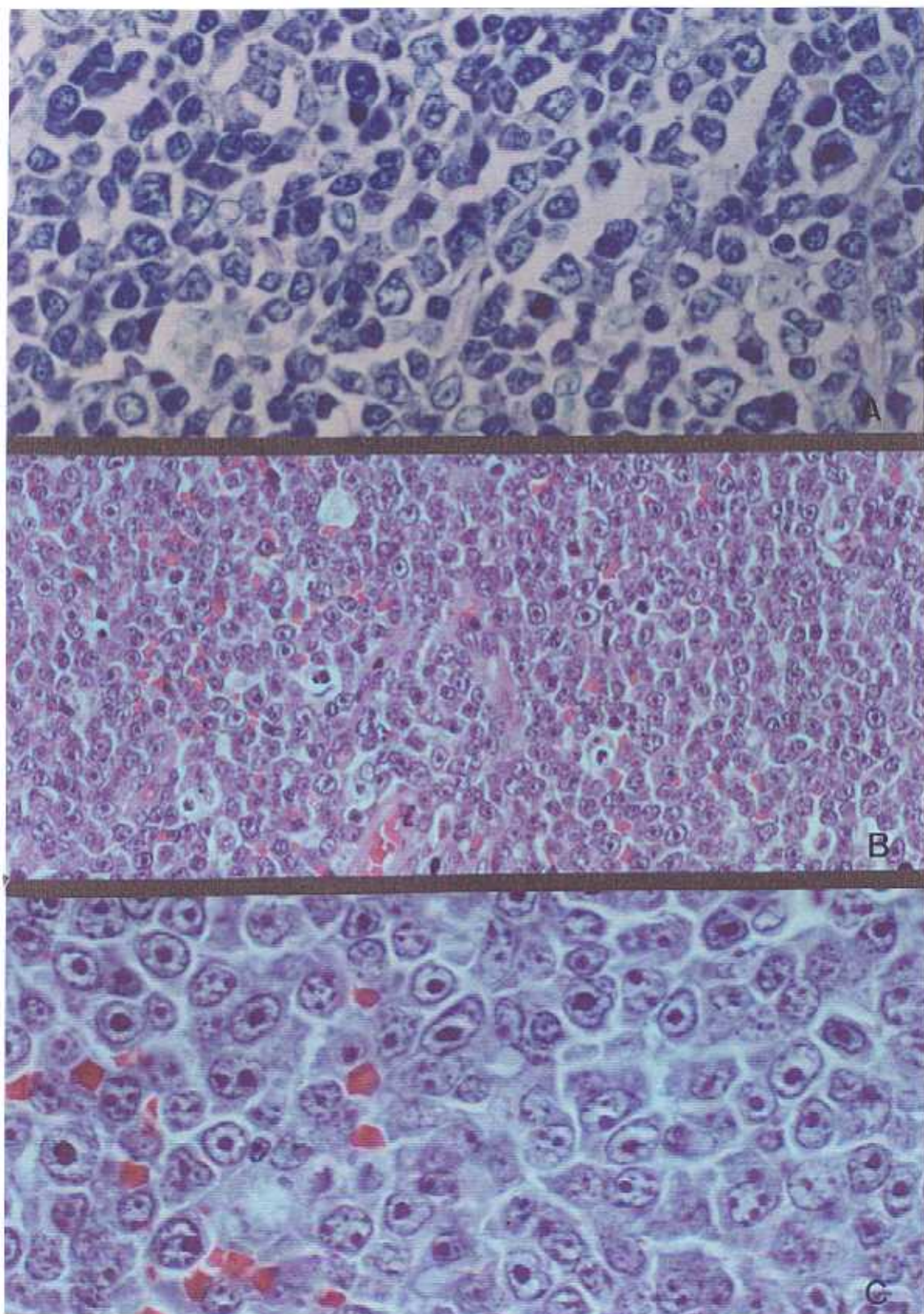


Figura 10: Linfoma inmunoblástico (IB) B: M.O. A: polimorfo; 95A197; Giemsa x 60. B y C: monomorfo 96A48: HE x 20 y 100.

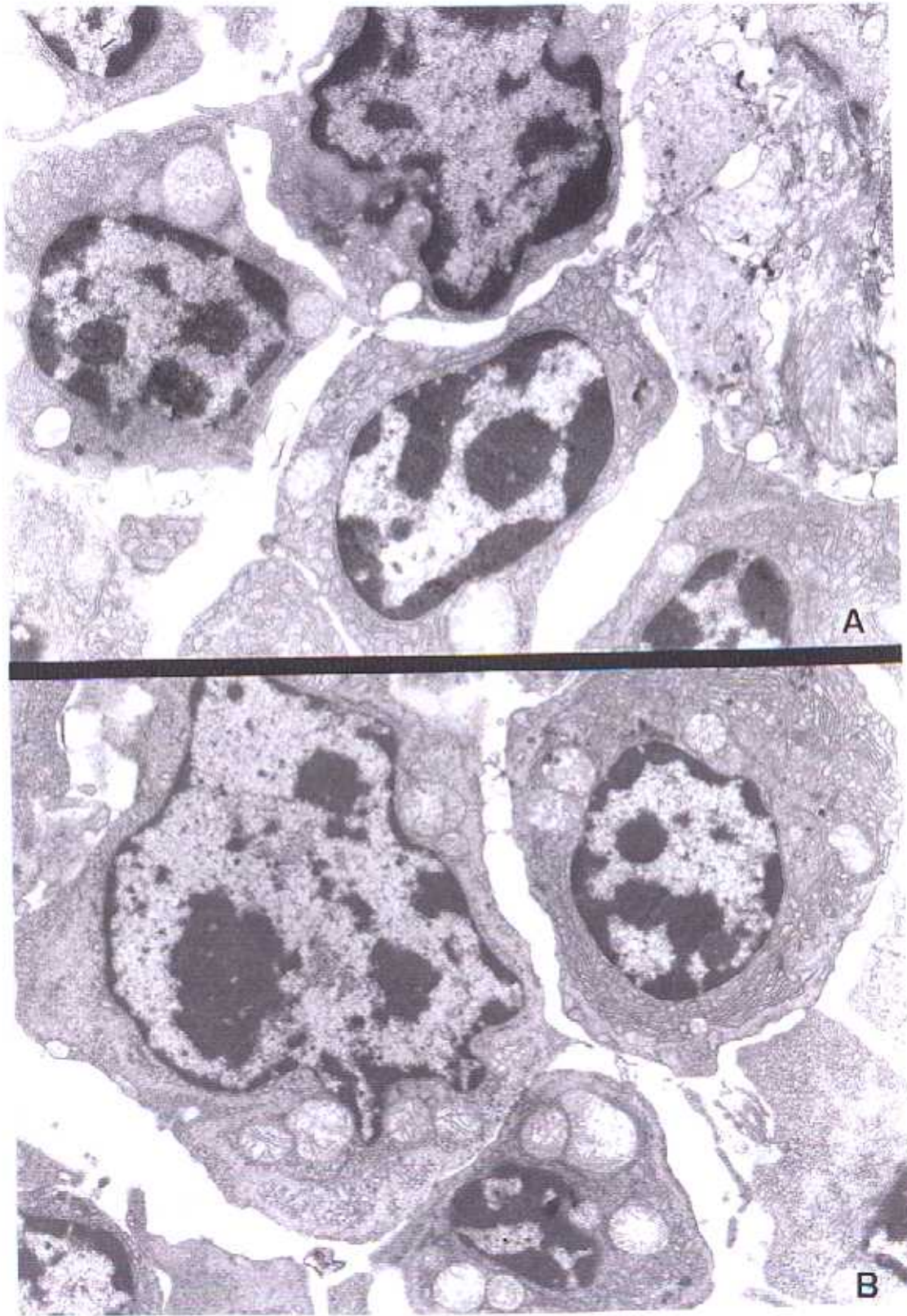


Figura 11: Linfoma IB B polimorfo; ME 95E40 (95A197). A y B) blastos irregulares y plasmáticas con desarrollo del RER x 10.000.

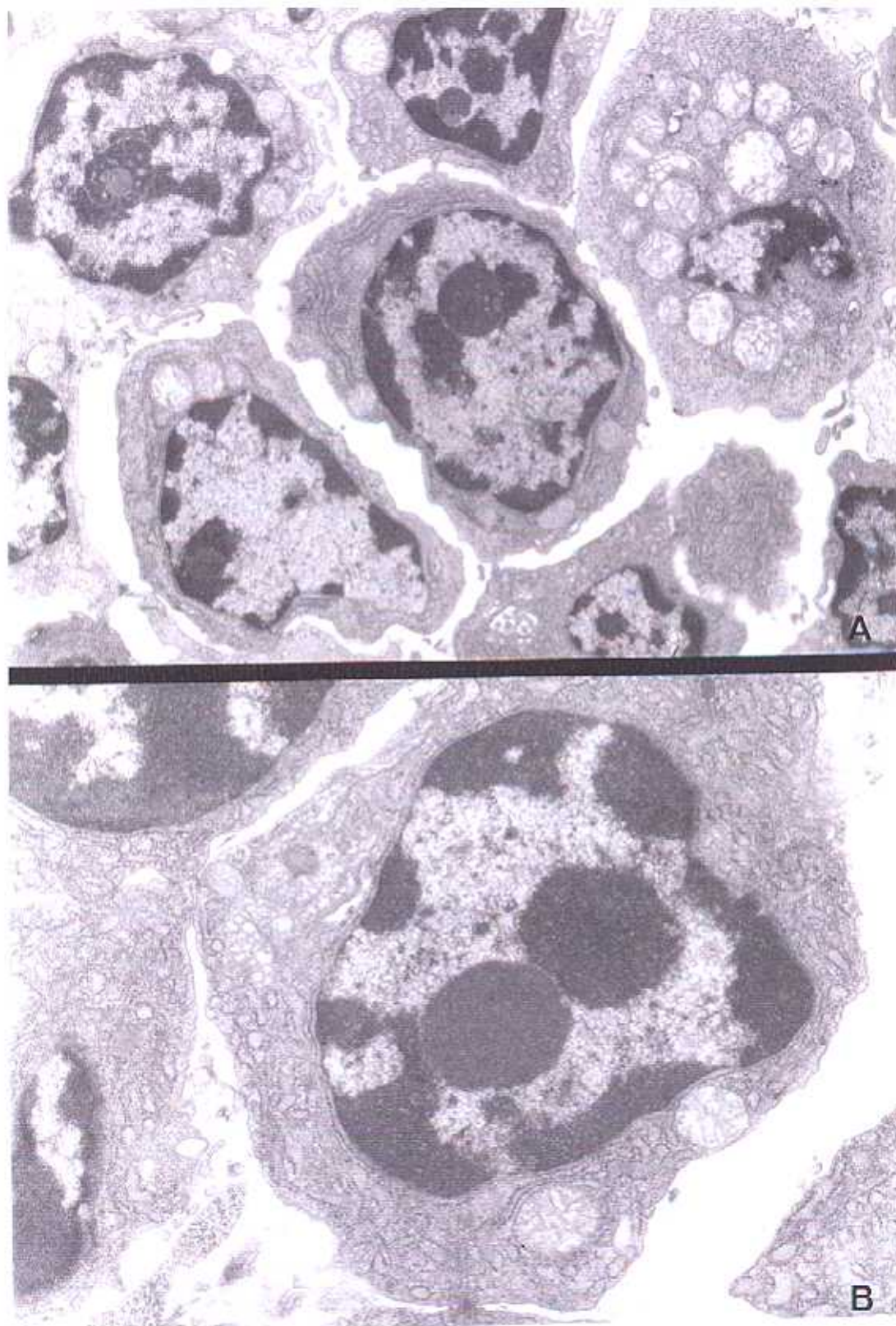


Figura 12: Linfoma IB B polimorfo: ME 95E40 (95A197). A y B) células tumorales con RER. En B nucleolo con hiperplasia de la pars proteica x 7.500 y x 15.000.

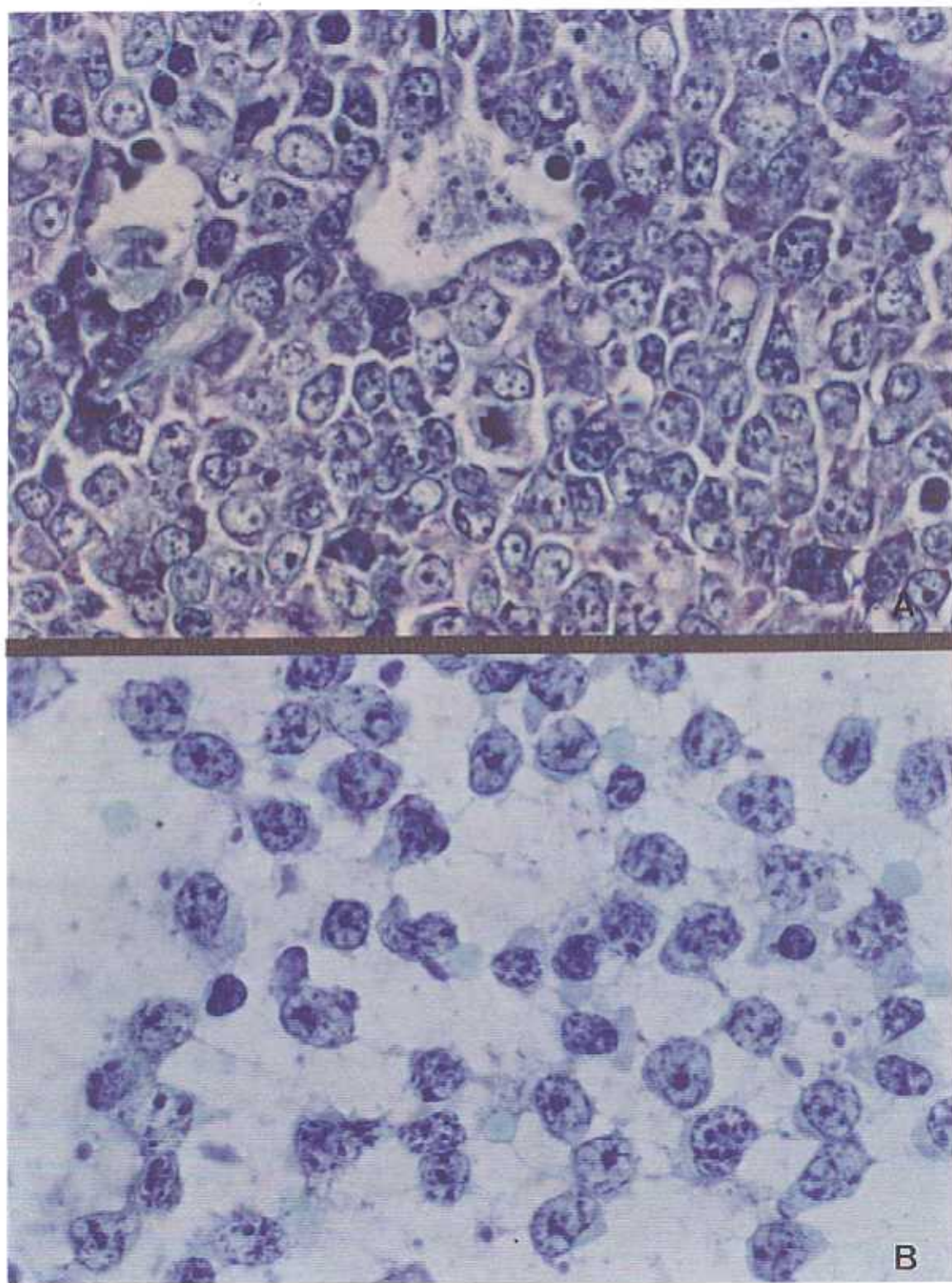


Figura 13: Linfoma centroblástico. A) CB característicos e imagen en cielo estrellado 87A55. Giemsa x100. B) impronta 97A11. Giemsa x 120.

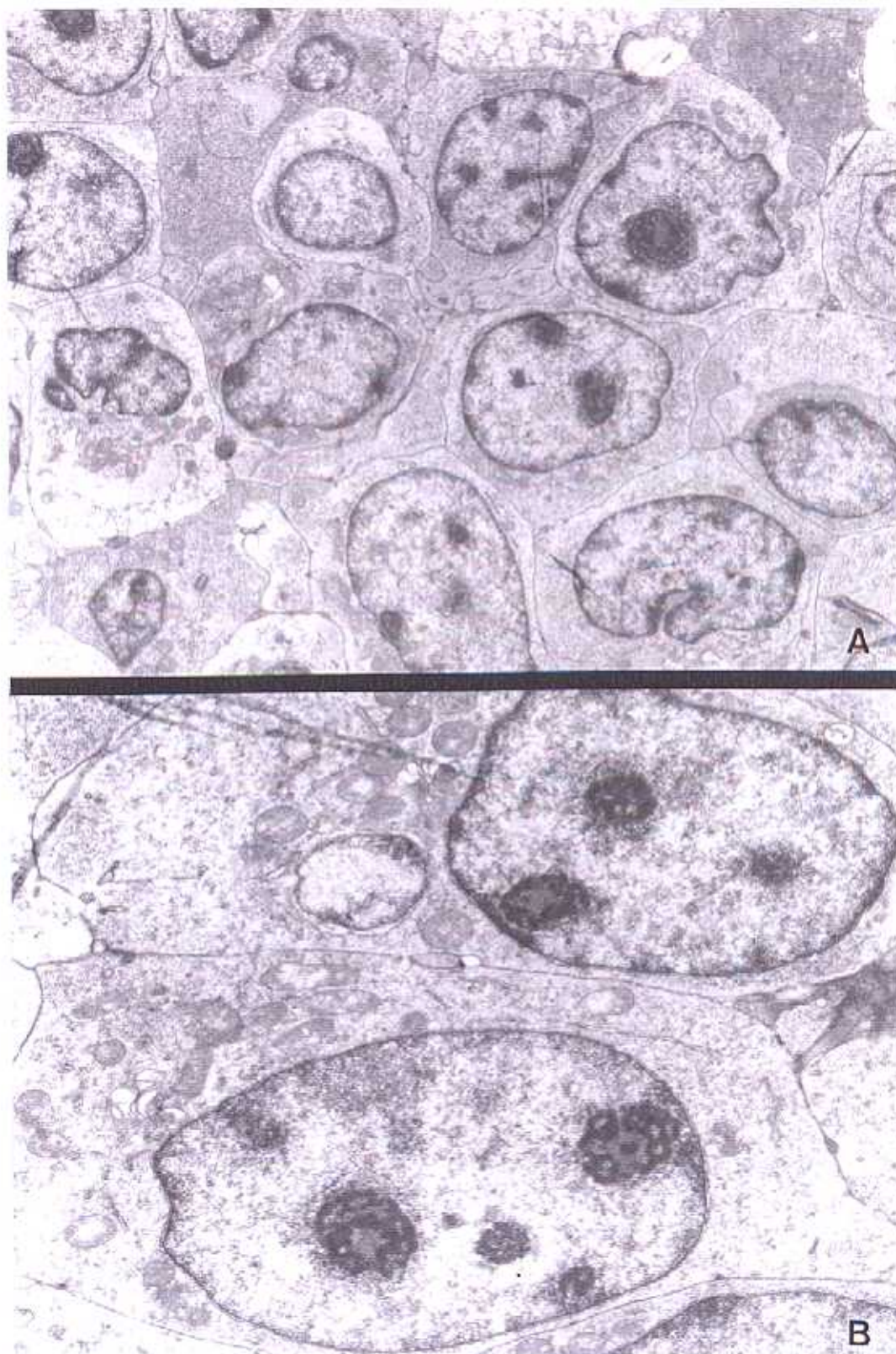


Figura 14: Linfoma Centroblástico: ME 95E66 (95A248) A y B) Panorámica y detalle de CBs con núcleo de contorno liso, cromatina dispersa, nucleolos hiperplásicos a veces marginados y ausencia de RER x 4.375 y x 10.000.

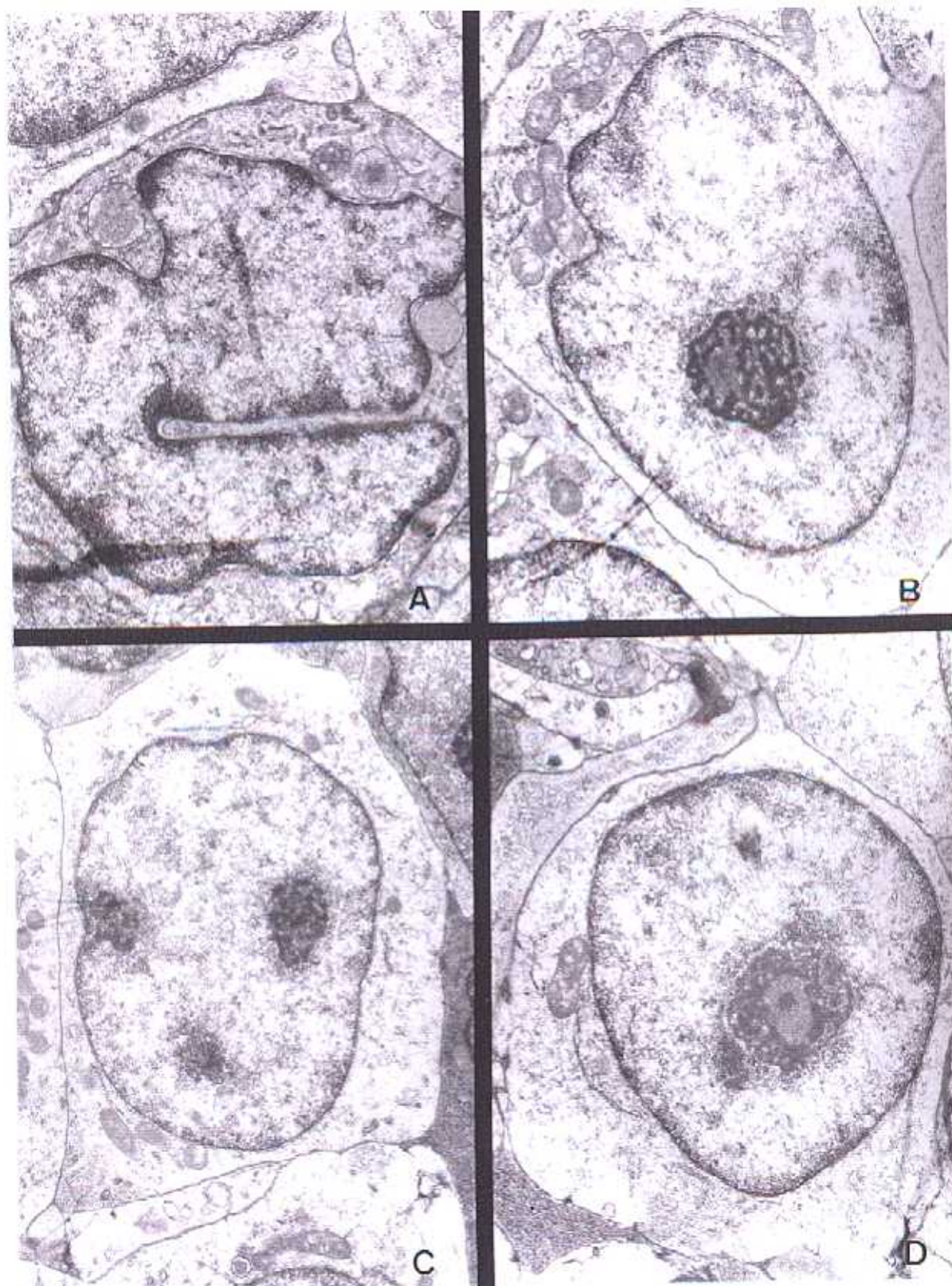


Figura 15: Linfoma CB: ME 95E66 (95A248). A, B, C y D) Detalle de CBs semejantes a los de la Figura 14, con hiperplasia de la pars fibrosa nucleolar x 10.000.

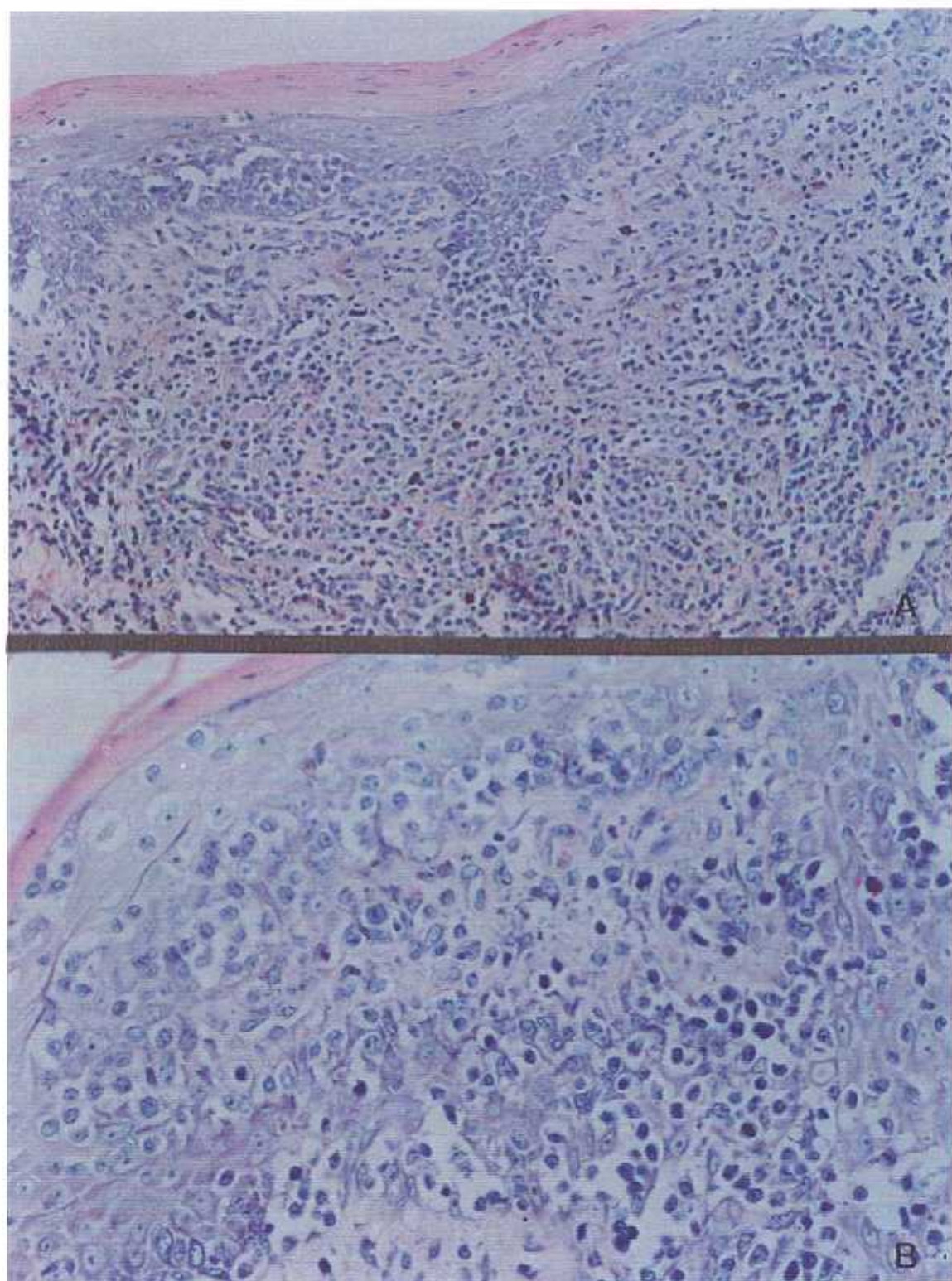


Figura 16: Linfoma T cutáneo 96A50. A) Panorámica de infiltración dérmica superficial. B) detalle del epidermotropismo, con abscesos de Pautrier confluentes. Giemsa x20 y x60.

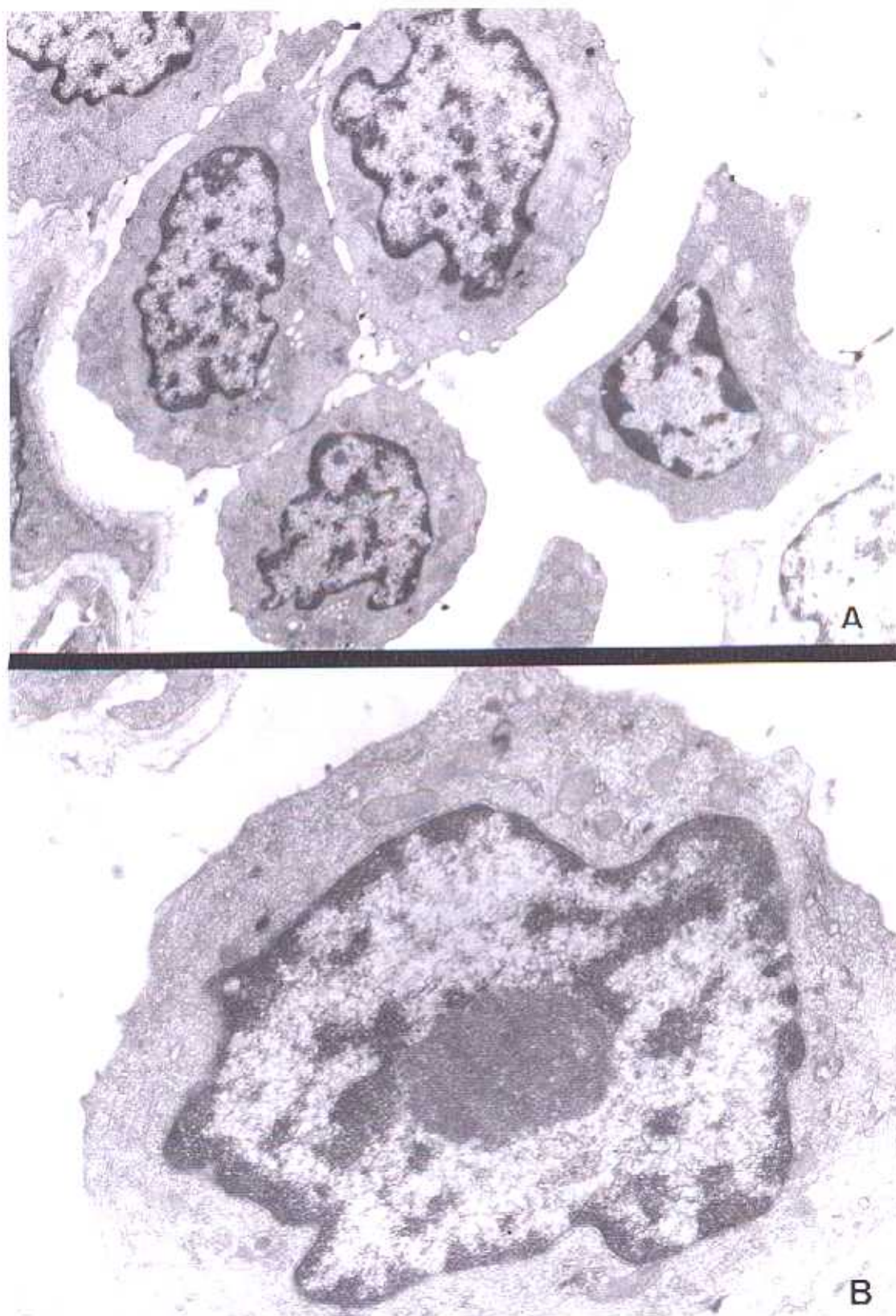


Figura 17: Linfoma T cutáneo; ME 96E29 (96A50). A) panorámica. B) detalle de blastos tumorales T con núcleo de cromatina marginada y reticulada, con diferente respuesta nucleolar. Escasos orgánulos citoplásmicos. x 7.500 y x 18.750.

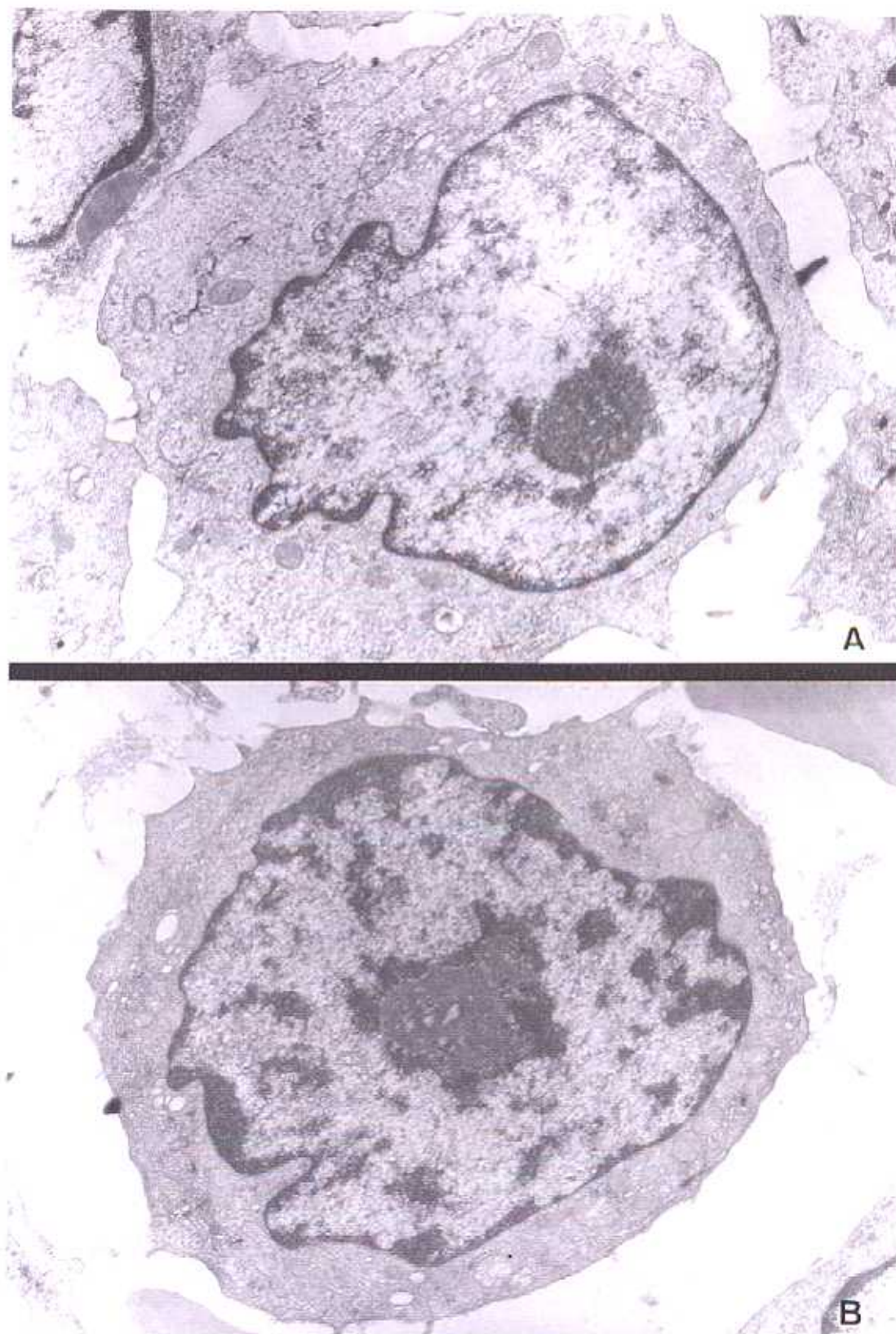


Figura 18: Linfoma T cutáneo; ME 96E29 (96A50). A y B) detalle de blastos tumorales semejantes a la fig 17B. x 12.500 y x 12.500.

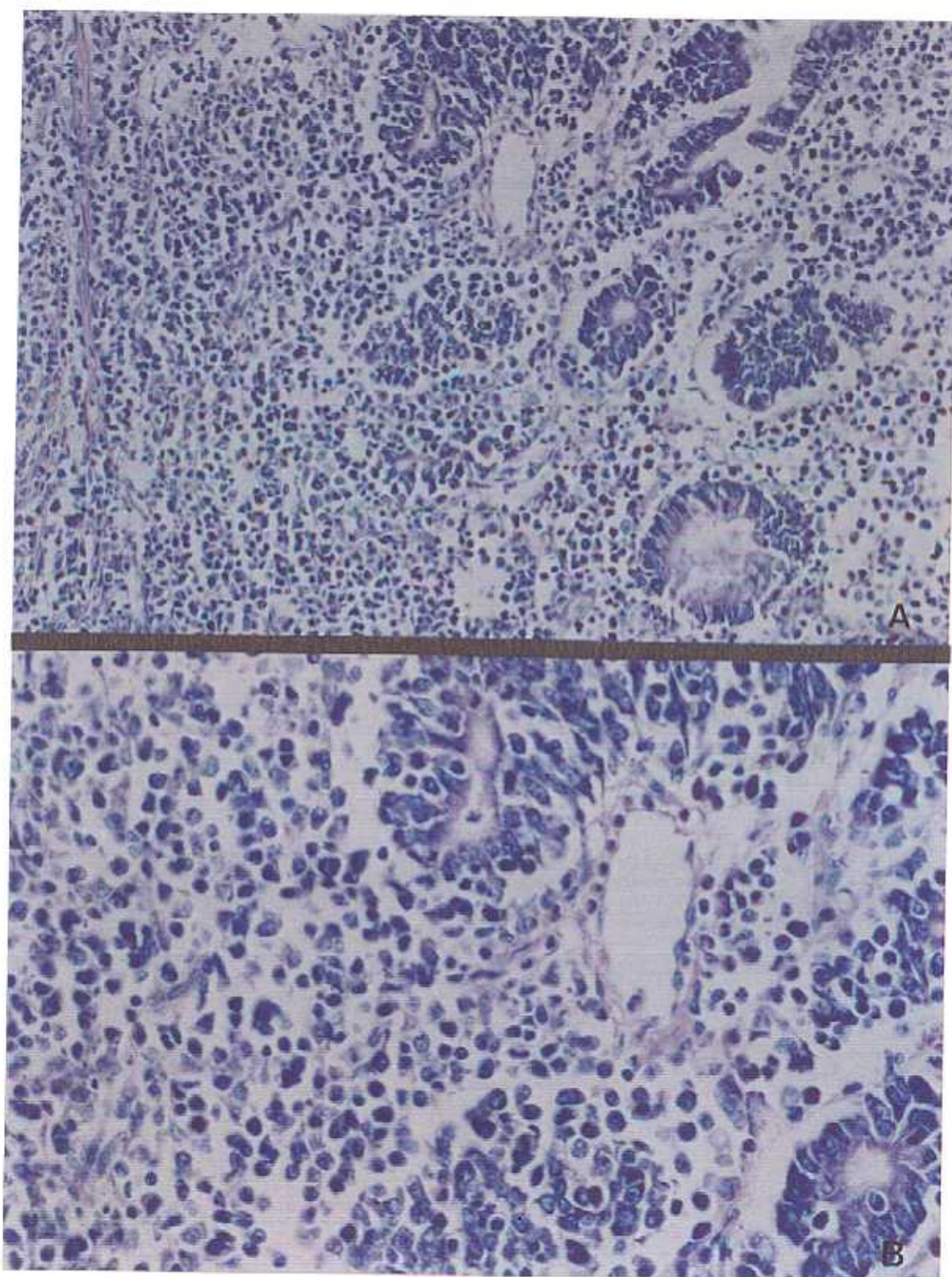


Figura 19: Linfoma B MALT de alto grado intestinal 96A108. A) panorámica. B) detalle de las lesiones linfopiteliales (LLE). Giemsa x 20 y x 60.



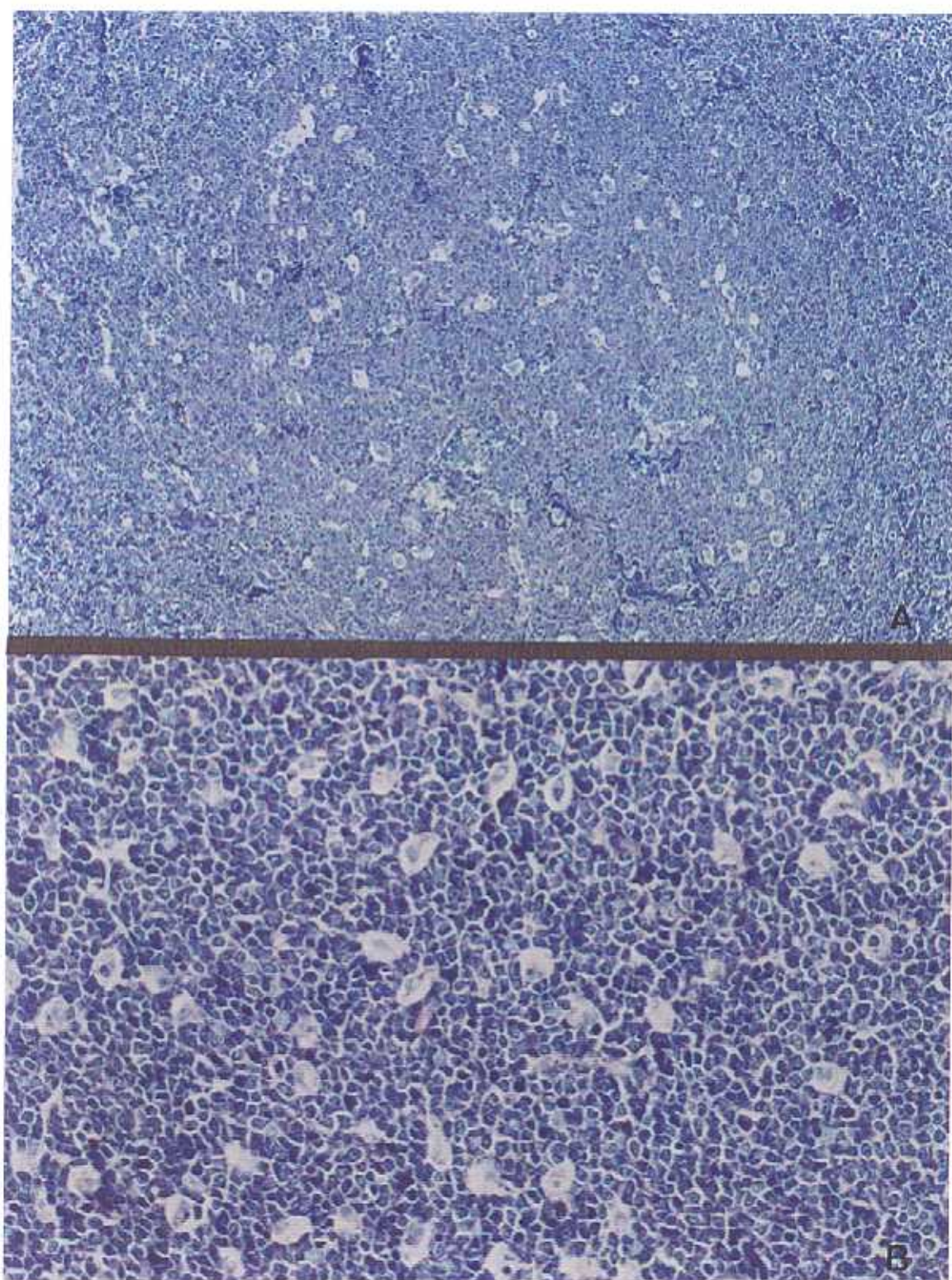


Figura 21: Linfomas B, CB y LB. Patrón de cielo estrellado. A) 95A55, CB x20. B) 97A12, LB x40.

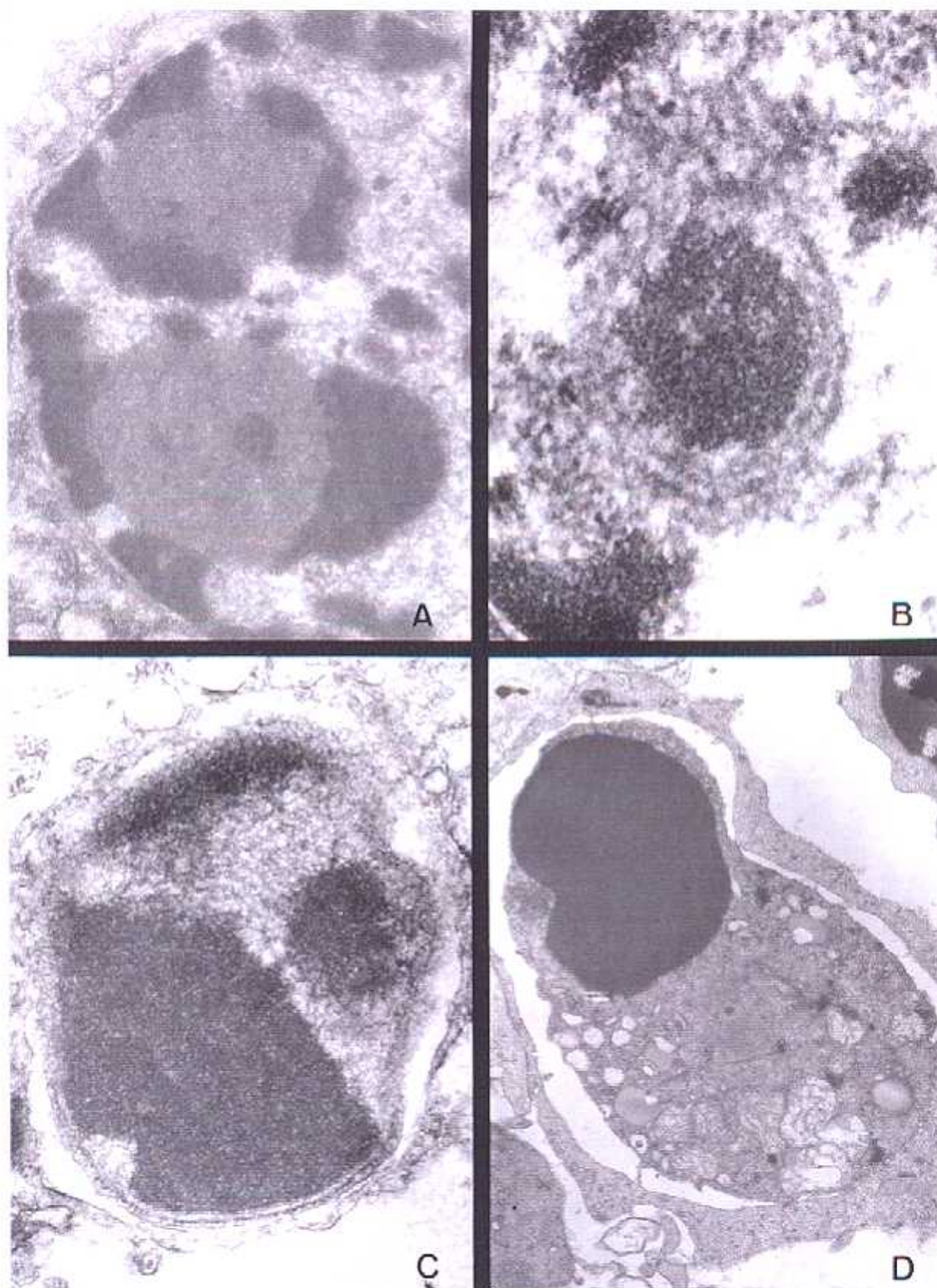


Figura 22: ME. Alteraciones celulares en el linfoma. A) 95E12 (95A48) segregación nucleolar; B) Nuclear body fibrilo granular, 95E12 (95A48) x40.000 C y D) Apoptosis 95E40 (95A197) x 20.000 y x 30.000.

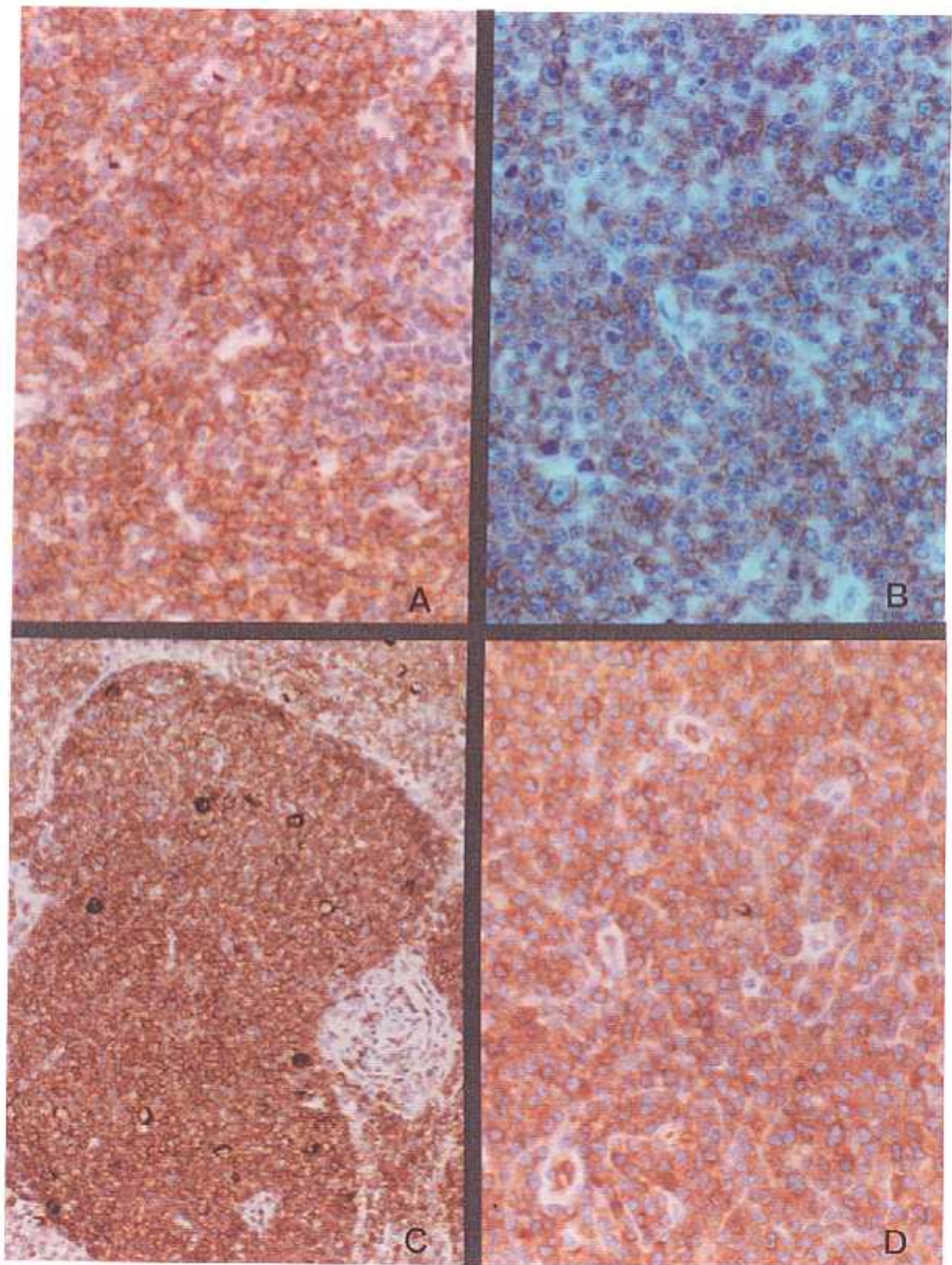


Figura 23: Linfoma B. Tinción del anticuerpo monoclonal CD79a (clon HM57). A y C) 95A48 IB x20. B) 96A48 IB x20. D) LB 95A86 x40.

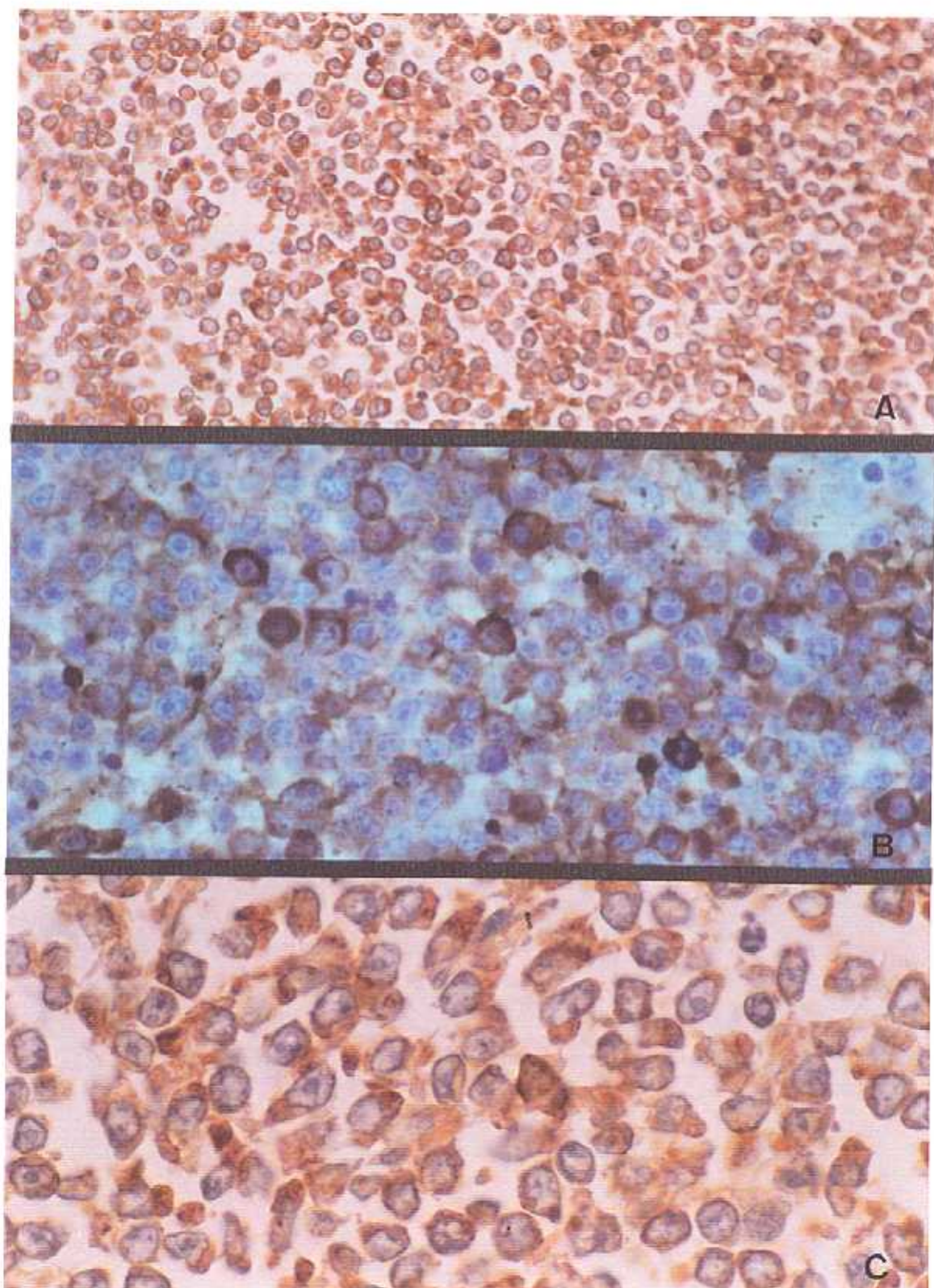


Figura 24: Tinción del anticuerpo policlonal de la cadena LAMBDA. A y C) LB 95A238  $\times 20$  y  $\times 100$ . B) IB 96A48  $\times 200$ .

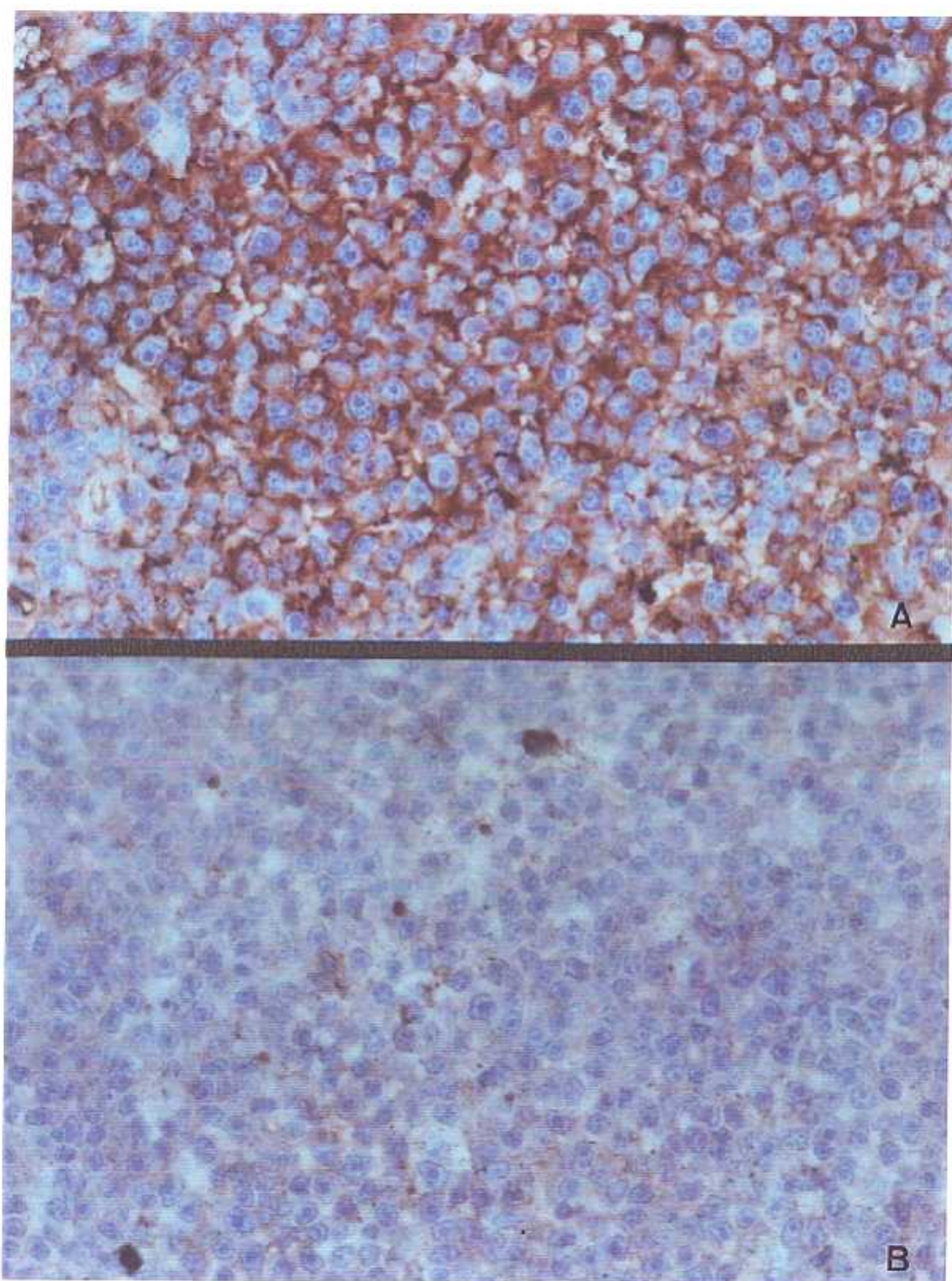


Figura 25. Linfoma IB B monomorfo LAMBDA+ y KAPPA- 96A48.x80.

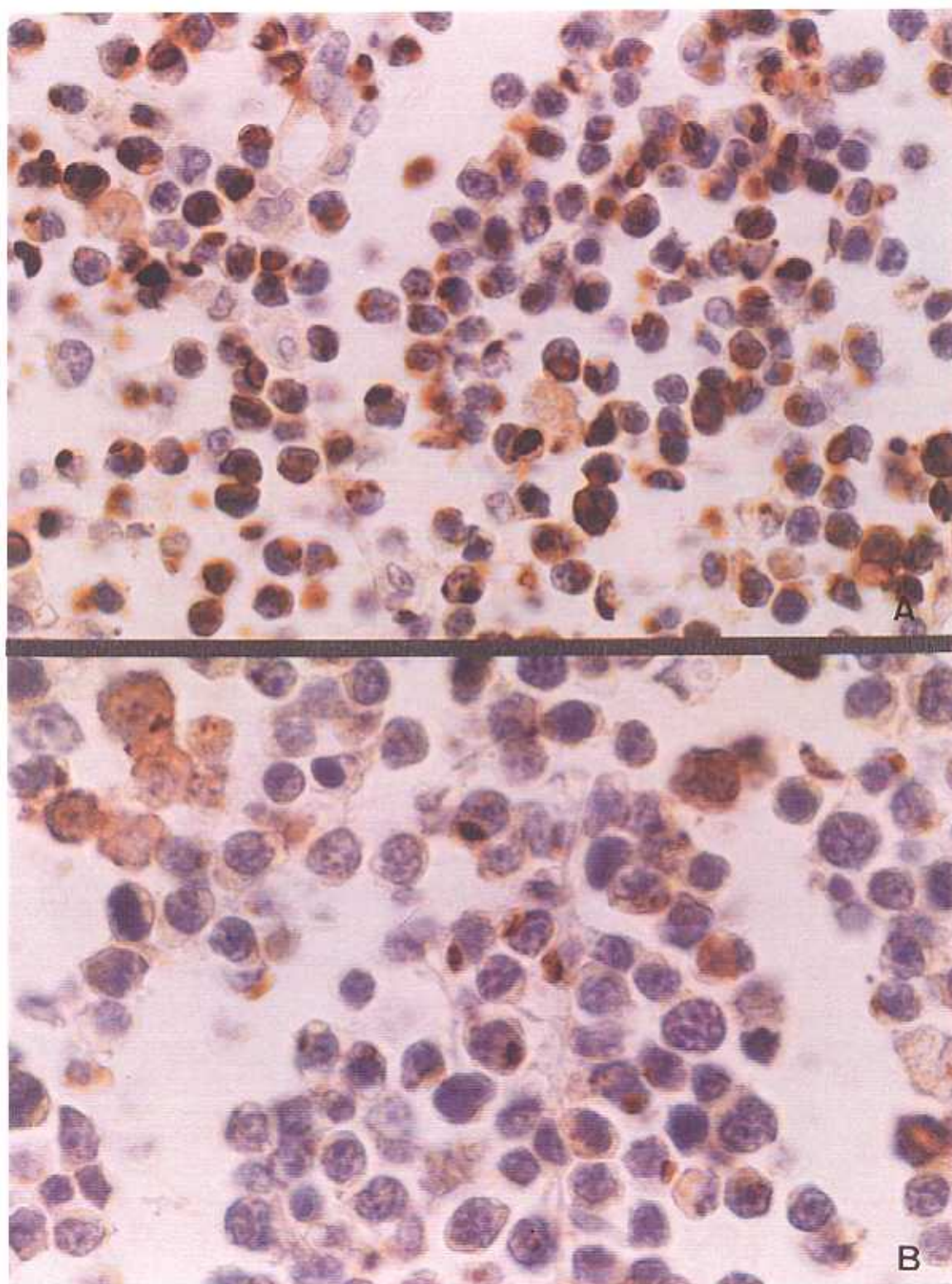


Figura 26: Linfoma MALT de alto grado con restricción de la cadena KAPPA. Positividad polar por acúmulos citoplásmicos similares a los mostrados en la figura 20. 96A108 x80 y x200.

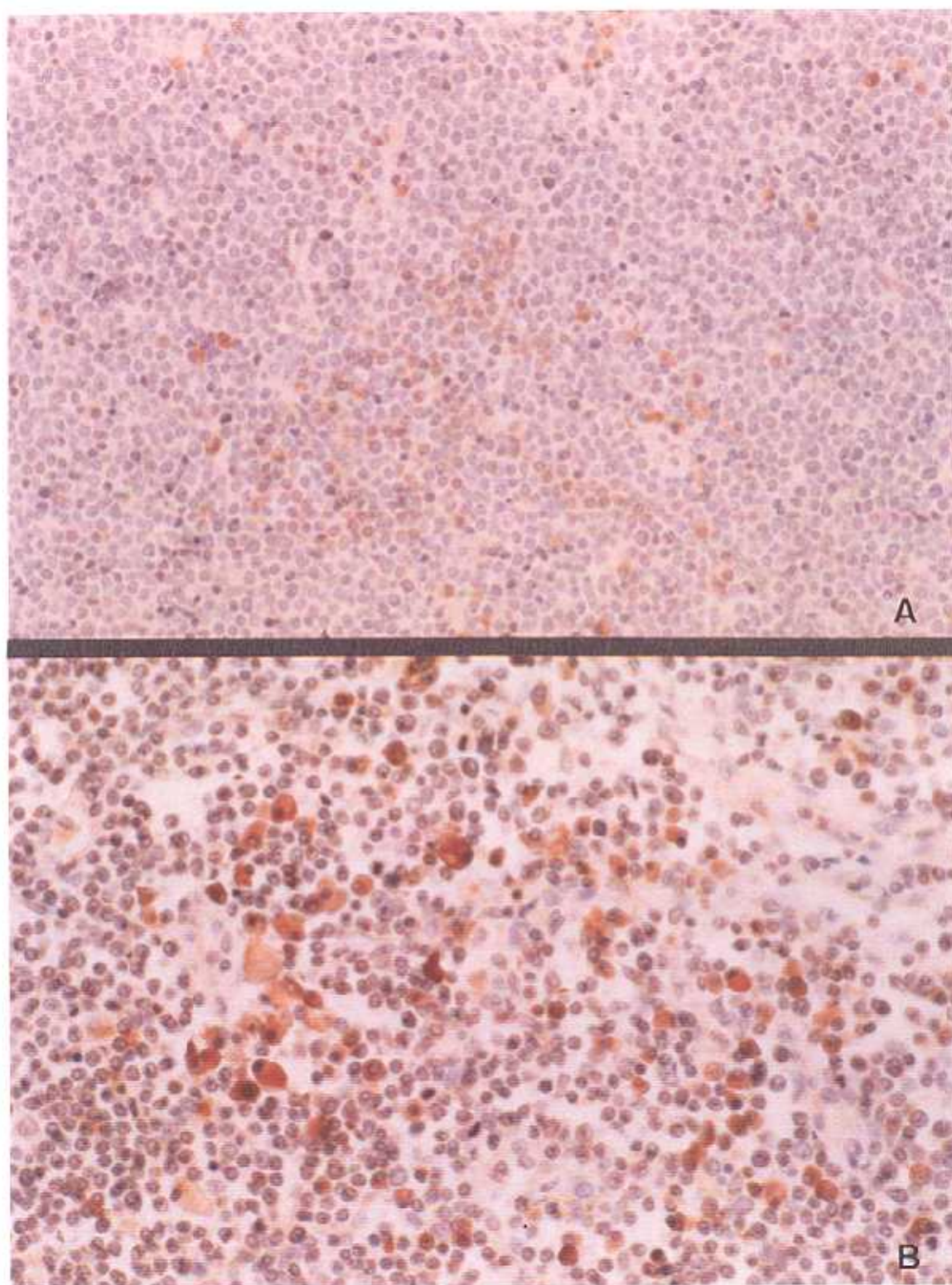


Figura 27; Tinción con el anticuerpo policlonal de la cadena J (J-chain). 96A53, 96A51. x 20.

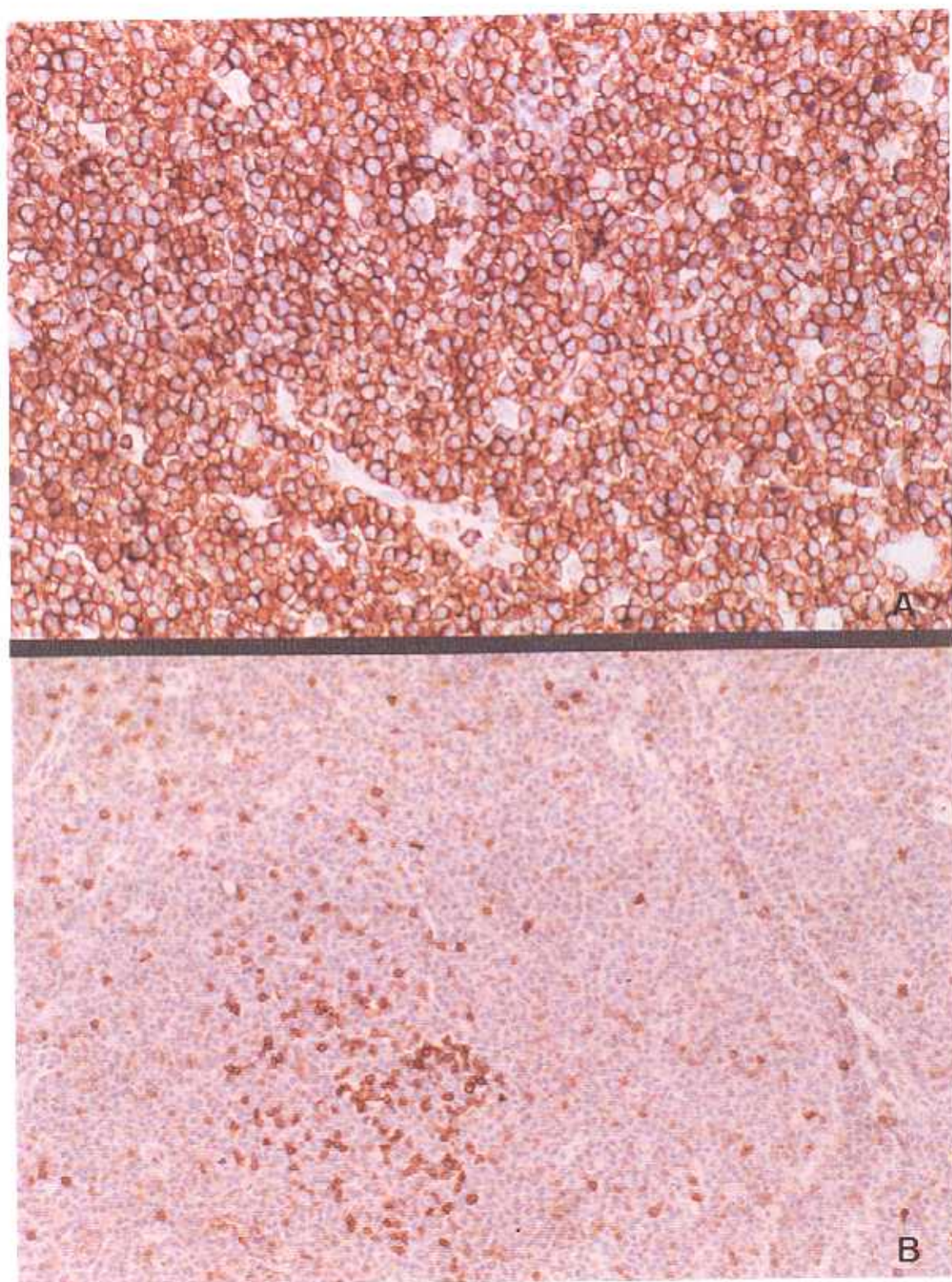


Figura 28: Tinción del marcador Policlonal CD3. A: linfoma T CD3+, 96A109 x20, B: células T CD3+ aisladas en un linfoma de estirpe B 95A248. x20.

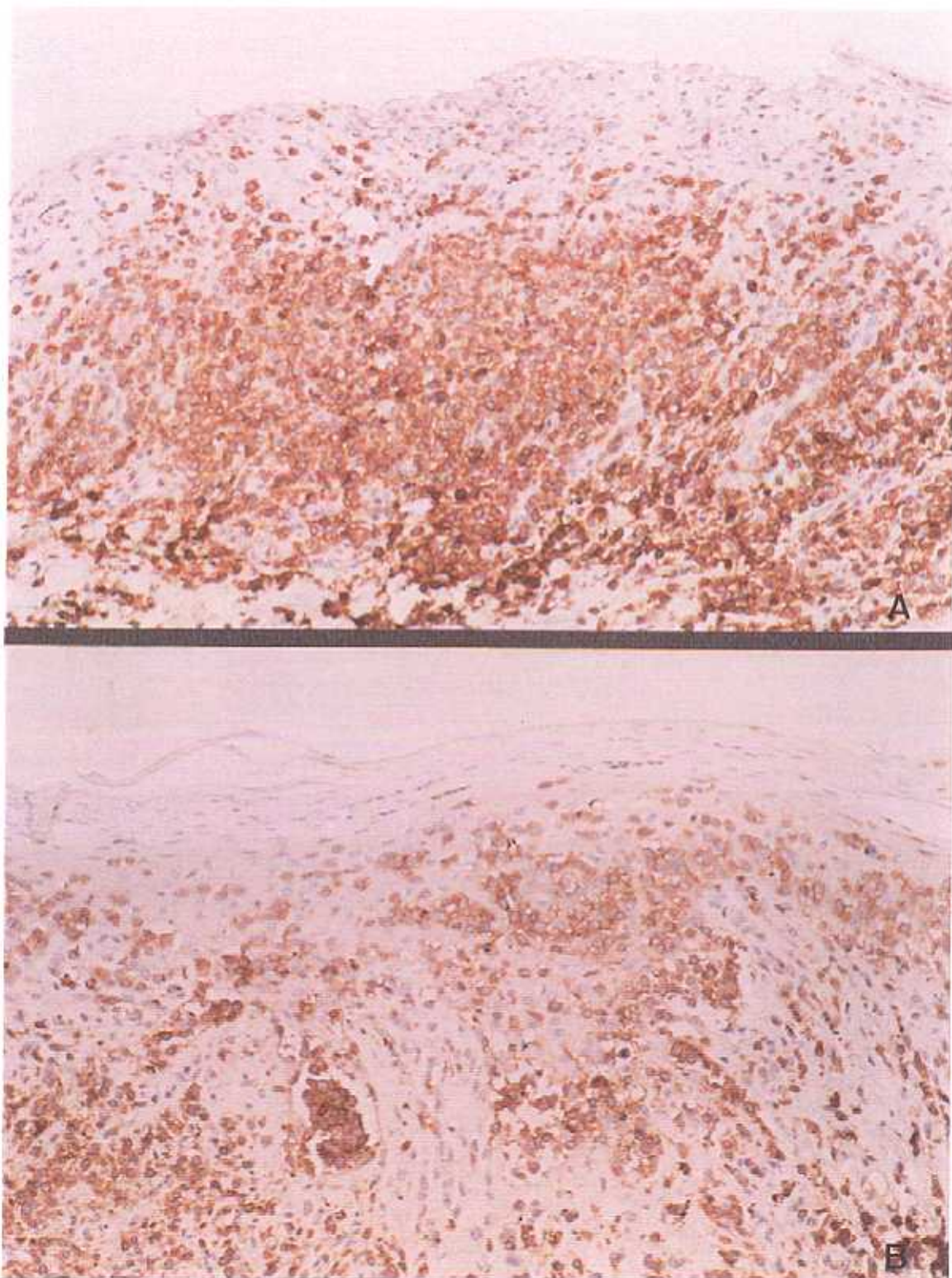


Figura 29: Linfoma T cutáneo CD3+. A y B) Detalle del epiteliotropismo y los abscesos de Pautrier. 96A50 x30.

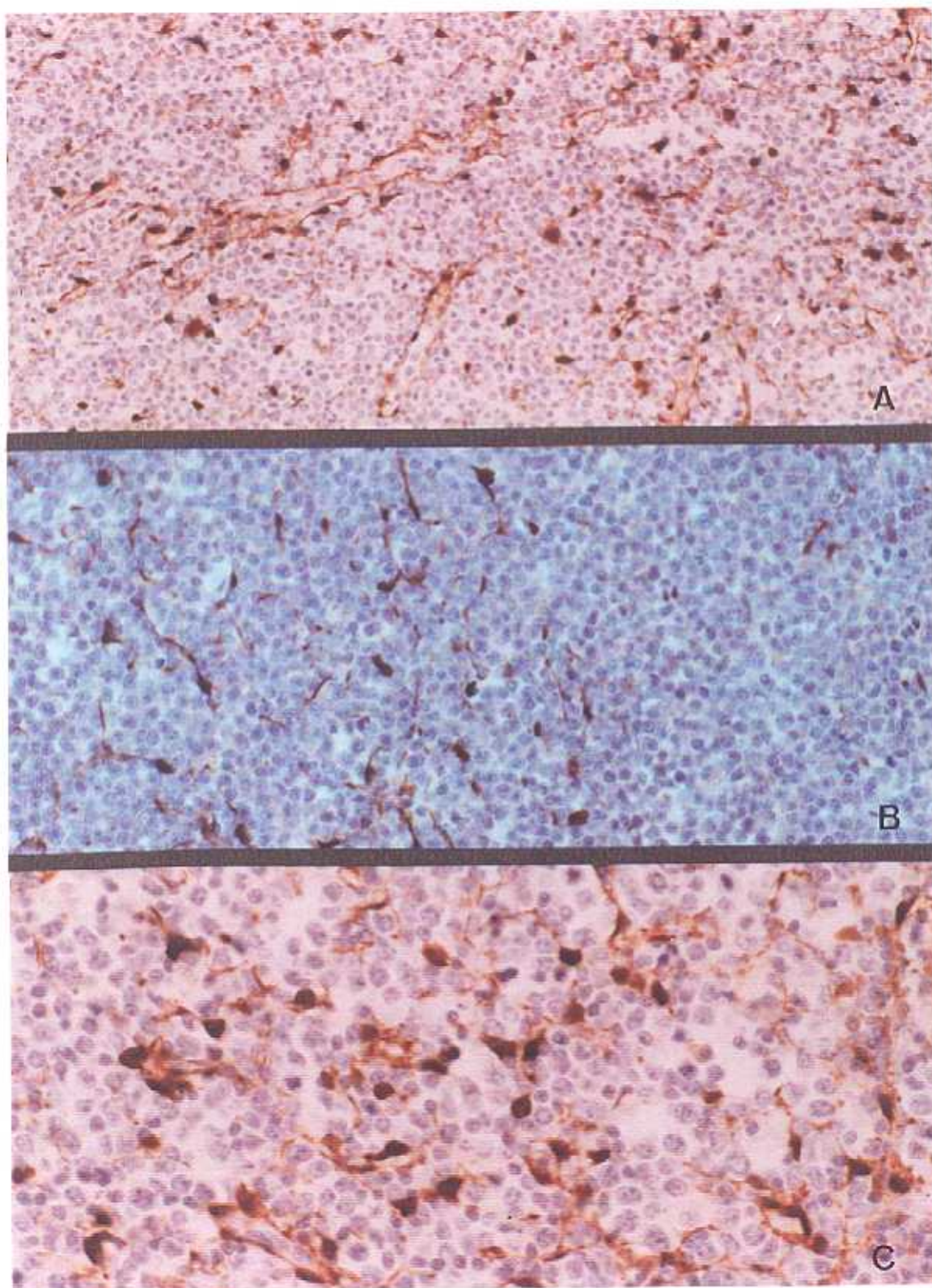


Figura 30: Tinción del marcador para la S-100. A, B) distintos patrones del componente histiomonocitario. 97A45, 96A48 x20. C) detalle 97A45 x30.

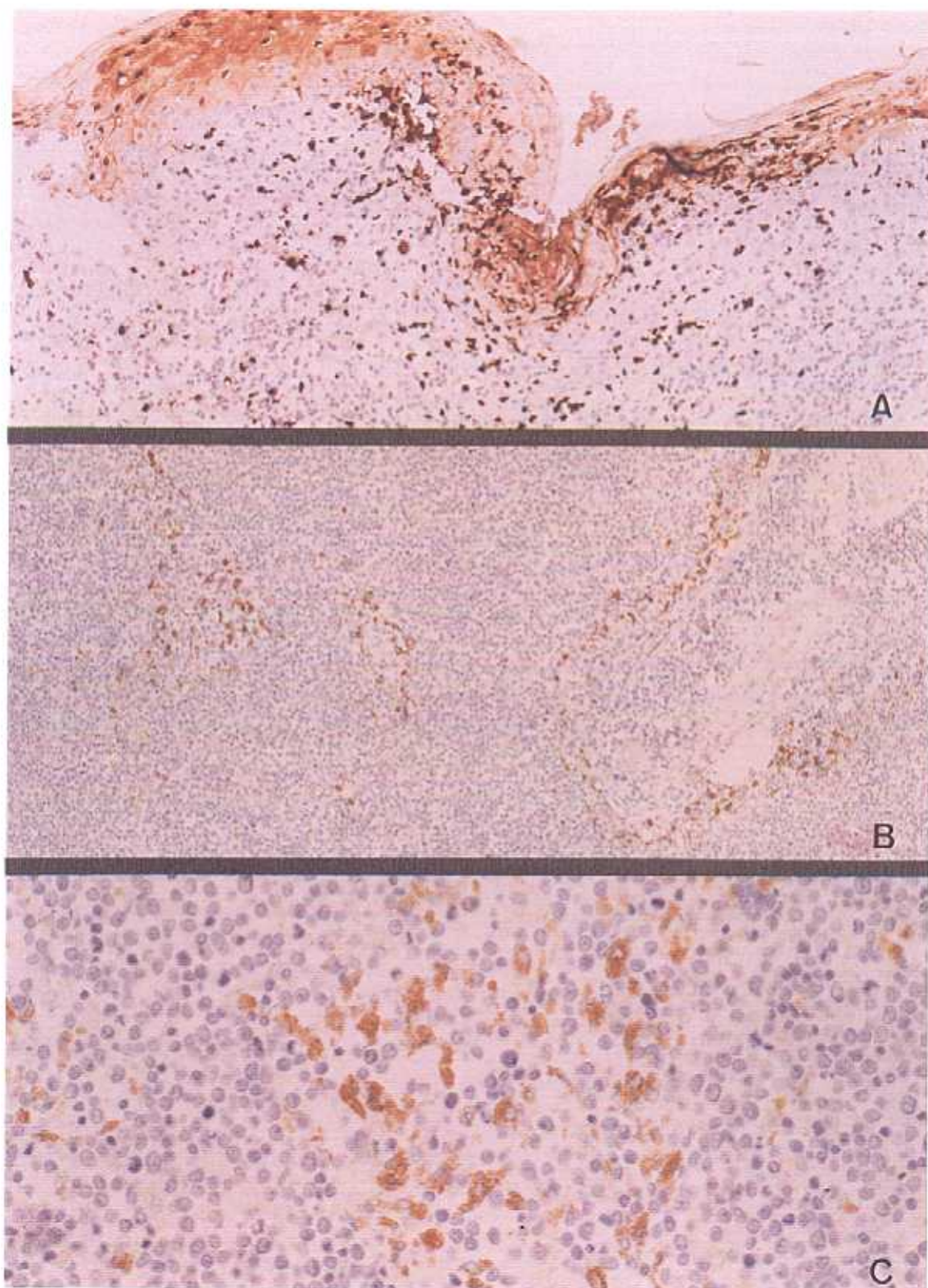


Figura 31: Tinción del marcador MAC387. A) Células de Langerhans en piel. 96A50 x20. B y C) Histiocitos sinusales. 96A23 x30 x40.

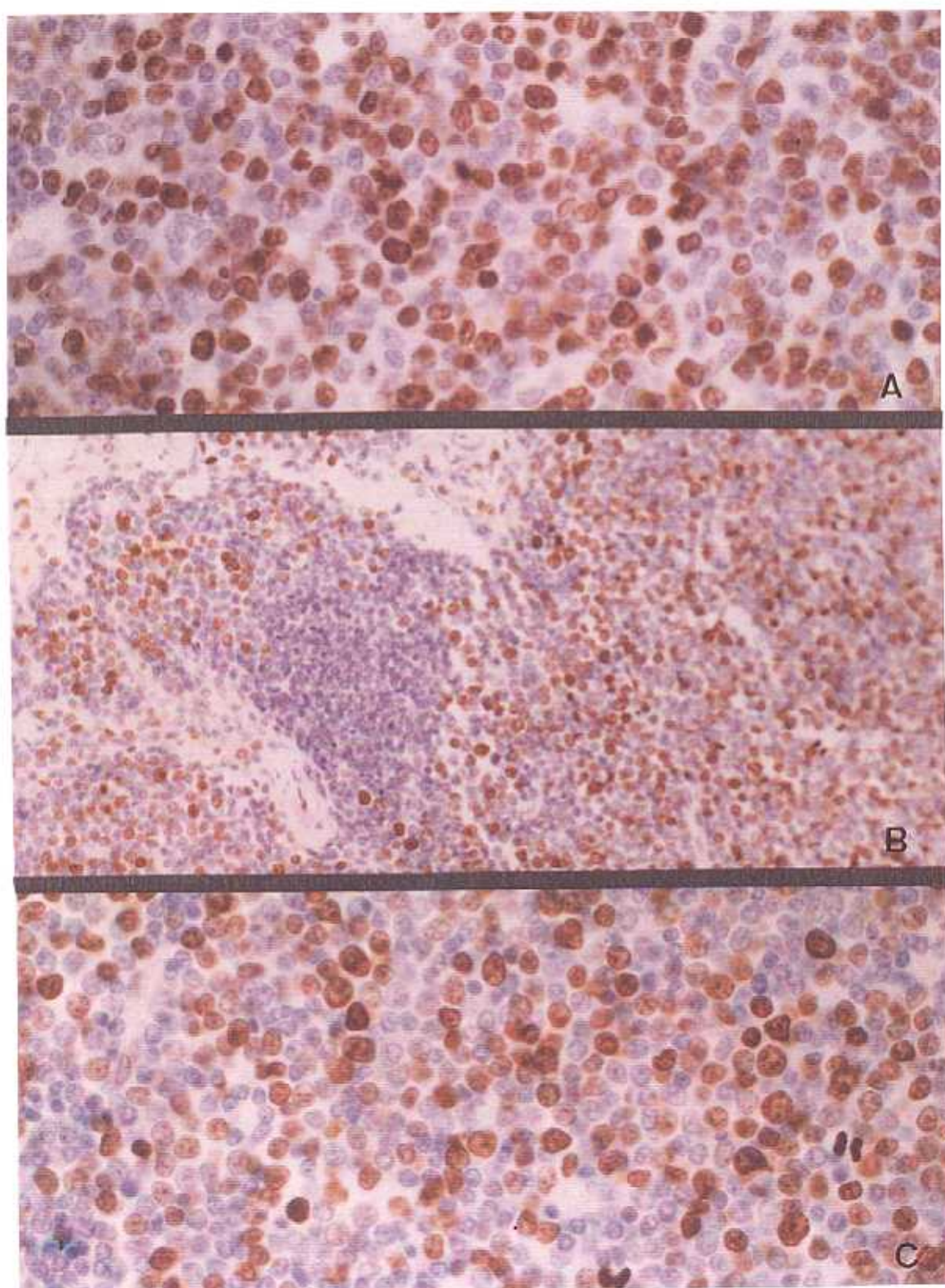


Figura 32: Tinción del marcador monoclonal nuclear MIB1. A) 95A86 x80. B y C) 96A53 x20 x30.

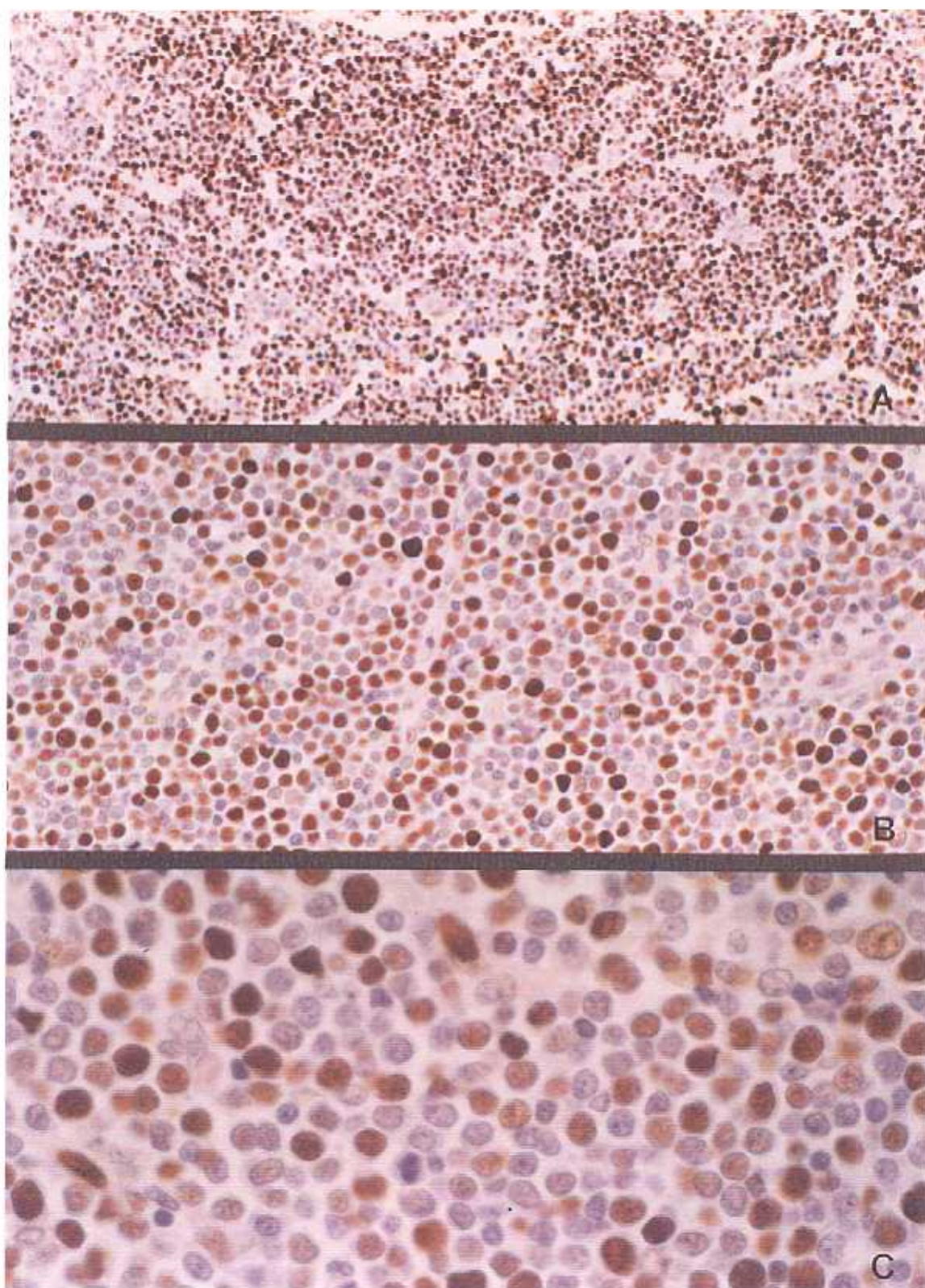


Figura 33: Tinción del marcador monoclonal nuclear PC10/PCNA. A) 96A108 x20. B y C) 96A53 x30 x40.

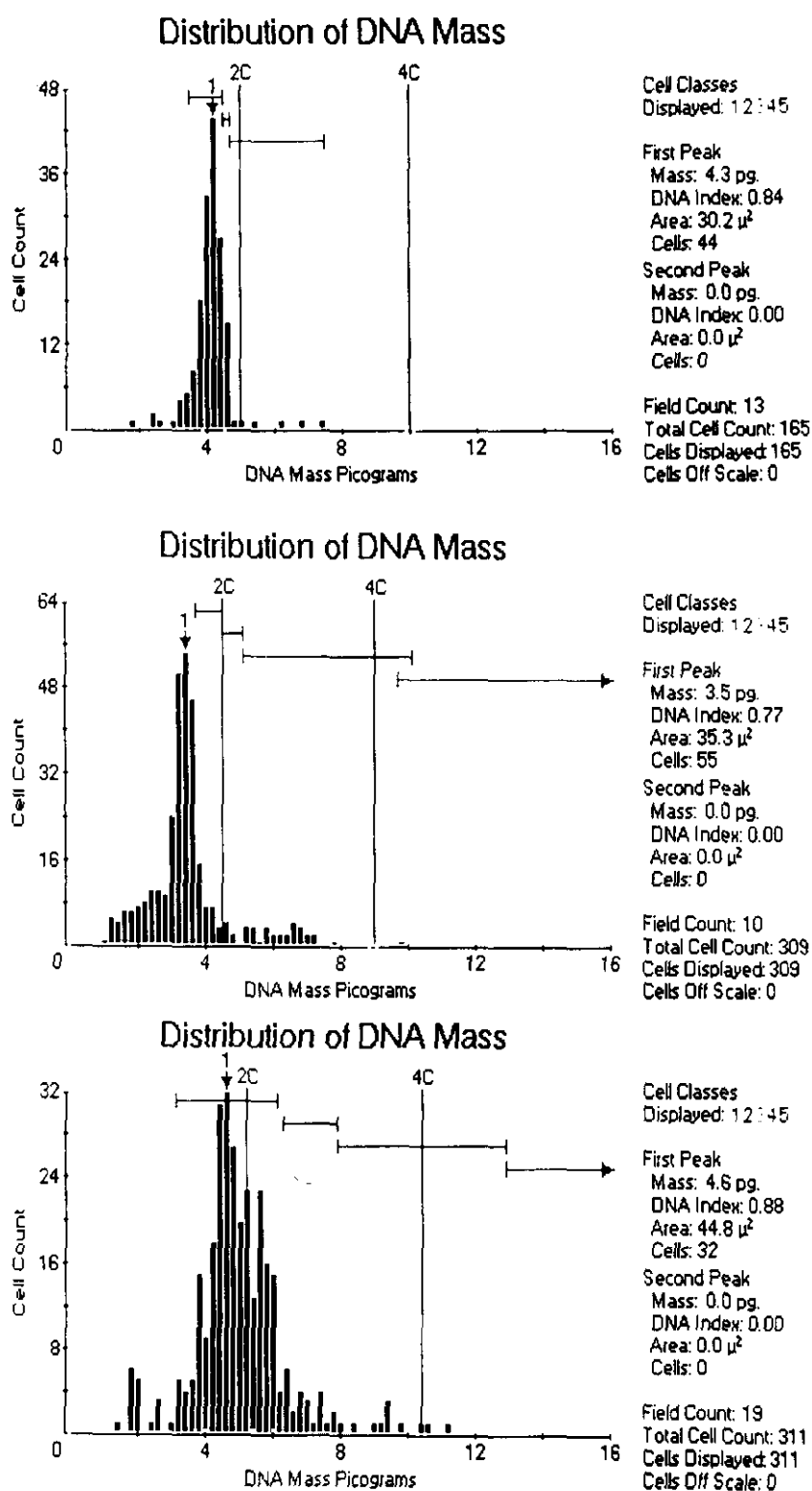


Figura 34: Estudio de la ploidía de las células tumorales con citometría estática. Gráficas de distribución de la cantidad de ADN en histogramas proporcionadas por el programa de ploidía del CAS 200. A) Población diploide. B) Población diploide con fase S alta. C) Población aneuploide.

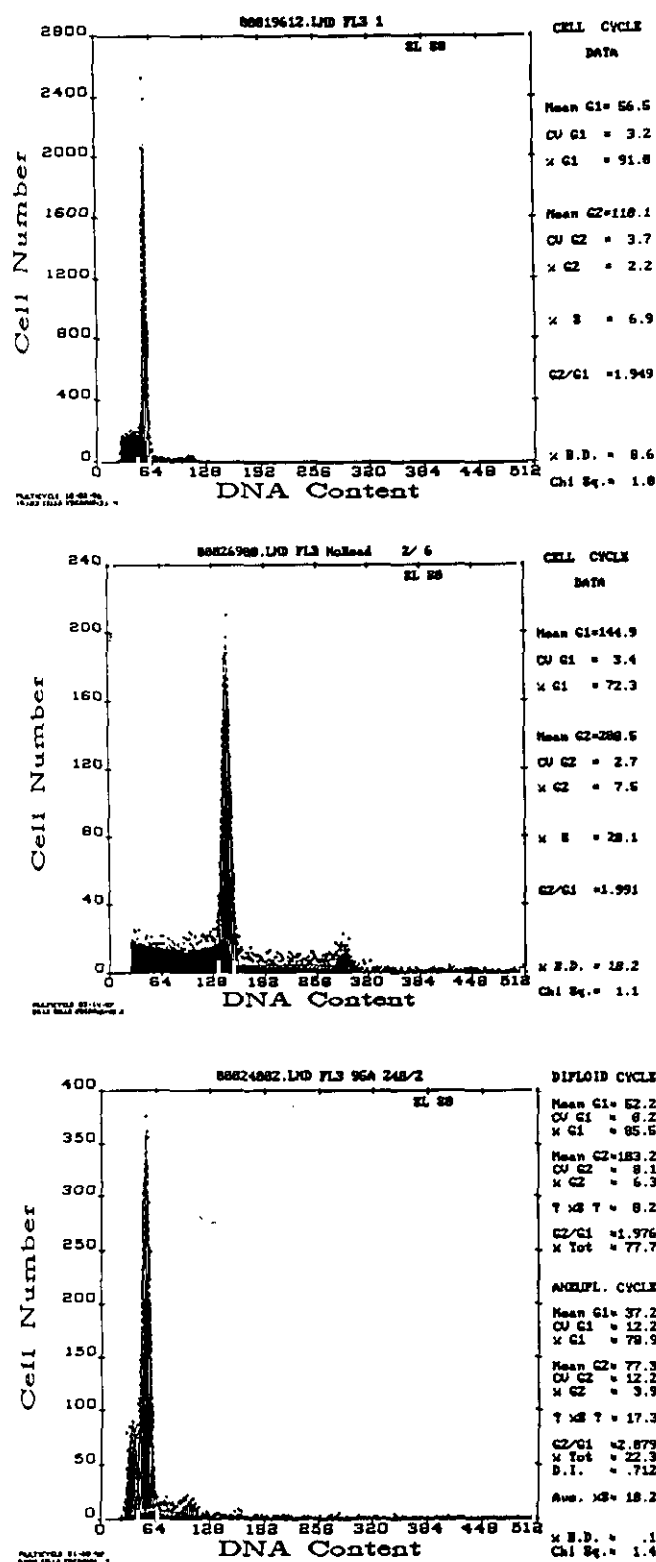


Figura 35: Estudio de la ploidía de las células tumorales con citometría de flujo. Gráficas continuas obtenidas con el programa PARA-1 del citómetro de flujo EPICS-C. A) Población diploide. B) Población diploide con fase S alta. C) Población diploide con un pico aneuploide hipodiploide de menor altura.

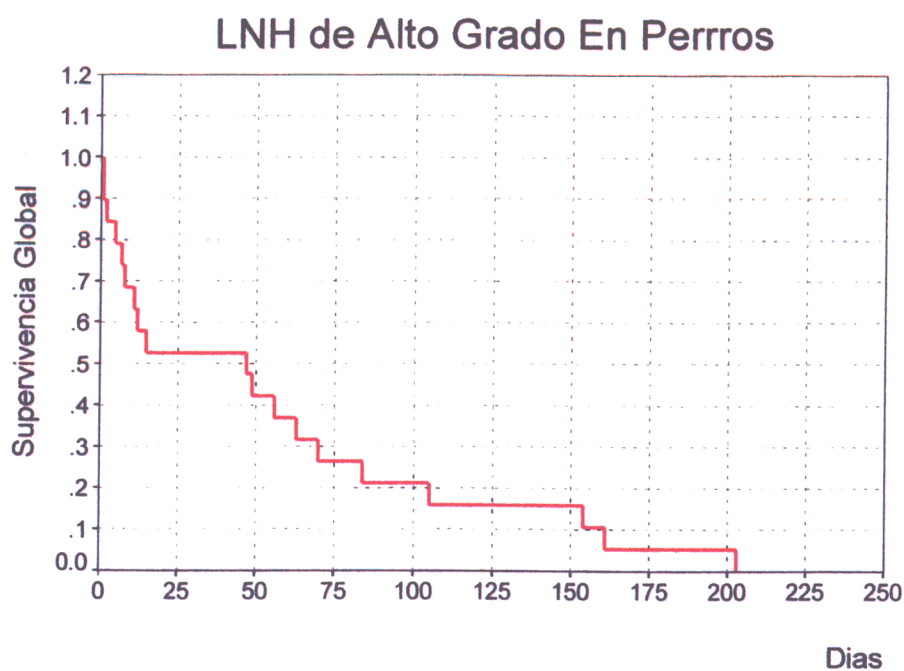


Figura 36: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global con la totalidad del grupo; se han descartado aquellos casos en los que se sacrifica al animal el mismo día del diagnóstico, por considerar su supervivencia=0 (total=19 casos).

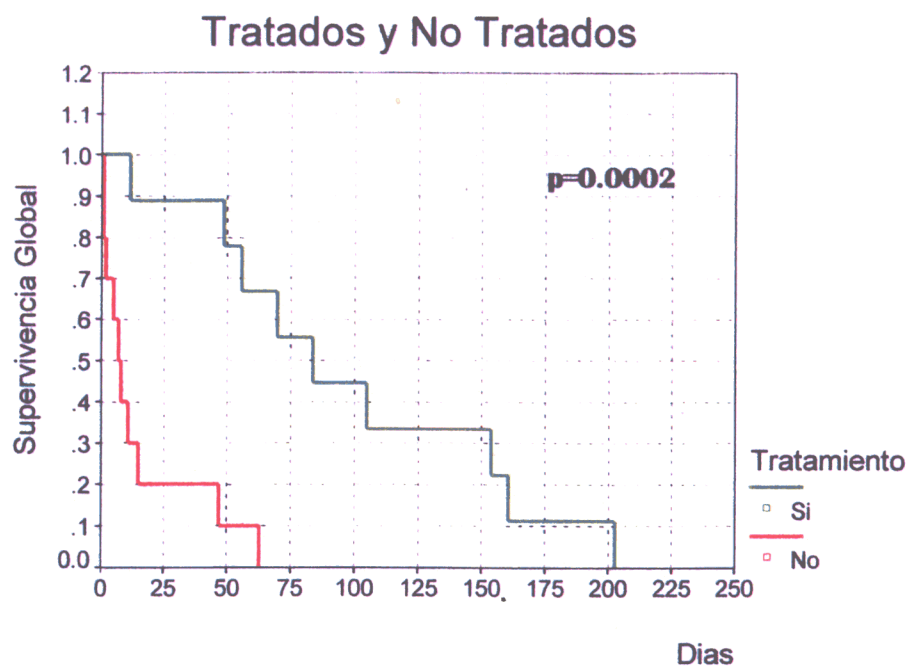


Figura 37: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los animales en función a la variable tratamiento (tratados con quimioterapia frente a los no tratados). La diferencia es significativa con  $p=0.0002$ .

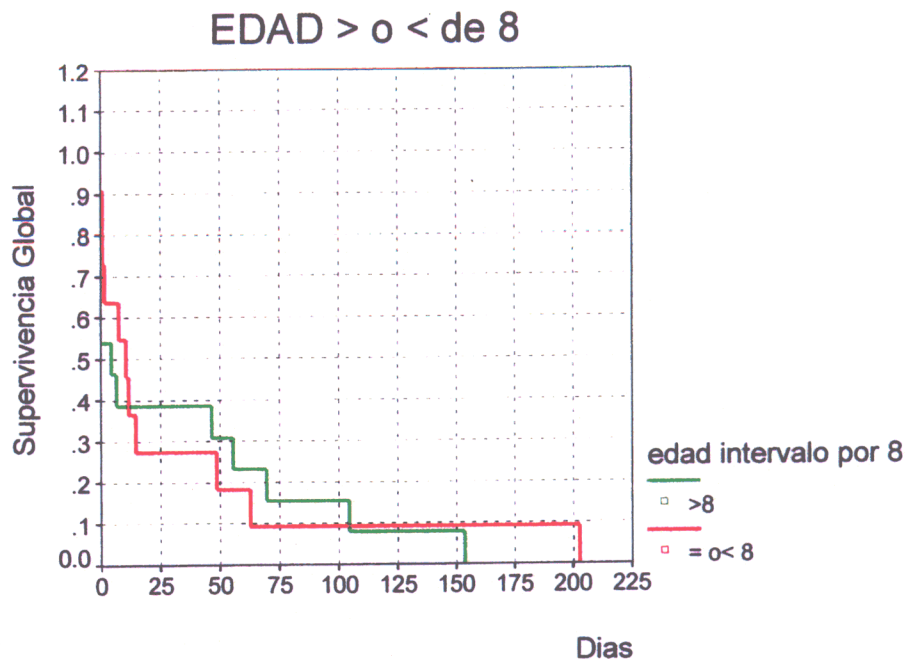


Figura 38: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los animales en función de la variable edad, suponiendo el valor 8 de la mediana ( $x < 8$ ;  $x \geq 8$ ) el límite de los dos intervalos por ser el valor que más se presenta. No hay diferencias significativas en el tipo de evolución de ambos grupos.

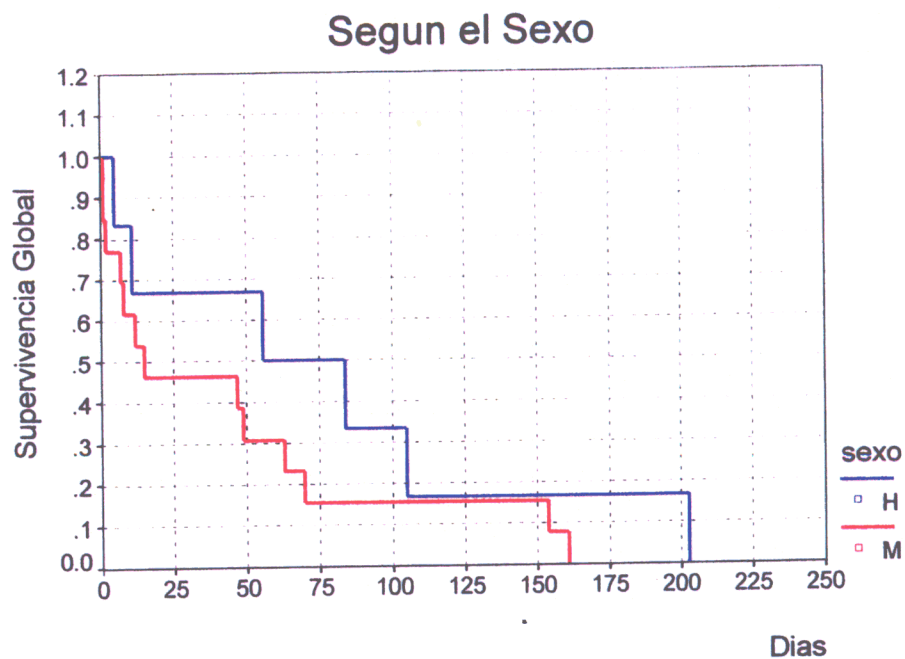


Figura 39: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los animales en función de la variable sexo; no hay diferencias significativas en el tipo de evolución de ambos grupos. Se necesita un n mayor.

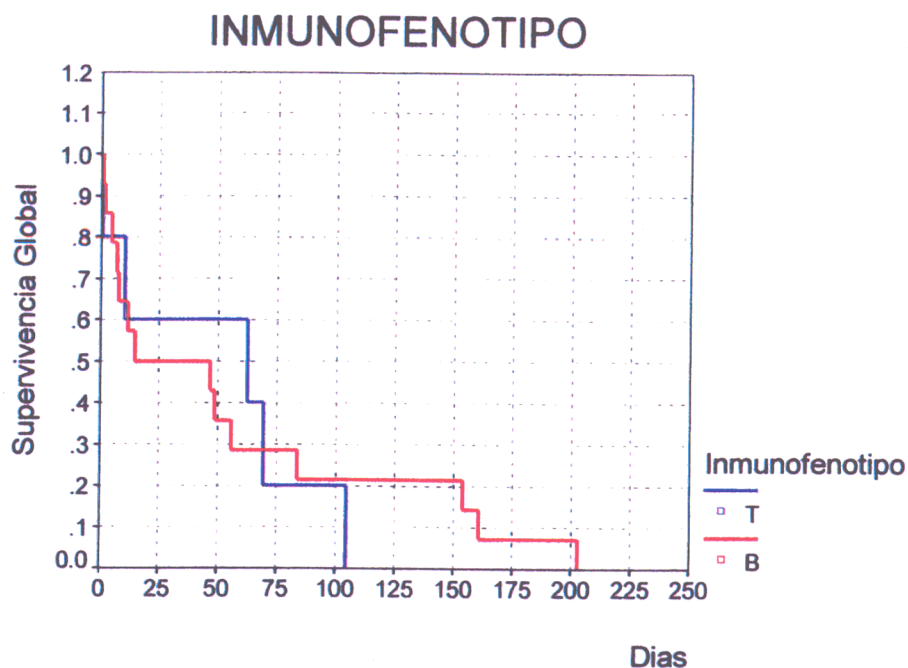


Figura 40: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los animales en función de la variable inmunofenotipo; no hay diferencias significativas en el tipo de evolución de ambos grupos, posiblemente debido a el escaso número de linfomas T dentro de la serie limitada a 30 casos.

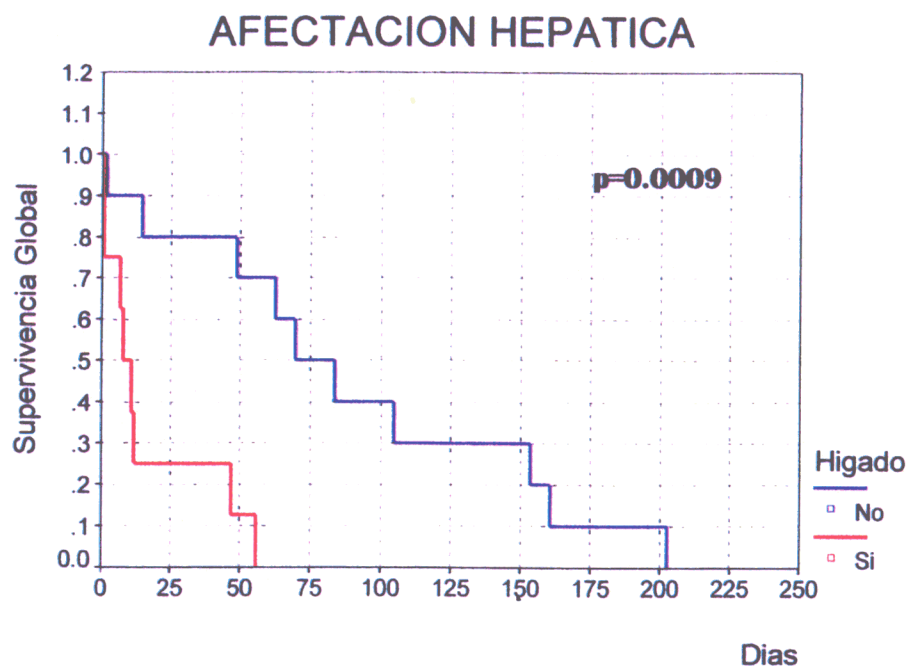


Figura 41: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los animales en función de la variable afectación hepática; la diferencia es claramente significativa con un  $p=0.0009$ . Basándose en este dato, se puede asegurar que el hígado debe ir en un estadiaje diferente al bazo.

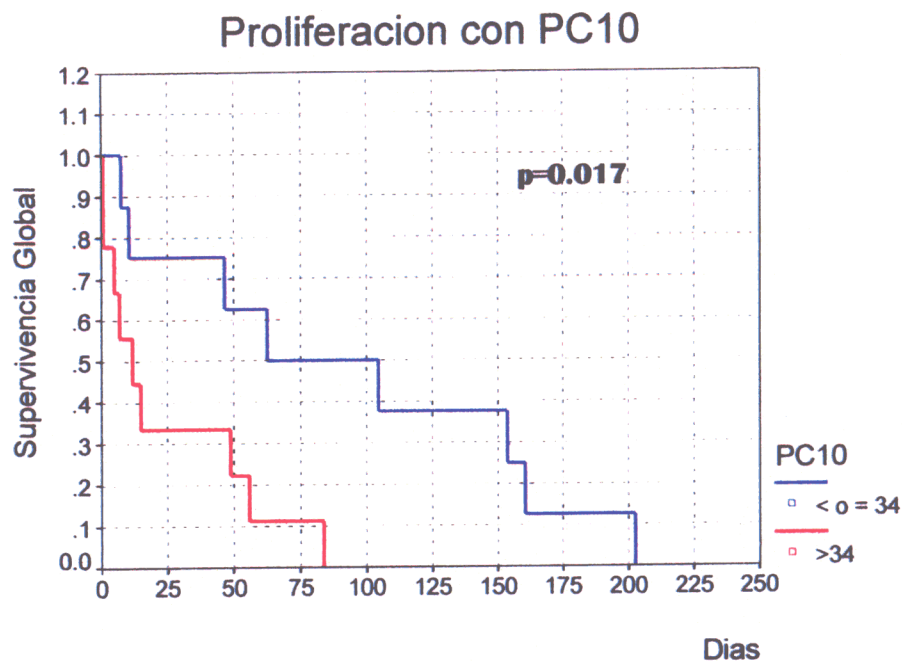


Figura 42: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los animales en función de la variable proliferación con PC10; si se considera el valor de la mediana 34 como el límite entre dos intervalos ( $x < 34$ ;  $x \geq 34$ ), existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.017$ ) entre la evolución de ambos grupos.

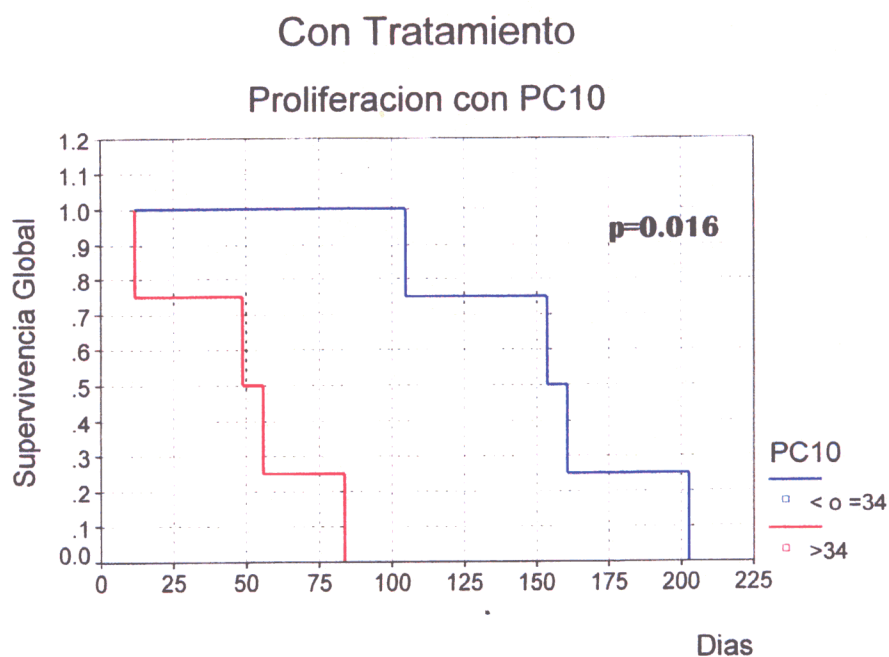


Figura 43: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los animales tratados con quimioterapia COP en función de la variable proliferación con PC10; hay diferencias significativas con  $p=0.016$ .

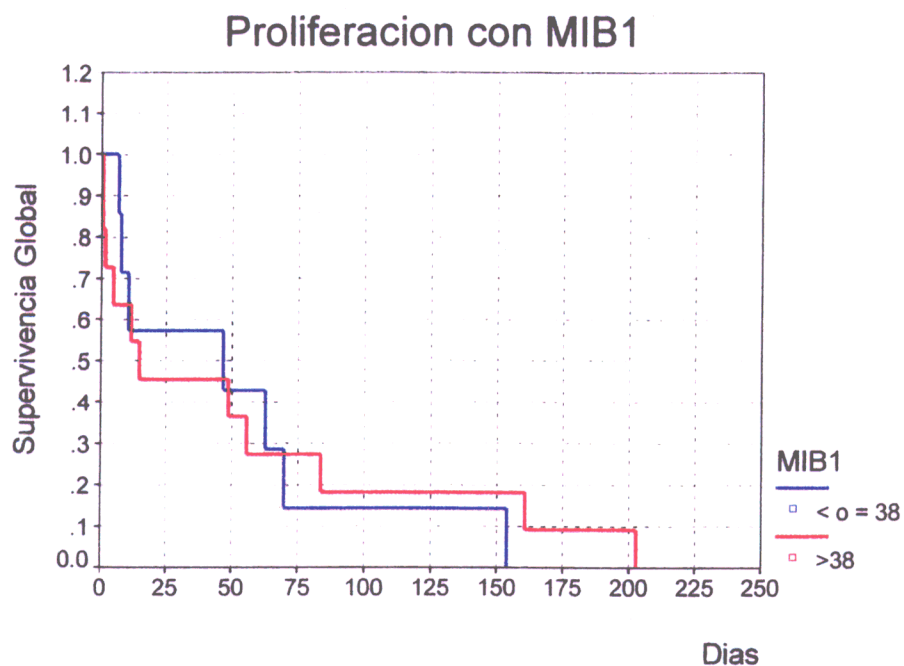


Figura 44: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global de los animales en función de la variable proliferación con MIB1; no hay diferencias significativas en la evolución de ambos grupos.

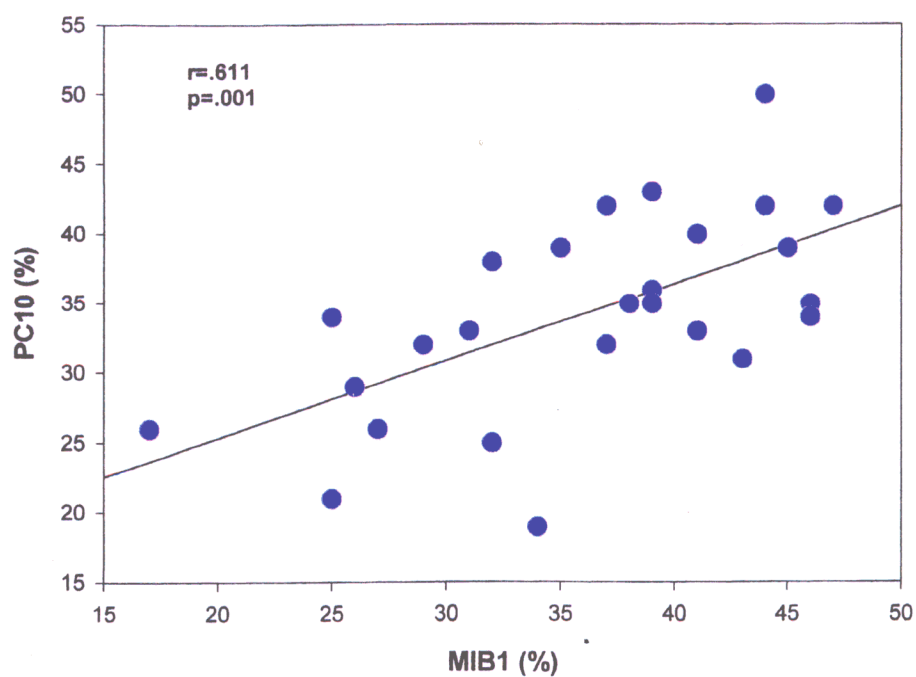


Figura 45: Relación entre los índices proliferativos del marcador PC10 y MIB1; existe correlación estadística con  $p=0.001$  y  $r=0.611$  con los métodos de Pearson, Kendall y Spearman.

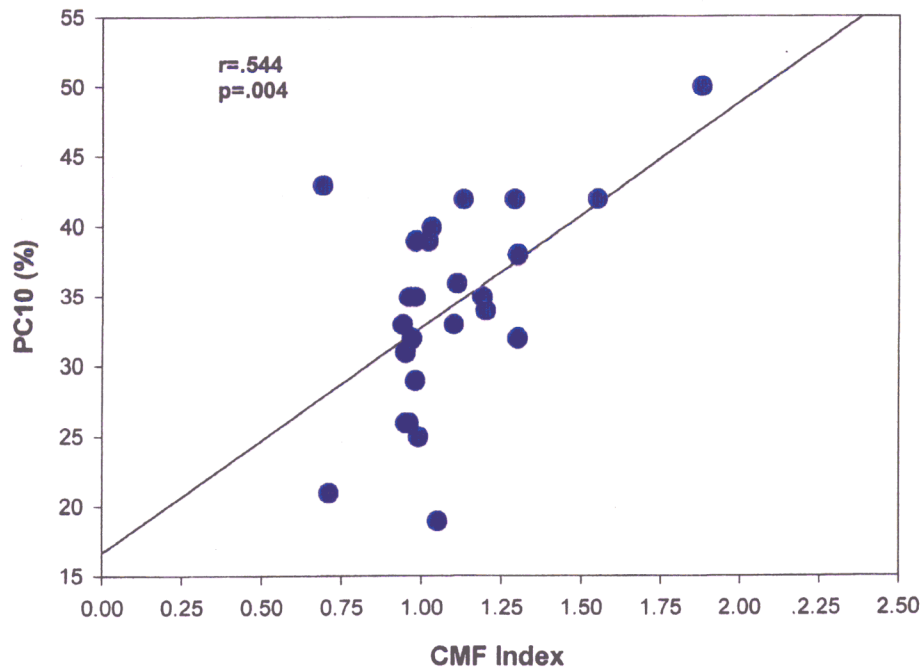


Figura 46: Correlación significativa entre el índice numérico de citometría de flujo con el índice proliferativo con el marcador PC10 con los métodos de Pearson, Kendall y Spearman.

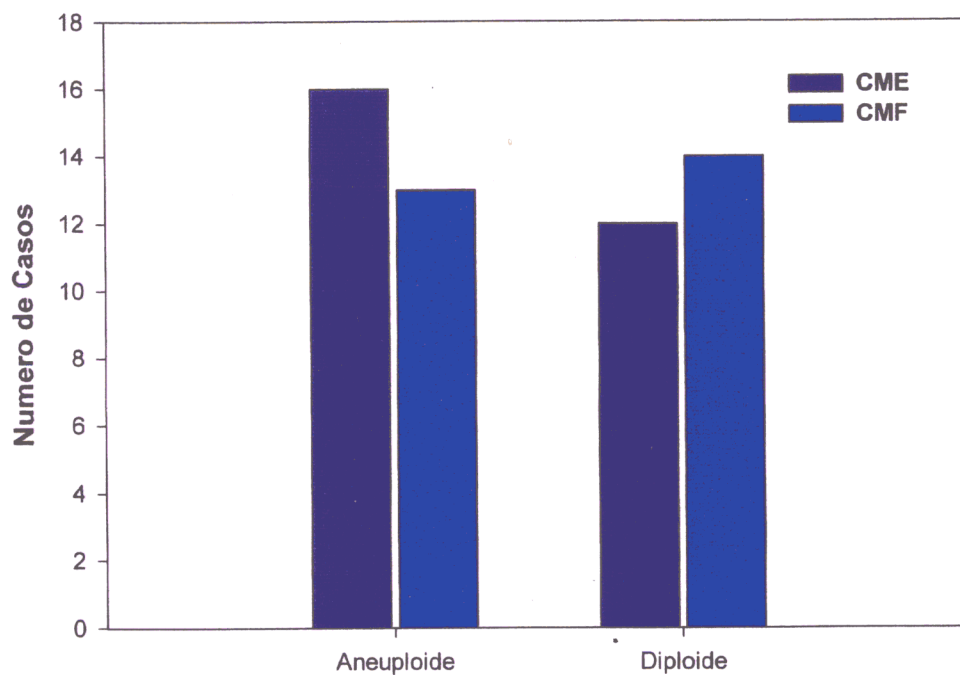
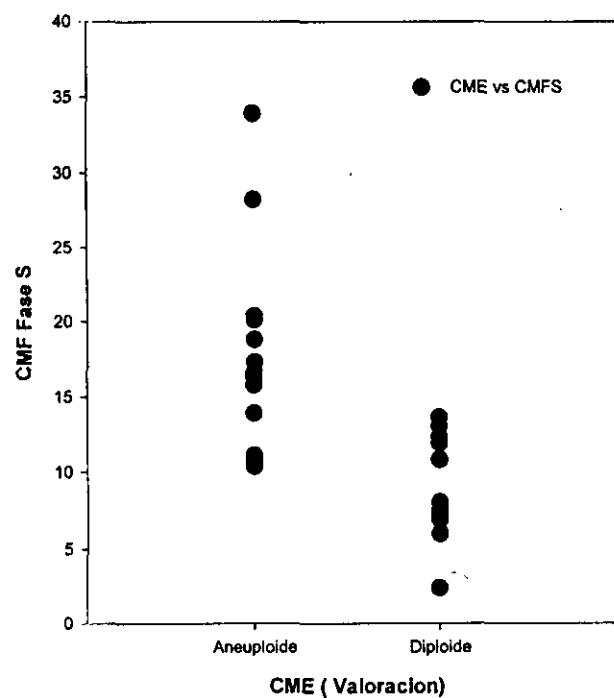


Figura 47: Representación gráfica con histogramas de la correlación estadística significativa entre citometría estática y de flujo con los métodos de Pearson, Kendall y Spearman.

## Fase S vs Valoración de CME



## Fase S vs Valoración de CMF

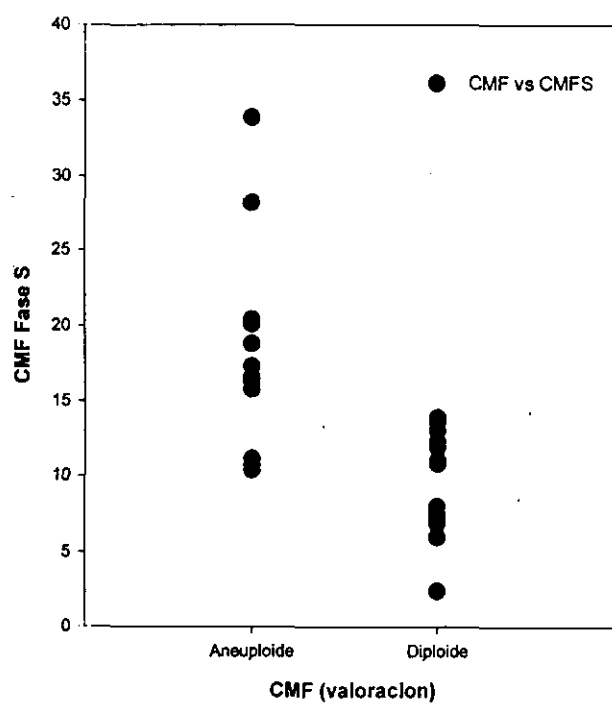


Figura 48: Correlación estadística de la fase S con ambos métodos citométricos con los métodos de Pearson, Kendall y Spearman. Se aprecia que en ambas citometrías, los valores bajos de fase S se agrupan en la columna diploide, y los valores altos en los aneuploides.

## **VI.- DISCUSIÓN**

## A.- CONSIDERACIONES GENERALES

A pesar de la baja frecuencia de los linfomas en el perro (menos de un 1% ó un 11-24% por cada 100.000 animales) [Moulton JE et al, 1990; Valli VEO et al, 1993] esta patología es de gran interés por su aumento creciente en los últimos años, tanto a nivel animal como humano. En el perro la etiología no es totalmente conocida; en el hombre se relaciona con los estados secundarios de inmunodeficiencia (SIDA y trasplantes [Rivas C et al, 1989; Albalade M et al, 1998]), hecho también aceptado en la especie felina por distintas virosis [Hardy Jr WD et al 1989; Moulton JE et al, 1990].

El presente trabajo representaba un reto dentro del estudio de la patología veterinaria ya que, por las características del tejido linfóide tanto en reacciones como en tumores, necesitaba un enfoque multidisciplinario. Este comprende, no sólo una correcta consideración morfológica macro y microscópica, sino inmunohistoquímica y dinámica global (proliferación y citometría) para relacionar de forma correcta los datos obtenidos con la clínica y evolución [Linden MD et al, 1992].

Para realizar las nuevas metodías (IHQ, ME y CITOMETRÍA) ha sido imprescindible un control minucioso de los tejidos afectados en todo su manejo, prefiriendo material reciente (no más de 4 horas post-mortem) y fijaciones inferiores a 48 horas en formol tamponado [Frierson HF, 1988; Kallionemi OP, 1988; Esteban JM et al, 1991; Frierson HF, 1991]. Como el tejido linfóide es muy lábil, presenta varios inconvenientes en estudios retrospectivos a la hora de trabajar con material postmortem, dado que a la posible autólisis puede añadirse una sobre fijación formólica con retracción tisular y celular, que dificulta una correcta tipificación histológica [Esteban JM et al, 1991; Alanen KA et al, 1993]. Cuidando además todos los pasos del proceso de inclusión en parafina, y controlando sobre todo la temperatura, se puede "a priori" asegurar un buen resultado en las técnicas especiales posteriores.

El material retrospectivo por tanto, no ha cumplido las exigencias requeridas y no ha respondido adecuadamente ante estas nuevas técnicas, siendo en ocasiones imposible tanto su tratamiento como la interpretación de los resultados. Así pues, las conclusiones se han basado sobre todo en el grupo obtenido de forma más correcta y homogénea -30 linfomas en perro y 8 en gato- recogidos en el periodo 1995-1997. Los 15 linfomas retrospectivos caninos del periodo 1987-1994 sólo han servido para verificar diagnóstico de neoplasias linfoides malignas difusas y para el estudio proliferativo.

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido reconsiderar y aceptar una clasificación de los linfomas caninos desde un punto de vista morfológico e inmunofenotípico, relacionando los datos con la agresividad, valorada con marcadores proliferativos. En patología humana, la controversia existente por la diferente semántica utilizada en los distintos subtipos, ha ocasionado durante muchas décadas un retraso en el entendimiento de estos tumores. La agrupación de subtipos diferentes como enfermedades idénticas por rasgos morfológicos celulares más o menos parecidos ha complicado la concepción patogénica, dado que las

evoluciones y las terapias no eran acordes. Las distintas clasificaciones (Rappaport, Lukes-Collins, Kiel, Working Formulation, REAL u OMS [Rappaport H, 1966; Lennert K et al, 1975; Lukes RJ 1975; Robb-Smith AHT et al, 1981; Lennert K et al, 1990; Harris N et al, 1993; Chan JK et al, 1994; WHO 1997]) demuestran una multitud de opiniones, pero para los estudiosos en linfomas son bastante unitarias y, gracias a las nuevas metodologías, se puede establecer la estirpe y la agresividad con mayor seguridad.

Dado que el alto y bajo grado morfológico de los linfomas B en la clasificación de Kiel se correlacionó con baja y alta agresividad clínica, nos ha parecido que este camino, la demostración de los distintos grados de agresividad, era quizás el más adecuado para la consideración del presente trabajo. Así pues este grupo ha quedado reducido a linfomas de alto grado, de celularidad blástica variable, nodales y extranodales [Lennert K et al 1990].

Es importante incluir en las clasificaciones las entidades extranodales que se empiezan a presentar en animales domésticos y, que en un principio no estaban contempladas por su poca frecuencia o rareza; algunas son de naturaleza B [Isaacson PG et al, 1983; Spencer J et al, 1986] pero hoy se conocen otras, por ejemplo las T de naturaleza CD8+, hoy incluidos como variantes T citotóxicas [WHO, 1997], algunas de células granulares [Franks PT et al, 1986; Wellman ML et al, 1989; Moore PF et al, 1994; French RA et al, 1996].

Con respecto a las clasificaciones histológicas de patología humana que se han asumido como correctas por la OMS [WHO 1997], y a su vez han sido adaptadas a patología veterinaria [Parodi AL, 1988; Carter RF et al, 1986; Greenlee PG et al, 1990; Teske E, 1993; Fournel-Fleury C et al, 1997]), es necesario puntualizar que:

- \* La mayoría de los blastos linfoides en perro son más pequeños que en el hombre, especialmente los inmunoblastos y los centroblastos tanto reactivos como tumorales [Carter et al, 1986; Teske E, 1993].
- \* La clara diferenciación entre IB y CB es dudosa en algunos casos, dato así mismo comentado en humanos y que ha llevado a considerar los linfomas de ambas células como "B de células grandes" [Lennert K, 1978; National Cancer Institute, 1982; REAL: Harris NL et al, 1993; Chan JK et al, 1994].
- \* En cualquier forma histológica, el sustrato acompañante es mucho más rico en plasmáticas que su homónimo en patología humana, hecho aún más llamativo en gatos [Feder BM et al, 1990; Hutson CA et al, 1991; Parodi AL et al, 1994; Poli A et al, 1994; Callanan JJ et al, 1996].

Estos hechos hacen difícil presuponer a priori una total correlación entre los subtipos caninos y humanos aunque se ha tratado de hacer una aproximación lo más acertada posible.

La morfología óptica de rutina permite un diagnóstico correcto del patrón nodular o difuso, la existencia o no de cielo estrellado, la blastosis celular y las mitosis. En muestras bien fijadas con buena citología añadida, proporciona un diagnóstico preciso.

La ME, abandonada por muchos patólogos en la actualidad, ha aportado grandes ventajas en el estudio morfo-citológico, sobre todo en ejemplos incorrectamente fijados, con lisis celular o artefacto de retracción (casos tratados con quimioterapia). Teniendo en cuenta la semejanza óptica y el alto grado de malignidad de toda la serie, la ultraestructura ha tenido un papel muy importante como complemento, detallando las características núcleo-citoplasmáticas de las células neoplásicas y ofreciendo así matices de diferenciación celular que permiten diferenciar IB de CB y LB. Se confirma pues, como ocurrió antes de la era inmunohistoquímica, que los hallazgos de ME aportan datos fidedignos, y que por ello ayudan en casos en los que la IHQ no ha podido realizarse o sus resultados no han sido completos [Henry K, 1975; Kaiserling E, 1977; Rivas C et al, 1980; Rozman C et al, 1993].

Hay que resaltar la importancia del inmunofenotipo, hecho ampliamente demostrado en patología veterinaria y humana. De un lado permite la exacta caracterización de la estirpe y con ello del pronóstico, y de otro la agresividad. Aunque se ha definido un peor pronóstico en los linfomas de naturaleza T (de forma global) y biología cambiante en los extranodales [Castrillo JM et al, 1992; Teske E, 1993; Teske E et al, 1994], en este estudio, estos hallazgos no han podido verificarse, quizás por el menor número de linfomas T en nuestra geografía y en la serie (20%), en contra de las referencias de distintos artículos de patología veterinaria, donde los linfomas T son mucho más frecuentes [Teske E et al, 1993]. Por ello, la correlación estadística no ha podido resultar significativa, otro hecho objetivo que denota la dificultad de comparación de forma absoluta de los linfomas de perro y hombre [Montalbán C et al, 1993; Teske E, 1993-1994 dos artículos].

Siguiendo con la IHQ, el inmunofenotipo tampoco es comparable al de los linfomas humanos ya que el número total efectivo de Ac Mo y Po parafinados ha sido mucho menor. Por ello distintos subtipos T o B han exhibido caracteres citológicos compartidos, lo que ha llevado al solapamiento de algunos casos, con dificultad de interpretación por la IHQ aislada (CB-IB-LB).

La inmunohistoquímica facilita la agrupación de subtipos por estirpe y agresividad [Linden MD et al, 1992], siendo fácil entender que los linfomas son nodales o extranodales, B, T o nulos, de alto, intermedio o bajo grado según los valores de los marcadores proliferativos. No se ha considerado la IHQ en congelación, comenzada en patología humana en 1981 (entonces las baterías de AcMo eran más específicas y numerosas, pero la visualización e interpretación de los resultados era difícil y con posibilidad de errores en muchos casos), aunque haya evolucionado mucho en la actualidad y existan mayor número de Ac anti Ag animales [Stein H, Mason DY, 1985; Teske E, 1993 y 1994; Fisher DJ et al, 1995; Rabanal RM et al, 1995].

Este trabajo se ha realizado sólo con material parafinado para unificar los hallazgos. Con los AcMo de parafina, cada vez más abundantes y específicos, los resultados han sido fiables y fácilmente valorables. Se han utilizado AcMo y Po humanos que producen reacción cruzada con antígenos animales y aún así ofertan buenas imágenes. El marcador T-CD3 se ha utilizado policlonal por su buena positividad en los linfocitos T animales. La estirpe B no cuenta con buenos marcadores monoclonales, pero el CD79a (clon HM57) y las cadenas ligeras policlonales Kappa y Lambda han sido satisfactorios (a pesar de lo publicado en patología veterinaria sobre todo con las cadenas ligeras policlonales [Breuer W et al, 1993; Teske E, 1993; Fisher DJ et al, 1995; Caniatti M et al, 1996]). El AcPo J-chain, no ha proporcionado positividad más que en plasmáticas, al contrario que en tejido humano, donde es capaz de teñir células B productoras de Ac, sobre todo las IB. De los AcMo histiocitarios, se ha desechado el CD68, de macrófagos, por la negatividad constante a pesar de los métodos recuperadores antigénicos por calor utilizados [Norton AJ et al, 1994; Butler D et al, 1997]. El MAC 387 y la proteína S-100 han detectado células de la estirpe HM en distintos momentos funcionales. Para resumir: el conocimiento del inmunofenotipo con CD79a y CD3 como batería rápida, es suficiente y fiable, algo ya plasmado en estudios anteriores [Milner RJ et al, 1996].

Otro de los objetivos ha sido probar y cuantificar la acción de los marcadores proliferativos sobre linfomas caninos. Este estudio biodinámico no ha presentado excesivos problemas, ya que dichos marcadores MIB1 y PC10, se han conservado intactos en la mayoría de los casos, incluso en los expuestos a una sobrefijación, sobre todo el MIB1. Por la cinética y clínica, todos los casos han sido de alto grado.

Parece conveniente recordar aquí que tanto en perro como en gato hay ocasiones en las que un linfoma, por su alta actividad proliferativa se presenta de inicio con extensión periférica. Este hecho señalado también a nivel humano [Suchi T et al, 1979] sirve para hacer énfasis en la dificultad de distinguir entre leucemia con afectación ganglionar múltiple o linfoma con extensión a MO y sangre; son los casos denominados leucemia-linfoma, ya que no es posible la distinción entre una y otro, y que entrañan un pronóstico desfavorable [Suchi T et al, 1979; Rosemberg MP et al, 1991; Dobson JM et al, 1993; Morris JS et al 1993].

Otro hecho para comentar es la idea de estudiar como "controles" un grupo de linfomas de gato, de etiología conocida y aceptada, comparados a su vez con ganglios felinos reactivos inespecíficos o en animales portadores del FeLV. No nos parece posible hacer comparación entre ambas especies. De un lado los ganglios reactivos inespecíficos pueden ser semejantes, pero los portadores de FeLV muestran mayor plasmocitosis y linfocitosis intrasinusal difícil de valorar [Feder BM et al, 1990; Hutson CA et al, 1991; Parodi AL et al, 1994; Poli A et al, 1994; Callanan JJ et al, 1996]. Los linfomas felinos difieren en subtipo histológico, inmunofenotipo, ME, proliferación y ciclo celular. La morfología recuerda a los LNH en inmunosuprimidos [Rivas C, 1989; Albalade M et al, 1998] y los ganglios pueden afectarse de forma total o parcial, planteando en el segundo caso problemas de diagnóstico diferencial con reacciones benignas.

## B.- CONSIDERACIONES DEL GRUPO DE ESTUDIO

La edad de presentación no ha resultado tener valor pronóstico, siendo las que más se repiten doce y diez años, aunque el rango general se mueve entre los dos y los doce años.

El sexo del animal ha seguido la proporción 2:1 de machos frente a hembras, aunque las curvas de supervivencia de los dos grupos no mostraron diferencias significativas, por lo que la variable sexo no es factor pronóstico en esta serie, dato que ya se había comentado con anterioridad en la bibliografía [Teske E, et al, 1994].

La raza tampoco ha mostrado diferencias significativas ni en cuanto a la presentación ni a la supervivencia; ha habido marcadas diferencias en las frecuencias, quizás más atribuible a modas sociales que a factores genéticos en sí [Teske E et al, 1993-1994].

Los valores de la analítica sanguínea y bioquímica no han sido de utilidad para el diagnóstico [Dobson JM et al, 1993].

El estadio clínico ha sido expresado bajo el perfil médico y veterinario, ya que según los resultados evolutivos en medicina humana ante la afectación del bazo y el hígado, el pronóstico es diferente [Carbone PP, 1971]. En esta serie, con sólo bazo afecto e hígado libre de enfermedad, la evolución ha sido más favorable, por lo que deberían definirse por separado los casos con y sin afectación hepática (diferencias estadísticamente significativas con  $p=0.0002$ ). Cabe destacar la alta frecuencia de estadio V (IV en medicina humana) al diagnóstico, datos semejantes a los publicados [Dobson JM et al, 1993; Teske E et al, 1994]. Sería por tanto, necesario el desarrollo de distintos métodos de diagnóstico precoz como citología y aspiración [Hawkins EC et al, 1993] como medida inicial, dado que por la rápida progresión del linfoma y estadios tan avanzados el tratamiento paliativo con quimioterapia tiene poca utilidad.

El estudio necrópsico corrobora la extensión generalizada; según el baremo veterinario, veinte casos mostraron E-V, cuatro E-IV y ningún caso E-III o inferiores (el 80% fueron linfomas multicéntricos, de los cuales el 13.3% tuvo afectación leucémica como forma clínica principal; 13.3% presentó linfomas con la forma mediastínica de naturaleza T, y sólo el 6.6% fueron linfomas extranodales). Sólo en cuatro casos han existido tumores de otra estirpe, por lo que se considera independiente a la presentación del linfoma. Según el estadiaje de medicina humana, que separa la afectación esplénica y hepática, se encontraron cinco casos con afectación ganglionar y esplénica (E-III), y el resto tuvo, además, afectación hepática o de otros órganos (E-IV). En esta serie de tumores el estadio clínico al diagnóstico tiene valor pronóstico (con significación estadística;  $p=0.0009$ ), por la superior supervivencia del estadio III frente al IV, lo que ha coincidido con una diseminación generalizada con peor evolución.

El tipo de respuesta al tratamiento COP no ha sido un dato valorado en sí, sino como una variable para poder clasificar los linfomas en función de su comportamiento clínico con respecto a un protocolo común. La respuesta ha sido uniforme: en la mayoría de los casos se produce una remisión total en el periodo de inducción para luego recaer en el mantenimiento, comportamiento habitual en los linfomas agresivos [Vicente J, 1980; Teske E et al, 1993; Armitage JO, 1993; Teske E et al, 1994]. Aún así la diferencia entre la supervivencia de los animales tratados frente a los no tratados fue claramente significativa ( $p=0.0009$ ), por lo que parece conveniente considerar la variable tratamiento como factor pronóstico, pese a sus limitados resultados. En la práctica de esta serie, el tratamiento no ha variado la supervivencia global en más de 203 días; esto contrasta con los datos publicados en veterinaria sobre supervivencias medias de un linfoma tratado con quimioterapia, de 8 meses aproximadamente [Teske E et al, 1990; Teske E et al, 1993; Rosenthal RC et al, 1995; Hardy WD et al, 1989]. Esto podría deberse al estadio tan avanzado de la enfermedad al diagnóstico, o también a la falta en su composición de la adriamicina como principal droga frente a los procesos linfoproliferativos, descrito en medicina humana [Díaz Rubio E et al, 1991; González Barón M, 1992; España P, 1993; Wilson WH et al, 1998]. Como conclusión, en esta serie no se puede saber si la respuesta al tratamiento es o no dependiente del grado histológico de malignidad [Teske E et al, 1994]. Dada la ausencia de subtipos de bajo grado que ofrecieran otro patrón de respuesta y en número suficiente, no se pueden comparar resultados.

Desde un punto de vista morfológico, todos los casos estudiados han sido linfomas no Hodgkin de alto grado -LNH- [Maeda H et al, 1993], con una proporción alta de inmunoblásticos IB (33.3%) y linfoblásticos LB (43.3%), mostrando los centroblásticos menor porcentaje (16.6%); sólo ha habido dos casos de linfomas extranodales (6.6%). Estos resultados en morfología no concuerdan con la mayoría de los datos publicados anteriormente en patología veterinaria canina, donde se describen todos los subtipos histológicos de la clasificación de Kiel (alto, intermedio y bajo grado), aunque predomina el alto grado [Parodi et al, 1988; Moulton JE et al, 1990; Teske E, 1993; Teske E et al, 1993; Valli VEO et al, 1993], aunque sí coincide con otros [Dobson JM et al, 1993]. El subtipo histológico no ha sido un factor pronóstico en sí, sino el grado de malignidad según la clasificación de Kiel, dato que coincide con lo anteriormente publicado al ser todos linfomas de alto grado [Teske E, 1993]. La morfología de los casos felinos control no ha coincidido con la presentada en el perro, ya que el gato FeLV+ parece compartir una morfología compatible con "centroblástico polimorfo" en la mayoría de casos, ya definida por otros autores [Teske E et al, 1993; Fournel-Flury C et al, 1997].

En nuestra serie los casos con positividad al virus de la leucemia felina FeLV+ han presentado una morfología de predominio immuno-plasmablastico, que recuerda a las neoplasias B humanas en estados de inmunodeficiencia adquirida SIDA y trasplantes [Rivas C, 1989; Spodnick GJ et al, 1992; Cui LX et al, 1995; Albalade M et al, 1998].

Con respecto a la estirpe tumoral, el 80% de los linfomas caninos ha sido de naturaleza B, y el 20% de naturaleza T, frecuencias diferentes a las citadas en bibliografía [Teske E et al, 1993]. En los gatos control 3/8 fueron B (37.5%) y 5/8 T (62.5%). No se ha podido encontrar valor pronóstico de la variable inmunofenotipo en esta serie por el escaso número de casos T para confrontar resultados.

El patrón de crecimiento ha sido difuso en todos los casos, a excepción de uno con patrón parcialmente nodular (posible CB post CB-CC). El patrón de cielo estrellado (respuesta fagocitaria de los histiocitos a una tasa elevada de muerte celular o apoptosis) se ha encontrado en todos los subtipos celulares, aunque más frecuente en el subtipo linfoblástico, como se describe en patología humana [Lennert K, 1978; Rivas C et al, 1980]. El cielo estrellado no guarda relación directa ni con la histología ni con el número de mitosis por campo, dato anteriormente publicado [Teske E et al, 1993].

La ME se correlacionó con la óptica, mostrando en general rasgos comunes con cambios celulares polimorfos con inmunoblastos y plasmáticas, o caracter blástico mediano poco diferenciado. Como hallazgos especiales nucleares y celulares los signos de apoptosis, la segregación nucleolar y los "cuerpos nucleares" no son específicos; podrían indicar activación nucleolar máxima, signos tóxicos y morfología de muerte programada, que en estos tumores no ha sido exagerada.

## C.- CONSIDERACIONES BIODINÁMICAS

Existe una correlación precisa entre la óptica de alto grado encontrada y la proliferación [Fournel-Fleury C et al, 1997]. Ambas ciclinas muestran una clara positividad, que ha sido evaluada cualitativa y cuantitativamente. El Ac MIB1 combinado con recuperación antigénica por calor [Norton AJ, Jordan AS et al, 1994; Butler D et al, 1997] mejora notablemente la positividad, de forma independiente al tiempo de fijación, así que debe anteponerse al PC10. La distribución del marcaje es más fiable en el MIB1 ya que perfila la disposición cromatinica y nucleolar del núcleo, mientras que el patrón de tinción con PC10 ha sido más homogéneo e indefinido.

Los valores proliferativos limite para los rangos de agresividad han seguido el patrón aplicado en patología humana [Rivas C et al, 1992]: menos de 15%, entre 15 y 25 y más de 25% para grados bajo, intermedio y alto respectivamente; aunque también se ha tenido en cuenta lo anteriormente publicado en patología veterinaria [Fournel-Fleury C et al, 1997] en la que se utiliza como valor limite entre bajo y alto grado un 21%. Según esto todos los linfomas de esta serie corresponden al alto grado de malignidad.

Los valores proliferativos obtenidos con ambos marcadores han sido cualitativamente iguales, aunque los valores cuantitativos absolutos cambien y fueron similares a nuestra experiencia previa en linfomas humanos [Marcos et al, 1993]. Se puede establecer una relación entre valores obtenidos con un mismo marcador, pero no con los valores obtenidos a partir del otro. De la misma forma, los valores PC10 y MIB1

fueron similares para cada caso de linfoma canino, felino y ganglio reactivo.

El valor proliferativo global en linfomas caninos y grupos control ha sido inferior al encontrado en los mismos subtipos en patología humana [Piris et al, 1988; Marcos et al, 1993; Obeso et al, 1994]. Hay que añadir además que la proliferación global de los subtipos linfoblásticos no fue superior a los del grupo CB-IB (en patología humana la proliferación en el linfoblástico tipo Burkitt está próxima a 90%-100%; [Piris et al, 1988]). Estas variaciones pueden deberse a la mayor especificidad para Ag humanos, o bien a problemas técnicos relacionados con la sobreexposición del material con tinciones débiles o muy fuertes, cuya valoración con el analizador de imagen se ha limitado por las características que para la misma exige el aparato, y que posteriormente se comentan [Crocker J, 1993].

Existe una buena correlación entre ambos marcadores proliferativos PC10 Y MIB1 [Sabattini E et al, 1993], aunque nos parece, como ya se ha comentado parcialmente, que es preferible el MIB1 por su mejor respuesta IHQ: mejor patrón de tinción, independencia al tiempo de fijación en formol y se comporta mejor con la olla a presión como método recuperador antigénico [Sabattini E et al, 1993; Mazerolles C et al, 1994; Ostrowski M et al, 1995]. No existieron diferencias significativas de forma global entre los valores proliferativos con ambos marcadores, según los distintos baremos considerados (subtipo histológico, inmunofenotipo, tiempo de fijación, etc...), pero el marcador más estable a cualquier cambio en el manejo ordinario de la metodología ha sido el MIB1, por lo que opinamos debe ser el marcador proliferativo de elección [Gerdes J, Dallenbach F et al, 1984; Gerdes J, Lemke H et al, 1984; Gerdes J et al, 1991; Gerdes J et al 1993; Ross W et al, 1995].

Sin embargo un dato importante encontrado ha sido poder relacionar el valor proliferativo con el marcador PC10 como factor pronóstico desde un punto de vista estadístico frente a la supervivencia global. Se define así con el valor del PC10 superior o igual a 34%, un grupo de alto riesgo dentro de la población total. Creemos que este hallazgo podría constituir el punto base para la aplicación de protocolos de quimioterapia más agresivos, como viene haciéndose en medicina humana.

Para un completo entendimiento del método de valoración cuantitativa parece necesario comentar el tipo de funcionamiento que tiene el programa "proliferation index" del analizador de imagen CAS-200. Está preparado para captar el contraste entre dos colores con longitudes de onda opuestas, como son el marrón y el verde. El marrón indica la positividad a Ac por revelado con diaminobenzidina; el verde debe ser el color de elección de contraste en el campo de la preparación de IHQ. El problema puede surgir al utilizar la hematoxilina como método de contraste rutinario, ya que la técnica de tinción verde de metilo suele ser larga y pesada; esta hematoxilina debe ser muy débil para evitar la formación de falsos positivos, ya que un azul muy intenso podría confundir al sensor, y al estar el azul más próximo en la escala de colores, podría captarse como un positivo final.

En esta serie se han realizado contrastes débiles a mano (el inmunoteñidor suele contrastar intensamente por gusto del patólogo) para evitar estos problemas de manejo e igualar los resultados al verde de metilo requerido, ajustando adecuadamente los umbrales nucleares negativos y positivos. Las mediciones deben realizarse siempre por la misma persona para evitar cambios subjetivos en dichos umbrales que modifiquen considerablemente los resultados finales de la serie. También el tipo de funcionamiento de este programa puede explicar la variación de valores entre ambos marcadores proliferativos, constatada ya en la bibliografía [Wied GL et al, 1989; Hall P et al, 1990; Waseem NH et al, 1990].

El tipo de tinción del PC10 es continuo y homogéneo, por lo que es captado por el sensor del analizador como un área completa circular [Sebo TJ et al, 1993]. El MIB1 marca el núcleo de forma discontinua, dibujando la cromatina marginada a la membrana nuclear, por lo que el sensor no capta un círculo positivo sino, en ocasiones, una circunferencia. Esto hace que el área total positiva del MIB1 sea menor en valor absoluto que la del PC10, y también explique la diferencia del valor captado a simple vista por el ojo humano, a la expresada por el ordenador.

La parafina y los tejidos postmortem no han supuesto ningún problema para los resultados de ambas técnicas citométricas [Frierson HF, 1988; Kallionemi OP, 1988; Frierson HF, 1991]. Requiere prestar especial atención al tiempo de fijado en formol [Esteban JM et al, 1991], revisar las piezas con microscopía óptica para elegir un bloque adecuado, tiempo de recogida de muestras inferior a 5 horas después de la muerte del animal [Alanen KA et al, 1993] y un desparafinado intensivo.

La frecuencia de aparición de aneuploidía fue de un 44% con CMF y de un 56% con CME, un tanto superiores a lo estudios previos en linfomas caninos y humanos [Teske E et al, 1993] pero podría deberse a la constitución del grupo por linfomas de alto grado en su totalidad.

La aneuploidía no se ha relacionado con los altos valores proliferativos ni la diploidía con los bajos como ya lo han expuesto otros autores ([Bauer TW et al, 1990; Minke JM et al, 1990; Teske E et al, 1993; García R et al, 1994]). Tampoco guarda relación con el alto grado citológico presente en esta serie, dato estudiado con anterioridad [Rutteman GR et al, 1988; Bauer TW et al, 1990; Minke JM et al, 1990; Rutteman GR et al, 1991; Teske E et al, 1993; García R et al, 1994]. Si existe correlación estadística entre el índice de proliferación del marcador PC10 y el índice numérico del contenido de ADN por citometría de flujo.

La fracción en fase S presente en CMF no se relaciona con ningún otro parámetro como cabría esperar (proliferación [Woods AL et al, 1991; Teske E et al, 1993; Wojcik EM et al, 1993; Ostrowski M et al, 1995], ploidia [Frierson HF, 1991; Scanziani E et al, 1991; Ostrowski M et al, 1995]); no guarda relación ni con la proliferación con MIB1 y PC10, ni con la ploidia con ambos métodos citométricos [Teske E et al, 1993]. De los 8 valores de fase S alta, 7 fueron aneuploides y 1 diploide con fase S alta, pero no se puede establecer

una correlación estadística por tratarse de un número pequeño de casos. Sin embargo la aneuploidía parece ser un marcador bastante fiable de alteraciones citogenéticas [Seckinger D et al, 1989; Minke JMHM et al, 1990; García R et al, 1994; Obeso G et al, 1994].

La tasa proliferativa parece aproximarse más a la agresividad tumoral que la fase S, ya que si parece presentar un valor intermedio-alto que guarda relación con el alto grado citológico presente en esta serie [Woods AL et al, 1993]. Sólo parte de estos casos presentan un alto valor de fase S [García R et al, 1994; Obeso G et al, 1994]. Un dato indiscutible es que los marcadores MIB1 y PC10 marcan más células en el tejido que el % expresado por la fase S de FCM [García R et al, 1994; Obeso G et al, 1994].

Existe muy buena correlación entre ambos métodos citométricos [Bowman R et al, 1993; Claud RD et al, 1993; Marcos B et al, 19980; Wojcik EM et al, 1993] por lo que pueden considerarse homólogos (coincidencia de valores en 22/25 casos).

La citometría estática CME es un método eficaz para el estudio del ADN [Boudry C et al, 1989; Wojcik EM et al, 1993]. Comparada con la citometría de flujo, como se detalla en la tabla IX [Claud RD et al, 1989; Marcos B et al, 1997], es un método muy sencillo de manejar que requiere muy poco material (500 células frente las 10000 necesarias en CMF con el consiguiente ahorro del mismo. El uso de material parafrinado no interfiere en los resultados de ambas técnicas, aunque hay que considerar que los coeficientes de variación establecidos para CMF en fresco aumentan, y en CME son difícilmente valorables por tratarse de gráficas continuas de menor resolución (en las que no son claramente diferenciables los distintos periodos del ciclo celular) aunque los resultados finales sean igualmente fiables a los de CMF. Antes de medir las células, como la imagen captada del microscopio queda digitalizada, permite elegir las células conservadas, clasificarlas en función de su forma o tamaño, eliminar núcleos rotos, debris, dobletes, tripletes, células inflamatorias, etc..., algo no posible con CMF, porque toda la solución se analiza al mismo tiempo. Es importante sobre todo en tumores heterogéneos, con apoptosis o necrosis en los que es necesario escoger las células a analizar [Boudry C et al, 1997]. Se pueden identificar poblaciones aneuploides pequeñas inmersas en una gran población diploide, que pueden pasar desapercibidas en FCM [Claud RD et al, 1989].

En la serie considerada, y tal vez por el número de los casos, no se ha podido establecer diferencias estadísticamente significativas entre las distintas morfologías celulares con el resto de los parámetros considerados, sobre todos los dinámicos. Al tratarse de linfomas de alto grado en su totalidad, han presentado valores medios similares en proliferación, ploidía, estadio clínico, comportamiento (con o sin tratamiento) y supervivencia, considerados individualmente, por subtipos o en total.

En cuanto a que todos los casos sean de alto grado, y a pesar que algunas publicaciones también apuntan a la mayoría de linfomas agresivos animales, no se puede infravalorar el hecho de que probablemente en series mayores tal vez se podría haber encontrado algún caso de linfoma de bajo grado [Carter RF et al, 1986;

*Parodi AL, 1988; Greenlee PG et al, 1990; Teske E, 1993; Fisher DJ et al, 1995; Fournel-Fleury C et al, 1997].* Por otra parte y conociendo que cualquier linfoma poco agresivo dejado a su evolución natural puede cambiar a un alto grado, [*Lennert K et al, 1978*], tal vez la sintomatología que lleva a consulta a los perros portadores de linfomas ocurre en estados muy avanzados, cuando ya han pasado a ser agresivos, quizás por una mayor tolerancia del animal a neoplasias de bajo grado o intermedio.

La necesidad de un diagnóstico precoz [*Carter RF et al, 1986; Carter RF et al, 1988; Jacobs RM, 1988; Hawkins EG et al, 1993; Fisher DJ et al, 1995; Caniatti M, et al, 1996*] con promoción de los métodos citológicos y biópsicos se perfila como imprescindible en esta patología porque con estadios tan avanzados el tratamiento paliativo con quimioterapia tiene poca utilidad. Por otra parte habría que concienciar al dueño de la realidad de un animal geriátrico, donde la aparición de cualquier masa ganglionar debe ser consultada.

## **VII.- CONCLUSIONES**

1. Todos los linfomas caninos estudiados son LHN de alto grado.
2. El estadio tumoral necrópsico corrobora la extensión avanzada por la afectación de: 20 casos en estadio V, 6 en estadio IV y ningún caso en estadio III (26 casos necropsiados: 23 multicéntricos, 5 tímicos, 1 cutáneo y 1 intestinal). Con el estadiaje humano, 21 presentaron un estadio IV y 5 un III.
3. La macroscopía de los órganos hematopoyéticos (ganglio, bazo, médula e hígado) demuestra organomegalia difusa, sin tumor ni único ni múltiple. La presentación extranodal cutánea e intestinal exhibió tumores nodulares macroscópicos.
4. La citología no es totalmente superponible a los subtipos humanos, por lo que las clasificaciones aplicables a los animales deberían ser simplificadas.
5. Desde el punto de vista citológico se han encontrado subtipos linfoblásticos (43.33%), inmunoblásticos (33.33%) y menor cuantía de centroblásticos (16.66%) y extranodales (6.66%). Para la subtipificación ha sido imprescindible la ME, aunque aisladamente no existen caracteres ultraestructurales específicos de malignidad linfoide.
6. Los linfomas caninos son en su mayor parte de naturaleza B (80%) existiendo sólo un 20% de neoplasias T. Veintiocho casos fueron nodales (93.33%) y 2 extranodales (6.6%). El panel de anticuerpos humanos utilizados, de fácil adquisición y apto para material parafinado, ha mostrado resultados satisfactorios.
7. En relación con la agresividad neoplásica comprobada por la morfología y el estudio con marcadores proliferativos, con el marcador MIB1 sólo el linfoma cutáneo fue de grado intermedio y el 96.66% restante de alto grado. Con el PC10 un caso de linfoma IB tuvo agresividad intermedia y el resto de linfomas fue de alto grado. Este hecho difiere de otros estudios previos, que consideran subtipos de alto, bajo y grado intermedio.
8. El estudio del ciclo celular con citometría demostró aneuploidía en 53.3% de los casos con CME y en 43.3% con CMF. La ploidía no se correlaciona con los subtipos histológicos, es común y uniforme en todos los casos y se confirma como un factor de agresividad. Ambas técnicas citométricas son homólogas, con una correlación de 0.8 y un nivel de significancia de 0.01. La fase S no guarda relación con ninguno de los parámetros estudiados, por lo que se considera una variable independiente. Sólo se relaciona con la definición de aneuploidía.
9. En estadios IV la afectación hepática demostró ser estadísticamente significativa como signo de mal pronóstico ( $p=0.0009$ ). Por ello, se debería pensar considerar bazo e hígado por separado en el estadiaje.

10. El factor tratamiento con quimioterapia mejoró estadísticamente la supervivencia global de los animales ( $p=0.0002$ ).
11. Los altos valores de la proliferación con el marcador PC10 resultaron ser un signo de mal pronóstico con significación estadística ( $p=0.017$ ), incluso dentro del grupo de animales tratados con quimioterapia ( $p=0.016$ ). El valor proliferativo del marcador MIB1 no es pronóstico desde el punto de vista estadístico.
12. Existe correlación estadística entre los valores de proliferación obtenidos con ambos marcadores (correlación de 0.6, nivel de significancia 0.01). El MIB1 muestra mejor patrón de tinción IHQ, mayor independencia a la fijación y mejor respuesta al tratamiento por calor como recuperador antigénico. No hay correlación estadística entre la proliferación y el grupo histológico. El índice proliferativo con PC10 tiene correlación estadística con el índice numérico de ADN (CMF) ( $p=0.54$ ; nivel de significancia 0.01).
13. No se encontró valor pronóstico a las variables edad, raza, sexo o inmunofenotipo, seguramente debido al pequeño tamaño de esta serie.
14. Los controles felinos no deben utilizarse como comparativos ya que difieren en subtipo histológico, inmunofenotipo, ME y ciclo celular. La morfología recuerda a los LNH secundarios a inmunodeficiencia.
15. El mal pronóstico de la enfermedad en pequeños animales, con o sin terapia, en los casos tan avanzados sirve para enfatizar la necesidad de un diagnóstico precoz.

## **VIII.- BIBLIOGRAFÍA**

- Abbott CD.** An evaluation of immunocytochemical detection system using prediluted antibodies on an automated immunostainer. *J Cell Pathol* 1997;2:155-158.
- Alanen KA, Joensuu H, Klemi PJ.** Autolysis is a potential source of false aneuploid peaks in flow cytometric DNA histograms. *Cytometry* 1989;10:417-425.
- Alanen KA Joensuu H, Klemi PJ.** DNA content analysis of fine needle aspirates obtained from lymphatic tissue. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:259-264.
- Albalade M, Gómez-Octavio J, Seguera P, Caramelo P, Rivas F, Rivas C, Casado S, Plaza JJ.** LNH de alto grado en trasplante renal. Estudio de cuatro casos. *Rev Clin Esp* 1998 (En prensa).
- Armitage JO.** Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma. *New England J Med* 1993;328:1023-1030.
- Baker JL, Scott DW.** Mycosis fungoides in two cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1989;25:97-101.
- Banks WJ.** Lymphatic System and Immunology, en: "Applied Veterinary Histology", pp. 277-297. Ed. Mosby. St Louis, London, Toronto, 1993.
- Banks WJ.** Hematopoiesis, en: "Applied Veterinary Histology", pp.155-162. Ed. Mosby. St Louis, London, Toronto, 1993.
- Banks WJ.** Blood, en: "Applied Veterinary Histology", pp.142-154. Ed. Mosby. St Louis, London, Toronto, 1993.
- Barcos MP, Lukes RJ.** Malignant Lymphoma of convoluted lymphocytes. A new entity of possible T-cell type. Conflicts in childhood cancer. Progress in clinical and biological research, pp.147-178. Editores: Dinks LF, Godden JO. Liss New York 1975.
- Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MG, Suit PF, Gephardt U, Levin HS.** A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1990;93:322-326.
- Böcking A, Giroud F, Reith A.** Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization diagnostic DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;17:1-7.
- Boudry C, Herlin P, Coster M, Sola B, Chermant JL.** Influence of debris and aggregates on image cytometry DNA measurement of archival tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 1997;19:153-157.
- Bowman R, Kanacki ZA, Garberoglio C, Chase DR.** Comparison between image and flow cytometry. A priori factors that influence technique. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;17:276-283.
- Braylan RC.** Flow-cytometric DNA analysis in the diagnosis and prognosis of lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1993;99:374-380.
- Breuer W, Colbatzky F, Platz S, Hermmans W.** Immunoglobulin-producing tumours in dogs and cats. *J Comp Pathol* 1993;109:203-216.
- Buracco P, Guglielmino R, Abate O, Bocchini V, Cornaglia E, DeNicola DB, Cilli M, Ponzio P.** Large granular lymphoma in a FIV-positive and FeLV-negative cat. *J Sm Anim Pract* 1992;33:279-284.
- Burg G, Braun-Falco O.** Cutaneous Lymphomas. pp. 95-216. Ed. Springer Verlag. Berlin 1983.
- Burger PC, Shibata T, Kleihues P.** The use of the monoclonal antibody Ki67 in the identification of proliferating cells. *Am J Surg Pathol* 1992;10:611-617.

- Butler D, McDennott N, Milburn C, Kay E, Walsh CB, Leader M.** Pressure cooking as an antigen retrieval technique raises certain practical considerations unique to this method. *J Cell Pathol* 1997;2:127-131.
- Callanan JJ, Jones BA, Irvine J, Willett BJ, McCandlish IAP, Jarrett O.** Histologic classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections. *Vet Pathol* 1996;33:264-272.
- Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF.** Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol* 1996;33:204-212.
- Carbone PP, Kaplan HS, Mussof F, Smithers DW, Tubiana R.** Report of the committee on Hodgkin's disease staging procedures. *Cancer Res* 1971;31:1860-1861.
- Carrasco JL.** El método estadístico en la Investigación Médica. 291-293. Ed Ciencia Tres, 1989.
- 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* 1986;50:154-161.
- Carter RF, Valli VEO.** Advances in the cytologic diagnosis of canine lymphomas. *Semin Vet Med Surg (Small Animal)* 1988;3:167-175.
- Castrillo JM, Rivas C.** Linfomas del tejido linfóide asociado a mucosas y sus neoplasias. *Rev Clin Esp* 1990;187:213-214.
- Castrillo JM, Montalbán C, Obeso G, Piris MA, Rivas C.** Gastric B-cell mucosa Associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. A clinicopathological study. *Gut* 1992;33:1307-1311.
- Cattoretti G, Becker M, Key M, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J.** Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168:357-363.
- Claud RD, Weinstein RS, Howedy A, Straus AK, Coon JS.** Comparison of image analysis of imprints with flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. *Mod Pathol* 1989;2:463-467.
- Chan JK, Banks P, Cleary ML, Delsol G, De Wolf Peeters Ch, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, Jaffe ES, Knowles DM, Mason DY, Müller Hermelink HK, Pileri S, Piris MA, Ralfkier E, Stein H, Warnke RA.** A proposal for classification of lymphoid neoplasms (by the International Lymphoma Study Group). *Histopathol* 1994;25:517-536.
- Cotran R, Coumar V, Robbins SL.** Pathologic basis of disease. pp. 250-316. Ed. McGraw Hill Interamericana. New York 1990.
- Couto CG.** Canine lymphomas: something old, something new. *Compendium of Continuing Education* 1985;7:291-298.
- Couto CG, Rutgers HC, Sherding RG, Rojko J.** Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *J Vet Int Med* 1989;3:73-78.
- Couto CG and Hammer AS.** Diseases of the lymph node and the spleen. Chapter 144. pp 1930-1946. in: Ettinger SJ and Feldman EC. Textbook of veterinary internal medicine. Ed. Saunders. Philadelphia 1995.
- Crocker J.** The cell cycle, mitosis and their conventional correlates in lymphomas. pp. 31-44. en: Cell

proliferation in lymphomas. Ed. J. Crocker. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London. Edinburgh. Boston. Melbourne. Paris. Berlin. Viena. 1993.

Crow SE. Lymphosarcoma in the dog: diagnosis and treatment. *Compendium of Continuing Education* 1982;4:283-288.

Cui LX, Ikenami M, Katano H, Takanashi M, Machinami R, Mori S. Immunoglobulin idiotypic specificity of AIDS-associated lymphomas and their experimental model. *Pathol International* 1995;45:375-382.

Day MJ. Immunophenotyping characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. *J Comp Pathol* 1995;112:79-96.

Delverdier M, Buchet B, Haverbeke G. Histologie et cytologie des lymphomes malins canins. Etude comparative des classifications actuelles. *Rev Med Vet* 1988;139:1441-1150.

Díaz Rubio E, Cortés-Funes H, Vicente J. Controversias en Oncología 101-119. Ed Farmitalia. Barcelona. España, 1991.

Dobson JM, Gorman NT. Canine multicentric lymphoma. 1: Clinico-pathological presentation of the disease. *J Small Anim Pract* 1993;34:594-598.

Dorfman RF. Classification of the malignant lymphomas. *Am J Surg Path* 1977;1:167-170.

España P. Tratamiento de los linfomas agresivos y de alto grado de malignidad. *Rev Clin Esp* 1993;193:247-252.

Esteban JM, Sheibani K, Owens M, Joyce J, Bailey H. Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis. *Am J Clin Pathol* 1991;95:460-466.

Feder BM, Hurvitz AI. Feline immunodeficiency virus infection in 100 cats and association with lymphomas. *J Vet Int Med* 1990;4:110.

Feller AC. Splenic architecture reflected in the connective tissue structure of the human spleen. *Experientia* 1985;41:164-167.

Fialkow PJ. Clonal haematological disorders. *Harrison's principles of internal medicine* (update III). 13-30. Ed. Mc Graw-Hill Inc. New York 1988.

Fisher RI, Jones RB, De Vita VT. Natural History of malignant lymphoma with divergent histologies at staging evaluation. *Cancer* 1981;47:2022-2025.

Fisher DJ, Naydan D, Werner LL, Moore PF. Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples. *Vet Clin Pathol* 1995;24:118-123.

Fondevila D, Ferrer L, Ramos JA, Montane V, Ramis AJ. Immunohistochemical localization of S-100 protein and lysozyme in canine lymph nodes and lymphomas. *J Vet Med* 1989;36:71-77.

Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Marchal T, Chabanne L, Delverdier A, Bryon PA, Felman P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J Comp Path* 1997;117:35-59.

Fournel-Fleury C, Magnol JP, Chabanne L, Ghernati I, Marchal T, Bonnefond C, Bryon PA, Felman P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *J Comp Path* 1997;117:61-72.

**Franks PT, Harvey JW, Mays MC, Senior DF, Bowen DJ, Hall BJ.** Feline large granular lymphoma. *Vet Pathol* 1986;23:200-202.

**French RA, Seitz SE, Valli VEO.** Primary Epitheliotropic Alimentary T-cell lymphoma with hepatic involvement in a dog. *Vet Pathol* 1996;33:349-352.

**Frierson HF.** Flow cytometric analysis of ploidy in solid neoplasm: comparison of fresh tissues with formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Hum Pathol* 1988;19:290-294.

**Frierson HF.** The need for improvement in flow cytometric analysis of ploidy and S-phase fraction. *Am J Clin Pathol* 1991;95:439-442.

**Frierson HF.** Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991;15:358-367.

**Fujita T., Kashimura M., Adachi K.** Scanning electron microscopy and terminal circulation of the spleen. *Experientia* 1985;41:167-179.

**Furie WS.** Lymphoma presenting as complex anemia. *Canine Pract* 1993;18:23-25.

**García RL, Coltrera MD, Gown AM.** Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol* 1989;134:733-739.

**García R, Bueno A, Feijó E, Robledo M, Echezarreta G, Ortíz F, Benítez J, Sarasa JL, Rivas C.** DNA content in Non-Hodgkin lymphomas. Comparison between flow cytometry and cytogenetics in fresh and paraffin embedded tissues. *Acta Oncol* 1994;33:621-625.

**García R, Bueno A, Castañón S, Ruiz-Barnés P, de Campos JM, Kusk E, Fortes JR, Ortíz F, Sarasa JL.** Study of the DNA content by flow cytometry and proliferation in 281 brain tumors. *Oncology* 1997;54:112-117.

**Garland P, Degraef C.** Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S-phase cell in paraffin sections from animal and human tissue. *Cell Tissue Kinet* 1989;2:383-392.

**Gérard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K, Rilke F, Stansfeld AG, van Unnik JAM.** Classification of non-Hodgkin's Lymphomas (Letter to Editor). *Lancet* 1974;ii:406-408.

**Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H.** Growth fractions in malignant non-Hodkin's Lymphomas as determined in situ with the monoclonal antibody Ki67. *Haematol Oncol* 1984;2:365-371.

**Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H.** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-1715.

**Gerdes J, Li L, Schlüter C.** Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;138:867-873.

**Gerdes J, Sabattini E, Pileri E.** Immunohistochemical determination of the proliferative capacity of malignant lymphomas with Ki-67 and other monoclonal antibodies. pp.131-144. *en: Cell proliferation in lymphomas.* Ed. J. Crocker. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London. Edinburgh. Boston. Melbourne. Paris. Berlin. Viena. 1993.

- Goitsuka R, Ohno K, Matsumoto Y, Hayashi N, Momoi Y, Okamoto Y, Watari T, Tsujimoto H, Hasegawa A.** Establishment and characterization of a feline large granular lymphoma cell line expressing interleukin 2 receptor alpha-chain. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 863-865.
- González-Barón M.** *Oncología Médica*. pp. 403-424. Ed Interamericana. Mc Graw-Hill. New York. 1992.
- Grace J, Stankovic R, Gupta L.** Detection of aneuploidy and polyploidy in non-Hodgkin's lymphoma by computer video analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:265-273.
- Greenlee PG, Filippa DA, Quimby FW, Patnaik AK, Calvano SE, Matus RE, Kimmel M, Hurvitz AI, Lieberman PH.** Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic and clinical study. *Cancer* 1990;66:480-490.
- Habeshaw JA, Lauder I.** *Malignant Lymphomas* 138-169. Ed Churchill-Livingstone. Edinbourg. London. New York. 1988.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins et al.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990;162:285-294.
- Hardy Jr. WD, MacEwen EG.** Hematopoietic Tumors. Chapter 29, pp 362-411. En *Clinical veterinary oncology*. Withrow SJ, MacEwen EG. Ed. JB Lippincott. Philadelphia, 1989.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peeters CH, Falini B, Gatter K, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Müller-Hermelink HK, Pileri S, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke R.** A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: aproposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
- Hart JR, Shaker E, Patnaik AK, Garvey MS.** Lymphocytic-plasmacytic enterocolitis in cats: 60 cases (1988-1990). *J Am Anim Hosp Assoc* 1994;30: 505-514.
- Hawkins EC, Morrison WB, DeNicola DB, Blevins WE.** Cytologic analysis of bronchoalveolar fluid from 47 dogs with multicentric malignant lymphoma. *J Am Vet Med Assoc* 1993;203:1418-1425.
- Hedley DW., Friedlander ML., Taylor IW., Rugg CA., Musgrove EA.** Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow Cytometry. *J Hist Cytochem* 1983;31:1333-1335.
- Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA.** Flow Cytometry of paraffin-embedded tissues. *Cytometry* 1984;5:660-670.
- Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW.** Aplication of DNA flow cytometry to paraffin embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 1985;6:327-333.
- Henry K.** Electron Microscopy in the non-Hodgkin lymphoma. *Br J Cancer* 1975;31(Supp II):73-93.
- Henry K.** The thymus gland. *Systemic Pathology*, 3ª edición, 7:2-140; Ed. Churchill-Livingstone. New York. 1992.
- Hopkins NH.** The origins of human cancer. Capitulo 27. pp. 1058-1094. in: "Molecular biology of the gene". 4ª edición. Ed. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. Menlo Park, California, 1988.
- Hutson CA, Rideout BA, Pedersen NC.** Neoplasia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats of Southern California. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199:1357-1362.

- Isaacson PG, Wright DH.** Malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 1983;52:1410-1416.
- Isaacson PG, Spencer J.** Malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue. *Histopathol* 1989;11:445-462.
- Isaacson PG.** Lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue (MALT). *Histopathol* 1990;16:617-619.
- Jacobs RM.** Diagnostic cytology. *Sem Vet Med Surgery Small An* 1988;3:83-182.
- Jaffe ES, Bookman MA, Longo DL.** Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. mantle-zone lymphoma. *Human Pathol* 1987;9:877-881.
- Joensuu H., Klemi PJ., Jalkanen SJ.** Biologic progression of non-Hodgkin's lymphomas. A flow-cytometric study. *Cancer* 1990;65:2564-2571.
- Johnson TS, Raju MR, Giltinan RK, Gillete EL.** Ploidy and DNA distribution analysis of spontaneous dog tumors by flow cytometry. *Cancer Res* 1981; 41:3005-1009.
- Kaiserling E.** Non-Hodgkin Lymphom, pp.110-155. Ed Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York 1977.
- Kallioniemi OP.** Comparison of fresh and paraffin-embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumor heterogeneity. *Cytometry* 1988;9:164-169.
- Kamel OW, Le Brun DP, Davis RE, Barry GJ, Warnke RA.** Grow fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using anti-PCNA-cyclin 19A2. *Am J Pathol* 1991; 138: 1471-1477.
- Kaplan EL, Meier P.** Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1985;53: 457-481.
- Kay NE, Ackerman SK, Douglas SD.** Anatomy of the immune system. *Semin. Haematol* 1979;16:252-282.
- Keller ET.** Lymphoma and immune-mediated disorders in the dog. *Vet Cancer Society* 1992;16:2,3.
- Kempin SJ.** Haematologic aspects of malignant lympho-proliferative disease. Diseases of the lymphatic system. Diagnosis and therapy. 181-207. Ed. David Molander. Londres 1984.
- Kim H, Dorfman RF.** Morphological studies of 84 untreated patients subjected to laparotomy for the satging of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 1974; 33: 657-674.
- Knapp W., Dörken B., Glis WR., Rieber EP., Schmidt RE., Stein H., Von dem Borne AEG.** Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. 128-138. Ed Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio, 1989.
- Laskey RA, Fairman MP, Blow JJ.** S phase of the cell cycle. *Science* 1989; 246:609-613.
- Lee S, Tolmachoff T, Marchevsky AM.** DNA content analysis (ploidy) by image analysis. Clinical applications and comparison with flow cytometry. 261-308. *in: Marchevsky AM, Bartels PH, 1994. Image Analysis. A primer for pathologists.* Ed. Raven Press; New York.
- Leifert CE, Matus RE.** Canine lymphoma: clinical considerations. *Seminars Vet Med Surg* 1980;1:43-50.
- Lennert K, Mohri N, Stein H, Kaiserling E.** The histopathology of malignant lymphoma. *Br J Haematol* 31 (Suppl): 193-203, 1975.

- Lennert K, Mohri N, Stein H, Kaiserling E, Müller Hermelink HK.** Malignant Lymphomas other than Hodgkin's disease. pg 1-70. Ed. Springer Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. 1978.
- Lennert K.** Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der Kiel- Klassifikation). Springer Verlag. Berlin. Heidelberg. New York 1981.
- Lennert K, Feller AC.** Non-Hodgkin-Lymphome, pg.27-38, Ed. Springer Verlag. Berlin, 1990.
- Lever WF.** Histopatología de la piel, pp.765-774. Ed. Intermédica. Buenos Aires. 1990.
- Levine GD, Polliac A.** The T-cell nature of the lymphocytes in two epithelial thymomas: a comparative immunologic, scanning and transmission electron microscopic study. Clin Immunol Immunopathol 1975; 4:199-208.
- Li T-J, Browne RM, Matthews JB.** Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in unicystic ameloblastoma. Histopathol 1995; 26:219-228.
- Linch DC, Knott LJ, Rodeck CH, Huens ER.** Studies of circulating haemopoietic progenitor in human fetal blood. Blood 1982;59:976-979.
- Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ.** Clinical application of morphology and immunohistochemical assessments of cell proliferation. Am J Clin Pathol 1992;97(Suppl 1):4-13.
- Lukes RJ.** The immunologic approach to the pathology of malignant lymphomas. Am J Clin Path 1975;72:657-659.
- Macartney JC, Camplejohn RS.** DNA flow cytometry. pp.99-114. in: Cell proliferation in lymphomas. Ed. J. Crocker. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London. Edinburgh. Boston. Melbourne. Paris. Berlin. Viena. 1993.
- MacEwen, EG.** Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. Cancer Metastasis Rev 1990;9:125-136.
- Madewell BR, Jain NC, Padrid P, Danilenko DM.** Bizarre lymphoid cells in serous effusion of a dog with mediastinal lymphoma. J Comp Pathol 1988;99:229-233.
- Madewell BR, Munn RF.** Canine lymphoproliferative disorders. J Vet Int Med 1990;4:63-70.
- Maeda H, Ozaki K, Honaga S, Narama I.** Hodgkin's-like lymphoma in a dog. J Vet Med 1993;40:200-204.
- Magrith IT.** Lymphocyte differentiation: An essential basis for comprehension of lymphoid neoplasia. J Natl Cancer Inst 1981;67:501-510.
- Mange AP, Mange EJ.** Genetics of cancer. Capítulo 19. pp. 378-404; en: "Genetics: human aspects". Mange AP, Mange EJ. 2ª edición. Ed. Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Massachusetts, 1990.
- Marcos B, Echezarreta G, Rivas C, Garcia R, Sanz ER, Obeso G, Bueno A, Gonzalo I, Sarasa JL.** Biología de los linfomas B del folículo nodal secundario. Sangre 1993;38:435-441.
- Marcos B, Ageitos AG, Echezarreta G, Sanz C, García R, García MJ, Rivas C.** Correlación entre la citometría de flujo y estática en linfomas anaplásicos. Sangre 1998;43:25-29.
- Mazerolles C, Rishmann P, Chopin D, Popov Z, Malavaud B, Selves J, Neulat I, Bellot J, Delsol G.** Usefulness of MIB1 monoclonal antibody in assessing the proliferative index in human bladder carcinoma. Comparison with Ki67 antibody. Histopathology 1994;25:563-568.

- Mc Cormick D, Hall PA.** The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathol* 1992;21:591-594.
- Miller JFAP.** Cellular interactions in immune response. *Semin Haematol* 1979;16:282-292.
- Millikin PD.** The nodular white pulp of the human spleen. *Arch Path* 1969;87: 247-258.
- Milner RJ, Pearson J, Nesbit JW, Close P.** Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. *Onderstepoort J vet Res* 1996;63: 309-313.
- Minke JM, Cornelisse CJ, Stolwijk, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Rutteman GR, Misdorp W.** Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Feline Mammary Tumors. *Cancer Res* 1990;50:4003-4007.
- Mitchell J, Nossal GJV.** Localization and fate of foreign antigens in tissues. *Immunological Diseases* 3<sup>a</sup> Ed. I: 22-34, Max Sanders Ed. Londres 1978.
- Mori Y, Lennert K.** Electron microscopic atlas of the lymph node. *Cytology and histology*. Ed. Springer Verlag. Berlin. 1969.
- Montalbán C, Obeso G, Gallego A, Castrillo JM, Bellas C, Rivas C.** Peripheral T-cell lymphoma: a pathological study of 41 cases and evaluation of the prognostic significance of the updated Kiel Classification. *Histopathol* 1993;22:303-310.
- Montalbán C, Castrillo JM, Abaira V, Serrano M, Bellas C, Piris MA, Carrión R, Cruz MA, Laraña JG, Menárguez J, Gómez-Marcos F, Rivas C.** Gastric B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT). Clinicopathological study and evaluation of the prognostic factors in 143 patients. *Ann Oncol* 1995;6:355-362
- Montironi R, Diamanti L, Santinelli A, Scarpelli M.** Computer-aided S-phase fraction determination in DNA static cytometry in breast cancer; a preliminary methodologic study on cytologic material. *Anal Quant Cytol Histol* 1992;14:379-385.
- Moore PF, Olivry T, Naydan D.** Canine cutaneous epidermotropic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T cells. *Am J Pathol* 1994;144:421-429.
- Morris JS, Dunn JK, Dobson JM.** Canine lymphoid leukaemia and lymphoma with bone marrow involvement. A review of 24 cases. *Small Anim Pract* 1993;34:72-79.
- Moulton JE, Harvey JW.** Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. Chapter 6. pp 231-307. *In*: Moulton JE (ed). *Tumors of the domestic animals*. 3<sup>a</sup> Edición. Ed. University of California Press. California 1990.
- Müller-Hermelink HK.** The human thymus. Current topics in pathology. 1-43. Ed. CL Berry, and E grundmann. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1986.
- National Cancer Institute** sponsored study of Classification of non-Hodgkin's Lymphomas: summary and description of a Working Formulation for a clinical usage. *Cancer* 1982;49:2112-2135
- Nichols WS, Chisari FV.** Structure and function of the lymphoid tissue. *Haematology*: Williams WS, Beutler E, Erslew AJ, Lichtman MA. 83-89. Ed. McGraw-Hill. New York 1983.
- Norton AJ, Isaacson PG.** Extranodal Lymphomas. pp: 1-15. Ed. Churchill Livingstone. Edinburgh. London. Madrid. 1994.

**Norton AJ, Jordan S, Yeomans P.** Brief, high temperature heat denaturation (pressure cooking): A simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissue. *J Pathol* 1994;173:371-379.

**Obeso G, Sanz ER, Rivas C, Marcos B, G<sup>a</sup> Delgado R, Echezarreta G, Benitez J, Montalban C, Castrillo JM.** B-cell follicular lymphomas. Clinical and biological characteristics. *Leukemia-Lymphoma* 1994;16:105-111.

**Ortiz-Masllorens F.** Iniciación a la Inmunología. pp.11-24. Ed. Ibáñez Plaza Asoc. S.L. Madrid 1997.

**Ostrowski M, Chakraborty S, Lauricica R, Brown RW, Greenberg SD.** Quantitative DNA analysis of MIB1 immunoreactivity. A comparison with flow cytometric assesment of proliferative activity in invasive carcinoma of the breast. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;17:15-24.

**Parks DE, Chisari FV.** Production and distribution of lymphocytes and plasma cells. *Haematology: Williams WS, Beutler E.* 923-933. Ed. McGraw-Hill. New York 1983.

**Parodi AL, Dargent F, Crespeau F.** Histological classifications of canine malignant lymphomas. *J Vet Med* 1988;35:178-192.

**Parodi AL, Femenia F, Moraillon A, Crespeau F, Fontaine JJ.** Histopathological changes in lymph nodes of cats experimentally infected with the feline immunodeficiency virus (FIV). *J Comp Path* 1994;111:163-174.

**Peto R, Pike MC, Armitage P.** Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II Analysis and examples. *Br J Cancer* 1977;35:1-39.

**Pezzella F, Ralfkiaer E, Gatter K, Mason DY.** The 14;18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction. *British J Haematol* 1990;76:58-64.

**Piris MA, Rivas C, Morente M, Martinez MC, Toledo MC, Orradre JL, Rubio C, Oliva H.** Linfomas de células B. Estudio inmunohistológico con anticuerpos monoclonales en 197 casos. *Med Clin (Barc)* 1988;90:697-685.

**Poli A, Abramo F, Baldinotti F, Pistello M, Bendinelli M, Da-Prato L.** Malignant lymphoma associated with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *J Comp Pathol* 1994;110:319-328.

**Quesenberry P, Levitt L.** Haematopoietic stem cells. *N Eng J Med* 1979; 301:755-760.

**Rabanal RM, Ferrer L, Else RW.** Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues. *Vet immunol immunopathol* 1995;47:13-23.

**Rallis T, Koutinas A, Lekkas S, Papadiamantis C.** Lymphoma (malignant lymphoma, lymphosarcoma) in the dog. *J Small Anim Pract* 1992;33:590-596.

**Rappaport H.** Tumors of the Haematopoietic System. Atlas of tumor Pathology Fasc 8. pp.130-207. Ed Armed Forces Institute of Pathology (AFIP). Washington 1966.

**Rivas C, Oliva H.** Linfomas no Hodgkin. Morfología óptica. Microscopia Electronica. Citohistoquímica. Inmunología. Clínica y terapéutica. Ed Salvat. Barcelona, Madrid 1980.

**Rivas C, de la Concha EG, Oliva H, Bernácer M, Rivas F, Vicente J.** Linfomas T en la infancia. *Patología* 1982;15:393-404.

**Rivas C, Piris MA, Oliva H.** Morfofisiología de los órganos linfoides. Estudio con anticuerpos monoclonales. Bol. Fund. Jim. Díaz, 1983;10:247-254.

**Rivas C.** Linfomas no hodgkinianos y síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Med Clin (Barc) Ed 1989;92:295-298.

**Rivas C.** Neoplasias del folículo linfoide (I). Morfofisiología. Jano 1991;XL:461-XL:464-467.

**Rivas C, Gedikoglu G, Piris MA, Obeso G, Castrillo JM, Sánchez M, Morente M, García I, Oliva H.** Neoplasias del folículo linfoide (II). Avances en linfomas centrofoliculares. Linfomas del manto folicular. Jano 1991;XL:745-749.

**Rivas C, Piris MA, Castrillo JM.** Folículo linfoide y sus neoplasias (III). Linfomas MALT; su relación con la zona marginal. Jano 1991;XL:1043-1045.

**Rivas C, Echezarreta G, García R, Robledo M, Benítez J, Delsol G.** A multiparametric study of malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue. Leukemia Lymph 1992;8:87-96.

**Robb-Smith AHT, Taylor CR.** Lymph node Biopsy. pp. 148-198. Ed. Miller Heyden Ltd. London 1981.

**Roitt I.** Essential immunology. pp.134-153. Ed. Blackwell sci. Oxford. 1988.

**Rojko JL, Kociba GJ, Abkowitz JL, Hamilton KL, Hardy WD Jr, Ihle JN, O'Brien SJ.** Feline lymphomas: immunological and citochemical characterization. Cancer Res 1989;49:345-351.

**Rosenberg MP, Honenhaus AE, Matus RE.** Monoclonal gammopathy and lymphoma in a cat infected with feline immunodeficiency virus. J Am Anim Hosp Assoc 1991;27:335-337.

**Rosai J, Levine GD.** Tumours of the thymus. Atlas of AFIP. Fascículo 13. Washington 1976.

**Rosenthal RC.** Chemotherapy. Capítulo 73, pp 473-484; en: "Textbook of veterinary internal medicine". Ettinger SJ and Feldman EC. Ed. Saunders. Philadelphia 1995.

**Ross W, Hall PA.** Ki67: from antibody to molecule to understanding?. J Clin Pathol (Mol Pathol) 1995;48:M113-M117.

**Rozman C, Woessner S, Feliu E.** Ultrastructure of haematopoietic System. Salvat Ed. Barcelona 1993.

**Rutteman GR, Cornelisse CJ, Dijkshoorn NJ, Poortman J, Misdorp W.** Flow Cytometric Analysis of DNA Ploidy in Canine Mammary Tumors. Cancer Res 1988;48:3411-3417.

**Rutteman GR, Cornelisse CJ.** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in solid tumors. Vet Pathol 1991;28:453-455.

**Ryser JE, Vassalli P.** Mouse Bone Marrow Lymphocytes and their differentiation. J Immunol 1974;113:719-728.

**Sabattini E, Gerdes J, Gherlinzoni F, Zucchini L, Melilli G, Grigioni F.** Comparison between the monoclonal antibodies Ki-67 and PC10 in 125 malignant lymphomas. J Pathol 1993;169:397-403.

**Sánchez-Fayos J, Calabuig T.** Linfomas malignos-leucemias linfoides. Un intento de interpretación biológica unitaria. Bol. Fund Jim Díaz 1982; 9:69-84.

**Sánchez-Fayos J, Figuera A, Lite M.** Concepto de panmielopatía como fórmula integradora de visión hematológica. Medicine 1984;IV:553-560

- Sanz C, Marcos B, Rivas C, Aceituno E, Peña L, García MJ, Echezarreta G.** Image Analysis in canine lymphomas; a comparison with flow cytometry and proliferation with MIB1 and PC10. *Eur J Vet Pathol* 1998 (Aceptado en prensa).
- Scanziani E, Caniatti M, Sen S, Erba E, Cairoli F, Batocchio M.** Flow cytometric analysis of cellular DNA content in paraffin wax embedded specimens of canine mammary tumours. *J Comp Path* 1991;105:75-82.
- Sebo TJ, Roche PC, Witzig TE, Kurtin PJ.** Proliferative activity in non-Hodgkin's lymphomas. A comparison of the bromodeoxyuridine labelling index with PCNA immunostaining and quantitative image analysis. *Am J Clin Pathol* 1993;99:668-672.
- Seckinger D, Sugarbaker E, Frankfurt O.** DNA content in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:619-626.
- Shimoda T.** Clinicopathological findings in 12 cases of feline thymic lymphoma. *J Jpn Vet Med Assoc* 1993;46:227-230.
- Souhami RL, Moxham J.** *Medicine*. pp. 147-149. Ed. Churchill Livingstone. Edimburg. London. New York. 1990.
- Spencer J, Finn T, Isaacson PG.** A comparative study of the gut associated lymphoid tissue in primates and rodents. *Virchows Arch B* 1986;51:509-519.
- Spencer J, McDonald T, Finn T, Isaacson PG.** The development of gut associated lymphoid tissue in the terminal ileum of fetal human intestine. *Clin Exp Immunol* 1986;64:536-543.
- Spodnick GJ, Berg J, Moore FM, Cotter SM.** Spinal lymphoma in cats: 21 cases (1976-1989). *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:373-376.
- Stansfeld AG, Diebold J, Kapancy Y, Kelenyi G, Lennert K, Mioduszezewska O.** Updated Kiel Classification for Lymphomas. *Lancet* 1988;603:292-293.
- Stein H, Tolksdorf G, Lennert K.** T-cell lymphomas. *Path Res Pract* 1981;171: 197-216.
- Stein H, Mason DY.** Immunological analysis on tissue sections in diagnosis of lymphoma. *Recent Advances in Haematology*. 127-171, Hoffbrand AV. Ed Churchill Livingstone. London 1985.
- Stein H, Gerdes J, Falini B.** Phenotypic and genotypic markers in malignant lymphomas: Cellular origin of Hodgkin and Sternberg cells and implication for the classification of T-cell and B-cell Lymphomas. *Pathology of Cell Receptors and tumour markers*. 121-145. Ed G. Seifert Hubner. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York. 1987.
- Suchi T, Tajima K.** Peripheral T-cell malignancy as a problem in lymphoma classification. *Jpn J Clin Onc* 1979;9 suppl:443-451.
- Taylor CR.** The pathobiology of lymphocyte transformation. *Pathobiology Annual*. 1982;12:65-84.
- Teske E, Rutteman GR, van Heerde P, Misdorp W.** Polyethylene glycol -L- asparaginase versus native L- asparaginase in canine Non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer* 1990;26:891-895.
- Teske E.** Non-Hodgkin lymphoma in a dog: characterization and experimental therapy. Ed. Cip-Gegevens Bibliotheek, den haag. Omi Utrecht. 1993.

- Teske E, Rutteman GR, Kuipers-Dijkshoorn NJ, van Dierendonck JH, van Heerde P, Cornelisse CJ.** DNA ploidy and cell kinetic characteristics in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 1993;21:579-584.
- Teske E.** Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Veterinary Quarterly* 1994;16:209-219.
- Teske E.** Prognostic factors for malignant lymphoma in the dog: an update. *Veterinary Quarterly* 1994;16(supp I):29-31.
- Teske E, van Heerde P, Rutteman GR, Kurzman ID, Moore PF, MacEwen G.** Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1994;205:1722-1728.
- Turner JL, Luttgen PJ, VanGundy TE, Roenigk WJ, Hightower D, Frelief PF.** Multicentric osseous lymphoma with spinal extradural involvement in a dog. *J Vet Res* 1989;50:483-487.
- Valli VEO and Parry BW.** The leukon (pp 101-157). The hematopoietic system. Chapter 2. *In*: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer NC (ed). *Pathology of domestic animals*. 4ª edición. Ed. Academic Press Inc. San Diego, California 1993.
- Vicente J.** Fisiopatología, clínica y tratamiento de los linfomas malignos no Hodgkinianos. *Linfomas no Hodgkin* 189-215. Ed Salvat Barcelona. 1980.
- Vicente J, Rivas C, Holgado J, Murias A, Oliva H.** Linfomas T linfoblásticos. Estudio clínico-patológico de 17 casos y respuesta terapéutica a corto y largo plazo. *Rev Clin Esp* 1982;167:351-358.
- Waseem NH, Lane DP.** Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990;96:121-129.
- Weisenburger DD.** Mantle zone lymphoma. An immunohistological study. *Cancer* 1987;53:1073-1080.
- Weisenburger DD., Nathwani BN., Diamond LW., Winberg Cd., Rappaport H.** Malignant lymphoma, intermediate lymphocytic type: a clinicopathological study of 42 cases. *Cancer* 1981;48:1415.
- Weissman IL, Warnke R, Butcher EC, Rouse R, Levy R.** The lymphoid system. Its normal architecture and the potential for understanding the system through the study of proliferative diseases. *Hum Pathol* 1978;9:25-44.
- Wellman ML, Couto CG, Starkey RJ, Rojko JL.** Lymphocytosis of large granular lymphocytes in three dogs. *Vet Pathol* 1989;26:158-163.
- Wied GL, Bartels PH, Bibbo M, Dytch HE.** Image analysis in quantitative Cytopathology and Histopathology. *Hum Pathol* 1989;20:549-571.
- Wilson WH, Chapner BA.** Capítulo 12, sección 4: principles of therapy. pp. 235-245; en: "The Lymphomas" Ed. Canellos GT, Lister TA, Sklar JL. WB Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, 1998.
- Wojcik EM, Katz RL, Johnston DA, Sembera D, El-Nagar A.** Comparative analysis of DNA ploidy and proliferative index in fine needle aspirates of non-Hodgkin's lymphomas by image analysis and flow cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:151-157.
- Wolf BC, Neiman RS.** Disorders of the spleen. 3-30, Ed WB saunders Company Philadelphia 1989.

**World Health Organization Clinical Advisory Committee Meeting:** Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid systems. November 3-5, 1997.

**Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, Hanby AM, Waseem NH, Lane DP, Levison DA.** The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G<sub>2</sub>+M phase fraction (flow cytometry analysis) and prognosis. *Histopathol* 1991;19:21-27.

**Wright DH., Isaacson PD.** Biopsy Pathology of the Lymphoreticular System, pp. 152-158. Ed Chapman-Hall, London 1983.

**Zbieranowski I, Le-Riche JC, Palcic B, Gascoine R, Connors J.** Determination of DNA ploidy in archival tissue from non-Hodgkin's lymphoma using flow and image cytometry. *Anal Cell Pathol* 1992;4:303-313.