



Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio.

Trabajo Final

**Estudio retrospectivo de linfomas caninos
diagnosticados por citología en el Servicio de Anatomía
Patológica del Laboratorio de Patología Especial.
Facultad de Cs. Veterinarias de UNLP.**

AUTOR: Méd. Vet. *Flor de la Torre.*

DIRECTORA: Dra. *Adriana R. Massone.*

COLABORADOR: Méd. Vet. *Gonzalo J. Madariaga.*

Año 2017.

RESUMEN

El linfoma canino es una neoplasia hematopoyética de gran interés, debido al aumento de la casuística en los últimos años. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la casuística de los linfomas caninos, a partir de material de archivo de estudios citológicos que ingresaron al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, durante el período comprendido entre los años 2012 y 2016. Para tal fin, se procedió a: realizar una búsqueda y actualización bibliográfica sobre el tema; describir las características de los preparados citológicos con diagnóstico de linfoma; analizar los resultados en relación al tipo celular, la presentación por edad, por raza y por sexo y elaborar un algoritmo de diagnóstico de linfoma canino para la práctica clínica. Los resultados mostraron: 1. 68,08 % de los casos analizados fueron diagnosticados como linfoma. 2. El % de linfoma de células grandes fue de 93 % vs. 7 % el de células pequeñas. 3. En los casos de linfoma de células grandes se observó un alto índice de mitosis: 51,4 %. 4. Se observó predisposición en la presentación de linfoma para las variables edad (mayor frecuencia a los 12 años: 14,60 %) y raza (Mestizo 20,23 %, Boxer 13,09 %, Labrador 11,90 %, Rottweiler 8,33 %, Golden y Cocker 7,14 %). No se encontró predisposición para la variable sexo (53,85 % hembras vs 46,15 % machos). 5. El estudio citológico de los casos con linfoma evidenció: linfoblastos con marcados criterios de malignidad (anisocariosis, macrocariosis, nucléolos evidentes, núcleos desnudos, figuras mitóticas aberrantes y alteración de la relación núcleo-citoplasma). 6. El estudio de los casos seleccionados valida la importancia del citodiagnóstico como herramienta eficiente para el diagnóstico de linfoma.

ABSTRACT

Canine lymphoma is a hematopoietic neoplasm of great current interest, due to the increase in casuistry in recent years. The purpose of the present work was to provide information on the presentation of canine lymphomas, from archival material of cytological studies that entered the Special Veterinary Pathology Laboratory of the Faculty of Veterinary Sciences, UNLP, during the period between 2012 and 2016. To achieve this, we proceeded to: conduct a search and update the literature on the subject; describe the characteristics of cytological preparations diagnosed with lymphoma; analyze the results in relation to the cell type, the presentation by age, race and sex and develop a diagnosis algorithm for canine lymphoma for clinical practice. The results showed: 1. 68,08 % of the cases analyzed were diagnosed as lymphoma. 2. % of large cells lymphoma was 93 % vs. 7 % of small cells. 3. In the cases of large cells lymphoma, a high mitosis index was observed: 51,4 %. 4. It was observed predisposition in the presentation of lymphoma for the variables age (highest frequency at 12 years: 14,60 %) and race (Half-blood 20,23 %, Boxer 13,09 %, Labrador 11,90 %, Rottweiler 8,33 %, Golden and Cocker 7,14 %). No predisposition was found for the sex variable (53,85 % females vs 46,15 % males). 5. The cytological study of cases with lymphoma evidenced: lymphoblasts with marked malignancy criteria (anisocariosis, macrocariosis, evident nucleoli, naked nuclei, aberrant mitotic figures and alteration of the nucleus-cytoplasm ratio). 6. The study of selected cases validates the importance of cytodiagnosis as an efficient tool for the diagnosis of lymphoma.

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCION	5
Fisiología del sistema inmune.....	8
Citología como una herramienta de exploración y diagnóstico.....	13
II. OBJETIVOS	14
III. MATERIALES Y METODOS	15
III.1. Revisión bibliográfica.....	15
III.2. Relevamiento de casos de neoplasias linfoides.....	15
III.3. Descripción de las características celulares de los preparados citológicos de los casos seleccionados.....	15
III.4. Elaboración de un algoritmo de diagnóstico de linfoma canino para la práctica clínica	16
III.5. Sistema de gradación propuesto para evaluar criterios de malignidad.....	16
IV. RESULTADOS	17
Diagnóstico Citológico	17
Tamaño e índice mitótico de las células neoplásicas.....	17
Distribución de los casos de acuerdo al sexo de los caninos.....	19
Distribución de los casos de acuerdo a la edad de los caninos.....	20
Distribución de los casos de acuerdo a las razas.....	21
Descripción de las características celulares de los preparados citológicos de los casos seleccionados.....	21
Imágenes de los casos estudiados de linfoma.....	22
Algoritmo de diagnóstico de linfoma canino	26
V. DISCUSIÓN	28
VI. CONCLUSIONES	30
VII. BIBLIOGRAFÍA	31

I. INTRODUCCION

Los linfomas son neoplasias que afectan al sistema linfático, abarcan un diverso grupo de enfermedades que envuelve al tejido linfoide no incluyendo como origen a la médula ósea (Donald, 2007). El linfoma es definido como una proliferación de células linfoides malignas que primariamente surgen de linfonódulos u órganos viscerales sólidos, como el hígado o el bazo (Romani, 2005). Es considerada como una enfermedad severa, progresiva y fatal, siendo su primera descripción hecha por Siedomgiotsky en 1872 (Couto, 1984).

En caninos, esta neoplasia se presenta en edad media o en mayores (6-12 años), sin predilección sexual (Vail y Ogilvie, 2003). Tampoco presenta predilección por razas, aunque el diagnóstico es más común en Boxer, Golden Retriever y Rottweiler. Constituye entre el 7 – 24 % de las neoplasias en caninos (Gear, 2009) y 83 % de todas las neoplasias malignas hematopoyéticas, siendo la más común de las alteraciones linfoproliferativas en pequeños animales (Vail y Ogilvie, 2003).

La etiología del linfoma canino es desconocida. Se consideran una serie de factores predisponentes. Entre ellos encontramos factores genéticos, ya que se ha observado una agrupación ocasional de linfomas en perros emparentados, y una caracterización genotípica de perros con linfoma ha revelado que el 25 % de ellos presentan trisomía en el cromosoma 13 como anomalía cromosómica primaria, aunque esto mismo se asoció también con un mejor pronóstico (Teske, 1994; Hahn, 1994; Valli, 2007). Otros factores incluyen la exposición a ciertos herbicidas, como los que contienen ácido 2,4-diclorofenoxiacético; campos magnéticos de baja frecuencia y alta intensidad; la residencia en áreas industriales; o mutaciones en el gen supresor de tumores p53, factores que han sido asociados con diversas neoplasias en la especie humana (Vonderhaar, 1998; Vail, 2007; Reif, 1995; Kaneene, 1999).

Se ha estudiado la actividad de retrovirus, identificados en cultivos celulares de linfoma canino, y su posible participación en la etiología de estas neoplasias. Sin embargo, se han identificado tanto en tejido linfoide neoplásico como sano, de modo que no existen datos que demuestren que desempeñan un rol en la etiología del linfoma en la especie canina (Madewell, 1986; Safran, 1992).

Tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, hay dos grupos principales de linfoma: el linfoma de Hodgkin y linfoma no-Hodgkin (Vela Casas, 2004). En el linfoma de Hodgkin el parénquima tumoral está constituido por dos tipos de células de origen

linfoide: las células de Hodgkin y las células de Reed-Sternberg. Las células de Hodgkin, se caracterizan por ser grandes (alrededor de 20 micrones), con citoplasma relativamente abundante, núcleo grande vesiculoso, redondeado o irregular, membrana nuclear gruesa por marginación de cromatina y nucléolo prominente. En tanto, las células de Reed-Sternberg, son más grandes que las mencionadas anteriormente, muy prominentes, gigantes (mayores de 50 micrones) con citoplasma abundante, se caracterizan por poseer dos núcleos grandes, vesiculosos, con membrana nuclear gruesa, cada uno tiene un nucléolo prominente; los nucléolos están ubicados en una misma línea en un área vecina de ambos núcleos. Para confirmar el diagnóstico de enfermedad de Hodgkin es necesario evidenciar las células de Reed-Sternberg (Chuaqui y col., 2011).

El linfoma no-Hodgkin está constituido casi exclusivamente por células neoplásicas; el estroma es muy escaso (Robbins y Cotran, 2017). En cada linfoma hay un solo tipo de célula tumoral, la que corresponde a alguna etapa de diferenciación de las células linfoides. Sin embargo, estas células malignas no expresan por completo el fenotipo normal y suele haber diferencias en la distribución de los antígenos de diferenciación que caracterizan a cada tipo de célula linfoide normal (Chuaqui y col., 2011).

La clasificación del linfoma canino es basada en criterios anatómicos e histológicos (Couto, 2001). Se reconocen cinco formas del linfoma canino de acuerdo a su clasificación anatómica: multicéntrico, intestinal, mediastínico o tímico, cutáneo y extranodal (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002; Jubb, Kennedy and Palmer's, 2016).

La mayoría de las clasificaciones propuestas en animales fueron adaptadas de los esquemas humanos (Rappaport, 1966; Valli, 2002). En vista a las fuertes similitudes funcionales y morfológicas de los linfonódulos normales entre humanos y animales (Parodi, 2001). Sin embargo, lo ideal sería que una sola clasificación refleje las diferentes categorías morfológicas y tenga implicancias clínicas que puedan predecir el comportamiento de los diversos tipos y su respuesta a la terapia estándar. Además, la clasificación debe corresponder, en la medida de lo posible, con los conocidos mecanismos de la patogénesis del tumor y los orígenes de las células neoplásicas (Parodi, 2001).

El primer intento de clasificación del linfoma en el humano fue hecho por Gall y Mallory en 1942. En 1956, Henry Rappaport, propone una clasificación basada no sólo en la morfología celular (bien diferenciada, pobremente diferenciada o histiocítica), sino también en el patrón de crecimiento tisular de la neoplasia (folicular o difuso) (Padilla,

2009). Esta clasificación introdujo la idea, de que la arquitectura del tejido neoplásico es indicativa del pronóstico clínico del tumor y es de ese modo que la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los tejidos linfoides ha basado sus principios en esta clasificación (Parodi, 2001). Al final de los años sesenta, nuevas investigaciones sobre el sistema inmunológico y la fisiología de las células linfoides dieron lugar a nuevas orientaciones conceptuales, esencialmente, dos sistemas diferentes se han desarrollado, el llamado "Concepto Americano", de Robert Luckes y el "Concepto Europeo" por Karl Lennert, siendo así la primera vez que se trató de distinguir entre linfomas derivados de los linfocitos de las series B y T (Padilla, 2009). En 1974, la clasificación de Lennert y colaboradores, con el apoyo de la asociación europea del linfoma, fue publicada y denominada como "Clasificación de Kiel", esta clasificación se basa en que las células neoplásicas son equivalentes a las distintas formas citológicas normales de las células linfoides y que dichas células son (de forma permanente o no) bloqueadas ("congeladas") en una de las diversas etapas de la evolución normal de las células linfoides. Desde el punto de vista pronóstico, la clasificación de Kiel distingue dos grandes grupos de tumores, los linfomas de bajo grado y los de alto grado de malignidad. Los términos utilizados por el linfoma maligno de bajo grado terminan con el sufijo "-cytic" o "cytoid" y para los de alto grado con "blástica" (Padilla, 2009).

En la literatura veterinaria, del 60 % al 80 % de los casos de linfoma en perros son linfomas de células B; los linfomas de células T representan del 10 % al 38 %; la enfermedad mixta suma al menos 22 % y los tumores de células nulas (p. ej. No reactivos a células B ni T) representan menos del 5 % (Vail y Ogilvie, 2003; Vail, 2009). El desarrollo de anticuerpos monoclonales para detectar marcadores específicos de linfocitos caninos ha conseguido que esté disponible de forma rutinaria la realización de inmunofenotipos de los tumores de los perros en algunos laboratorios. Estas técnicas, también pueden ser desarrolladas en muestras incluidas en parafina y en especímenes citológicos obtenidos mediante aspiración por aguja fina (Fournel-Fleury, 1997; Fisher, 1997).

La clasificación de las neoplasias linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS) adopta la Revisión Europea – Americana de Neoplasias Linfoides (REAL), propuesto por el Grupo Internacional de Estudios en linfoma (Valli, 2010). Esta clasificación se basa en la premisa de tratar de definir distintas entidades, utilizando toda la información disponible, incluyendo aspectos morfológicos, inmunofenotípicos, características genéticas y clínicas (Valli, 2002). La clasificación propuesta reconoce las neoplasias de células B, T, de células asesinas naturales (Natural Killer) y enfermedad de Hodgkin (Vezalli, 2009). Las neoplasias de células B y T son estratificadas en

precursoras, o linfoblásticas (Leucemia linfoblástica aguda y linfoma linfoblástico) y en maduras ("periféricas") de neoplasias B y T (Harris, 1997).

En los últimos años, se ha establecido una nueva clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Valli V. y col., 2002) de enfermedades hematopoyéticas y tejidos linfoides, basándose en aspectos de la Asociación Europea de Hematopatología (EAHP) y de la Sociedad Americana de Hematopatología, esta clasificación incorpora al linfoma no-Hodkin, linfoma de Hodgkin y a todo tejido hematopoyético incluyendo mastocitos e histiocitos. Si bien esta clasificación se basa en muchos aspectos tomados del esquema de la clasificación REAL, nuevas y significativas consideraciones se han incorporado en la clasificación de la OMS para algunas categorías de linfomas y leucemias (Parodi, 2001).

Fisiología del sistema inmune.

Los vertebrados superiores disponen de órganos y tejidos en cuyos microambientes se concentran e interactúan células y sus productos que dan origen a los precursores de las diferentes líneas celulares, las capacitan y diferencian en poblaciones con diferente actividad. De acuerdo a su función los órganos y tejidos se clasifican en: *-primarios, centrales o de mando*: porque capacitan o educan y diferencian a los progenitores de los linfocitos para cumplir una función. Según la especie animal, este proceso se desarrolla en la misma médula ósea, el timo, bolsa de Fabricio y en las placas de Peyer en el íleon, y en *- secundarios, periféricos o de respuesta*: porque en ellos se localizan los linfocitos capacitados y desempeñan su función de generación y maduración de respuesta inmune luego del contacto antigénico. Incluyen a los linfonodos, el bazo, la médula ósea, el tejido linfático asociado a las mucosas (sistema inmune común de las mucosas), grupos celulares de la piel (sistema inmune de la piel) (Pennimpe, 2004).

La célula madre (totipotencial hematopoyética) 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 (Ryser, 1974; Mitchell, 1978; Kay, 1979; Miller, 1979; Quesenberry, 1979). 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 (Roitt, 1988). Esta distribución ocurre en virtud de factores microambientales no totalmente conocidos, que en parte dependen de las adhesinas 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 (Knapp, 1989; Henry, 1992). En la Bolsa de Fabricio en las aves o su equivalente bursal en los mamíferos: la MO, maduran los 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, 1978; Kay, 1979; Miller, 1979; Roitt, 1988). Los órganos linfoides periféricos presentan áreas B y T dependientes, con una disposición específica en cada órgano. En el linfonódulo 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 (Delves y col., 2017). 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 linfonódulos (Rivas, 1998; Isaacson, 1989). 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 (DC) de las áreas T (Linch, 1982; Rivas, 1998; Feller, 1985; Fujita, 1985). Los folículos linfoides son agregados nodulares situados en la cortical de los ganglios linfáticos u otros órganos linfoides. Para su desarrollo se necesita una población timodependiente. 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 sin memoria inmunológica), es el llamado folículo primario. Luego de la 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 cromática, 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. En el sistema MALT o en los ganglios mesentéricos el folículo se rodea de una tercera capa concéntrica semejante a la que poseen las zonas B de los folículos de Malpighi esplénicas, el área marginal (Linch, 1982; Feller, 1985; Fujita, 1985; Wolf, 1989). El centro folicular presenta células linfoides de gran tamaño resultado de la

modulación de los elementos vírgenes linfocitarios, con una morfología característica que las identifica como “células del centro folicular”. Las más pequeñas o más maduras son los “cites” (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, nucléolo pequeño y escasas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER). Los CB tienen núcleos de contorno liso, forma ovalada, cromatina laxa y nucléolos hiperplásicos generalmente marginados; el citoplasma es escaso con mínima cuantía de RE (Rivas, 1980).

Mediante estudios inmunohistoquímicos, en humanos, es posible demostrar la positividad para los anticuerpos monoclonales (AcMo): pan-B (CD19, CD20, CD79a) así como para los anticuerpos policlonales (AcPo): 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 la estirpe histiomonocítica (HM) modificada constituyen las dendríticas del centro DRC y 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 AcMo como el MAC 387 ponen en evidencia a los 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 colaboradora. En su superficie está unido al complejo de histocompatibilidad clase II (clase I si lo presenta al linfocito T 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 (Roit, 1988), 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 (Rojo, 1988). 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 CE, CC y DRC del centro, no ocurre lo mismo con los tres elementos del manto. Su célula dendrítica 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 nucléolo 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, 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. La actividad proliferativa tras el estímulo antigénico difiere en centro y manto: en el primero la positividad con ciclinas MIB1 (Ki67 en parafina) o PdO 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 y col., 1984). Las DRC son de cuerpo pequeño y triangular, a veces doble, con cromatina fina y nucléolo 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 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 (DC) del área T. Las células linfoides del manto (10 micras) tienen núcleo redondo o hendido,

cromatina densa y nucléolo 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 nucléolo menor, siendo excepcional el RER. El CB del centro es el blasto mayor (15-18 micras) con núcleo liso de cromatina dispersa y nucléolos prominentes, únicos o múltiples, generalmente marginados; su citoplasma es escaso con abundantes polirribosomas y despolarización mitocondrial (Kaiserling, 1977; Rivas, 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 B pequeño da lugar a una 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 nucléolo 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, 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, 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 holócrino, 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 células helper o cooperadoras son aproximadamente el

doble de las células citotóxicas y supresoras en respuestas ganglionares inespecíficas, pudiendo invertirse este cociente en situaciones no tumorales o tumorales. No se conoce exactamente cuál es su función (Wolf, 1989).

Citología como herramienta de exploración y diagnóstico.

Los procesos patológicos que afectan a los linfonódulos pueden clasificarse en inflamatorios, hiperplásicos, o neoplásicos. Por lo general, mediante el uso de la citología es posible determinar el tipo de inflamación, y muchas veces se pueden identificar los agentes etiológicos. En los procesos neoplásicos, un profesional experimentado puede diagnosticar varios tipos de neoplasias específicas, obteniendo muchas veces el diagnóstico definitivo, también en otros casos simplemente se llega a un diagnóstico presuntivo de neoplasia, requiriendo estudios histológicos que las permitan identificar específicamente. Asimismo, es posible mediante el uso de la citología identificar metástasis e incluso evaluar la recurrencia de una neoplasia luego de aplicar una terapia.

En la práctica clínica veterinaria, es importante tomar en cuenta los beneficios de la citología como ayuda diagnóstica rápida y eficaz. La citología posee varias ventajas: se pueden tomar muestras de la mayoría de los tejidos, órganos y fluidos; la recolección de muestras es relativamente no invasiva; y gran parte de las muestras se pueden recolectar sin necesidad de hospitalizar al paciente. La recolección y preparación de muestras requieren elementos que se encuentran disponibles en la clínica veterinaria.

La linfadenopatía constituye la indicación principal para el estudio citológico de los linfonódulos, siendo una de las herramientas más valiosas para la evaluación de estos pacientes. En otros casos la disposición de las células neoplásicas dentro de los tejidos es crítica en el diagnóstico de muchos tipos de tumores, por ejemplo si se desea realizar la evaluación de márgenes quirúrgicos, ahora bien si lo que se pretende es la determinación de si un tumor es benigno o maligno, muchas veces la citología aporta mucha información. En algunos casos, y cuando el diagnóstico citológico de neoplasia es incierto, deberá realizarse una evaluación histológica. Asimismo, algunas lesiones no exfolian una cantidad suficiente de células, siendo en éstos casos, también necesaria la evaluación histológica.

Su aporte es considerado especialmente valioso para el diagnóstico de linfomas, autores como Qizilbash, 1985; Fournel-Fleury, 1997, destacan la posibilidad de realizar

diagnósticos muy específicos (variedad citológica de linfoma) en base a la observación de preparados obtenidos por punción. En la mayoría de las situaciones, permite definir el diagnóstico. Asimismo, con el fin de reconocer metástasis potenciales, es aconsejable aplicar este método para el estudio de los linfonódulos que drenan el área de un tumor primario, aun cuando los mismos presentaran un aspecto normal.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo consistió en evaluar la casuística de la presentación de linfomas caninos a partir de material de archivo de estudios citológicos que ingresaron al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, durante el período comprendido entre los años 2012 y 2016.

Objetivos Específicos

- Realizar una búsqueda y actualización bibliográfica sobre el tema propuesto.
- Describir las características celulares en los preparados citológicos seleccionados de material de archivo, los cuales tenían diagnóstico de linfoma.
- Analizar estadísticamente los resultados en relación al tipo celular, la presentación por edad, por raza y por sexo.
- Elaborar un algoritmo de diagnóstico de linfoma canino para la práctica clínica.

III. MATERIALES Y METODOS.

III.1. Revisión bibliográfica.

Para la revisión bibliográfica se trabajó sobre publicaciones, revistas, libros y material bibliográfico en idiomas español e inglés. Las búsquedas se llevaron a cabo en Google Scholar y Pubmed a través del acceso por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

III.2. Relevamiento de casos de neoplasias linfoides.

Se recopilaron y se analizaron los datos de los informes de todos los casos de caninos con linfadenopatía que ingresaron al Laboratorio de Patología Especial Dr. Bernardo Epstein de la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLP en el período comprendido entre los años 2012 y 2016.

Se seleccionaron los preparados citológicos de los casos con diagnóstico de linfoma.

Se realizó el estudio estadístico descriptivo de los datos de edad, raza y sexo extraídos de las historias clínicas de los caninos incluidos en este estudio.

Los preparados citológicos analizados se encontraban teñidos por la técnica de *Tinción 15*®. (Biopur SRL). El equipo de tinción está compuesto por 3 soluciones: solución de fijación y dos soluciones colorantes. La aplicación de esta técnica insume unos 15 segundos y consiste en inmersiones sucesivas en cada uno de los reactivos. Luego, los preparados se secan al aire o cerca de una llama. Si se prefieren tinciones con tendencia eosinofílica o basofílica se aumenta el número de inmersiones en una u otra solución colorante. Es una coloración duradera.

III.3. Descripción de las características celulares de los preparados citológicos de los casos seleccionados.

Se tomaron fotomicrografías de diferentes tipos de linfomas de los casos estudiados. En primer lugar se colocó en el microscopio el preparado a fotografiar y se enfocó con los objetivos. Luego se colocó la cámara sobre el ocular del microscopio con el adaptador controlando que esté correctamente sujeta, centrada y alineada y que la lente esté lo más cerca posible del visor del microscopio, pero sin que lleguen a tocarse y se ajustó el enfoque tanto con el microscopio como con la cámara.

III.4. Elaboración de un algoritmo de diagnóstico de linfoma canino para la práctica clínica.

El algoritmo para orientar hacia el diagnóstico de linfoma canino se elaboró de acuerdo a las características citológicas que fueron halladas en las muestras obtenidas por aspiración del linfonódulo (tipo de células predominantes, tamaño celular).

III.5. Sistema de gradación propuesto para evaluar criterios de malignidad.

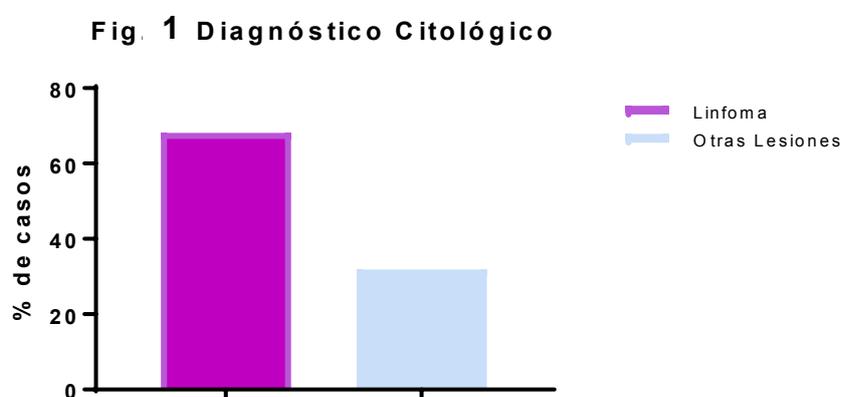
La apariencia morfológica de las células neoplásicas se utilizó para clasificar los linfomas y establecer el grado de malignidad. Si bien existen otros parámetros descriptivos, en este trabajo se utilizó el índice mitótico y el tamaño celular.

- Índice mitótico: se realizó la identificación de las mitosis en 5 campos (Objetivo 40 X):
Bajo: 0-1 figuras mitóticas
Moderado: 2-3 figuras mitóticas
Alto: más de 3 figuras mitóticas
- Determinación del tamaño celular en comparación con el del glóbulo rojo:
Pequeño: 1 a 1 vez y media
Mediano: 2 a 2 veces y media
Grande: 3 veces o más

IV. RESULTADOS

El total de estudios citológicos recibidos en el servicio para su diagnóstico durante el período en estudio fue de 2597. De estos casos se analizaron 141, que correspondían a muestras de linfonódulos. En 96 casos se diagnosticó linfoma y en 45 otras lesiones.

El 68,08 % (96/141) de los casos analizados fueron diagnosticados como linfoma por citología (Fig. 1).



El estudio del tamaño e índice mitótico de las células neoplásicas de 72 de los casos con linfoma canino se muestra en la Tabla 1.

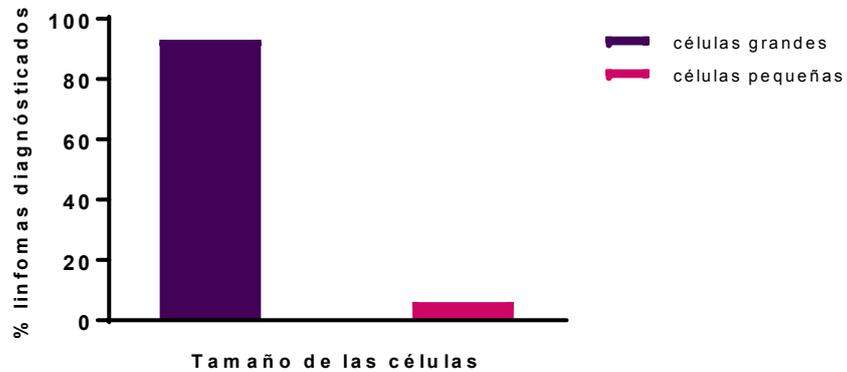
Tabla 1. Tamaño e índice mitótico de las células neoplásicas

	Linfoma de células grandes	Linfoma de células pequeñas
Alto índice mitótico	51,4% (n=37)	1,4% (n=1)
Bajo índice mitótico	22,2% (n=16)	4,2% (n=3)
Moderado índice mitótico	8,3% (n=6)	0
Sin datos del índice mitótico	11,1% (n=8)	1,4% (n=1)
Total	93% (n=67)	7% (n=5)

Este estudio mostró por un lado que el porcentaje de casos con linfoma de células grandes fue significativamente superior al de casos de linfoma de células pequeñas 93 % versus 7 % (Fig. 2). El análisis de frecuencia para la determinación de los tipos de linfoma canino se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

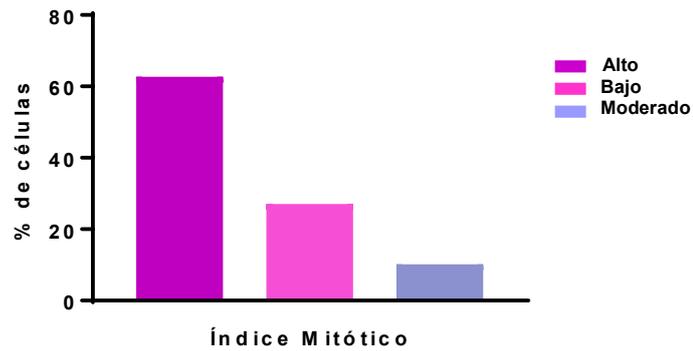
$$\text{Frecuencia de tipo de Linfoma Canino \%} = \frac{\text{Tipo de linfoma}}{\text{Total de tipos de linfomas canino}} \times 100$$

Fig. Tipos de Linfoma según el tamaño de las células neoplásicas



Por otro lado, en los casos de linfoma de células grandes se observó un alto índice de mitosis (62,71 %), como se muestra en la Fig. 3.

Fig 3. Índice Mitótico en los casos de Linfoma de células grandes



El número de caninos con linfoma de acuerdo al sexo fue de 49 hembras y 42 machos; es decir 53,85 % en hembras frente a un 46,15 % en machos (Fig. 4).

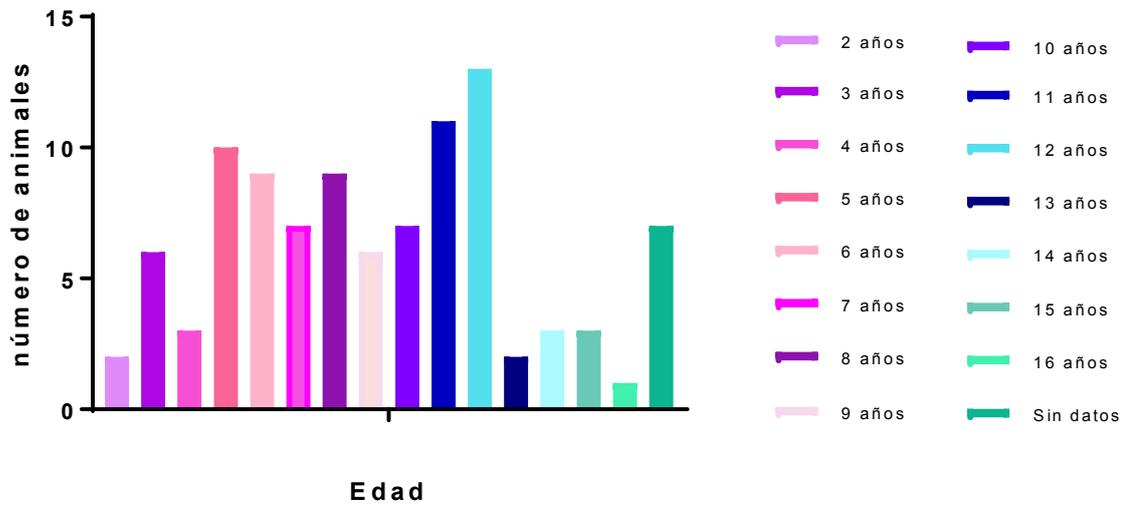
Fig. 4. Distribución de los casos de acuerdo al sexo de los caninos.

Porcentaje de animales con linfoma de acuerdo al sexo



Las edades de este grupo de animales oscilaron entre 2 y 16 años, con un valor medio de 9 años. En cuanto a las frecuencias de aparición según la edad, la mayor frecuencia de linfoma se observó a los 12 años: 14,60 % (13/89) (Fig. 5).

Fig. . Frecuencia de Linfoma de acuerdo a la edad



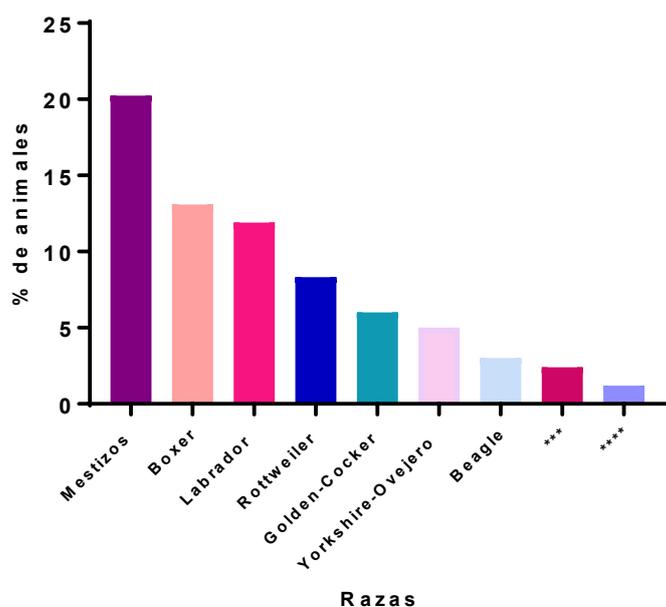
El 58,43 % de los casos con linfoma se presentó en caninos mayores a 7 años de edad, el 39,32 % entre los mayores a 2 años y menores o igual a 7 años, solo el 2,25 % en los menores a 2 años (Tabla 2.).

Tabla 2. Distribución de los casos de acuerdo a la edad de los caninos

Edad	N° casos c/Linfoma
≤ 2 años	2
> 2 años ≤ 7 años	35
> 7 años	52
Sin datos	7

En cuanto a la frecuencia de aparición en las distintas razas, el mayor porcentaje correspondió a Mestizos 20,23 %, Boxer 13,09 %, Labrador 11,90 %, Rottweiler 8,33 %, Golden y Cocker 7,14 % (Fig. 6).

Fig. 6. Distribución de los casos de acuerdo a las razas.



*** Dogo Argentino - Dogo de Burdeo – Galgo

**** Pitbull-Fox Terrier-Jack Russell-Pastor Alsaciano-Schnauzer miniatura- Border Collie- Collie-Maltés

Descripción de las características celulares de los preparados citológicos de los casos seleccionados.

Observación al microscopio óptico

Estudio citológico de linfonódulos con características neoplásicas (linfoma). Se observó un incremento del porcentaje de células inmaduras. En estas células se observaron además diversos grados de malignidad entre los que se incluyen: macrocariosis, anisocariosis, múltiples nucléolos evidentes, anisonucleosis y múltiples figuras mitóticas aberrantes. También se observó un aumento de núcleos desnudos y de cuerpos linfoglandulares. En las imágenes 1, 2, 3 y 4 se muestran preparados de los casos estudiados donde se observa: abundante celularidad con predominio de una población

uniforme de células redondas linfoides en monocapa. Las imágenes permiten diferenciar entre núcleo y citoplasma.

En las imágenes 5 a 12 se muestran los casos de linfoma: se observó la presencia de más del 50 % de células inmaduras de la población total y cuerpos linfoglándulares numerosos. Los linfocitos presentaron aumento de la relación núcleo-citoplasma, abundantes mitosis, figuras mitóticas aberrantes, núcleos desnudos, nucléolos evidentes, vacuolización del núcleo, núcleos indentados y con cromatina dispersa finamente granular.

Imágenes de los casos estudiados de linfoma.

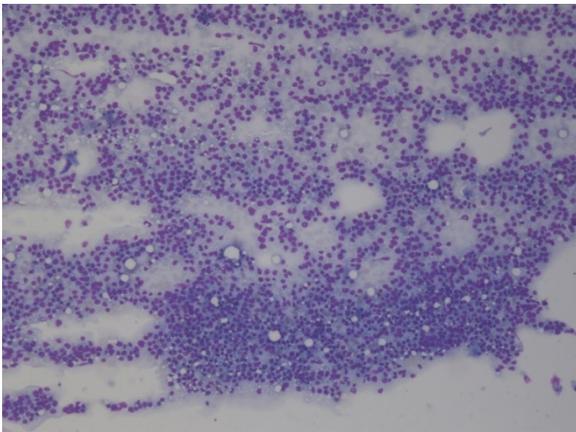


Imagen 1: Población homogénea de células redondas. Abundante cantidad de células en monocapa. La imagen permite diferenciar entre núcleo y citoplasma. Tinción 15[®] Obj. 4 X.

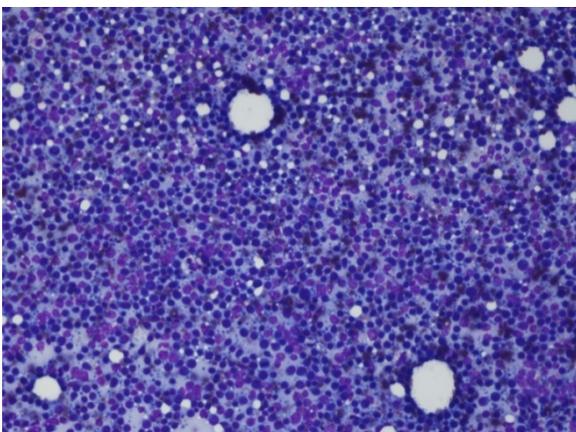


Imagen 2: Población homogénea de células redondas. Escasa cantidad de material lipídico de fondo. La imagen permite diferenciar entre núcleo y citoplasma. Tinción 15[®] Obj. 4 X.

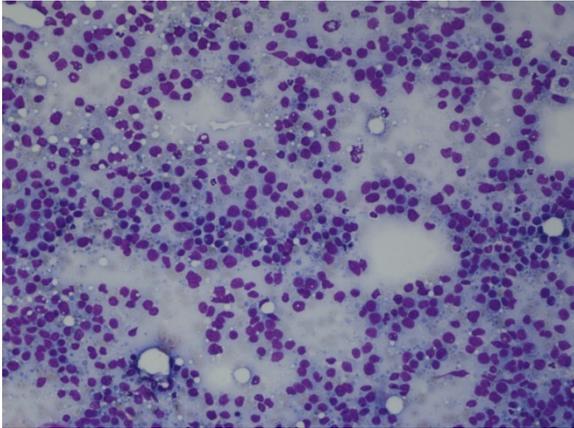


Imagen 3: Población de células linfoides. Tinción 15[®] Obj. 10 X.

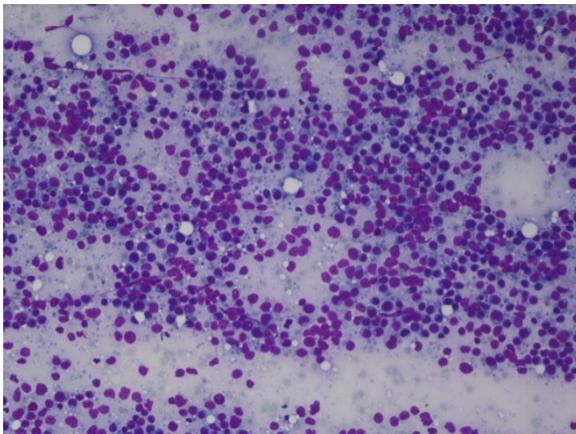


Imagen 4: Población de células linfoides. Tinción 15[®] Obj. 10 X.

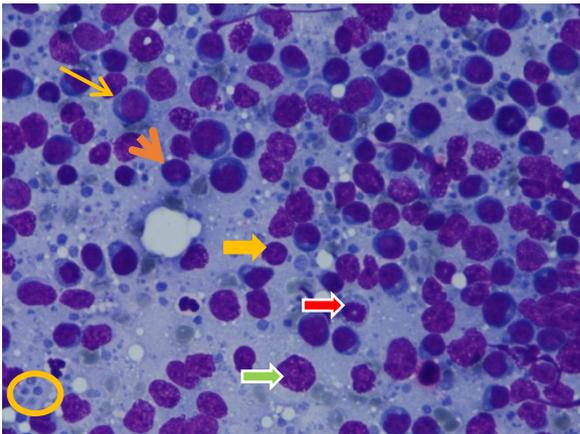


Imagen 5. Linfoma.

Linfoblastos (), prolinfocitos () y linfocitos (). Núcleos desnudos () y cuerpos linfoglandulares (). Figuras mitóticas aberrantes (). Tinción 15[®] Obj. 20 X.

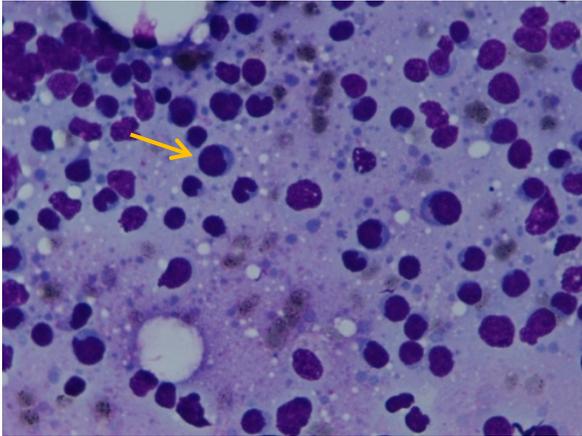


Imagen 6. Linfoma. Abundante cantidad de linfoblastos. Tinción 15[®] Obj 20 X.

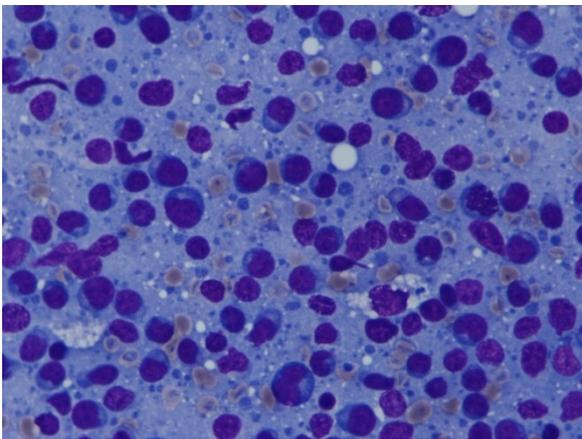


Imagen 7. Linfoma. Abundantes linfoblastos con anisocariosis y macrocariosis. Alteración de la relación núcleo-citoplasma. Tinción 15[®] Obj. 20 X.

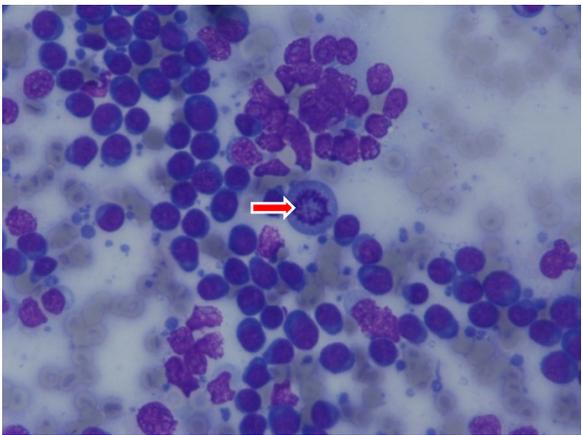
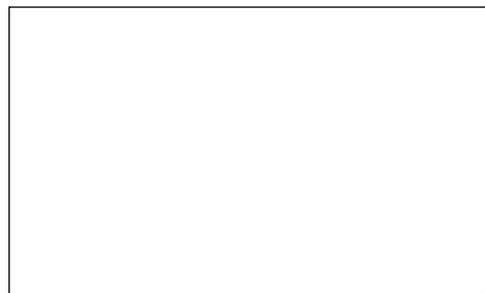
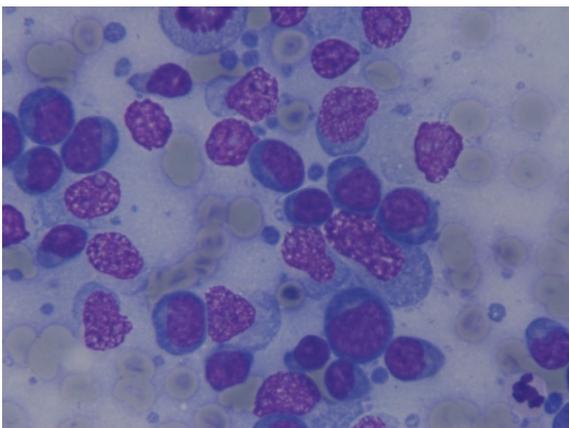
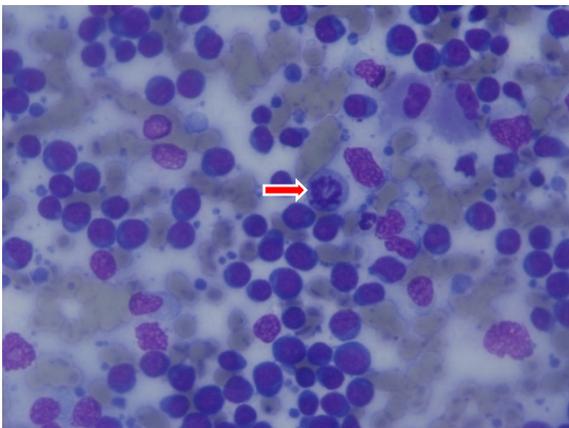
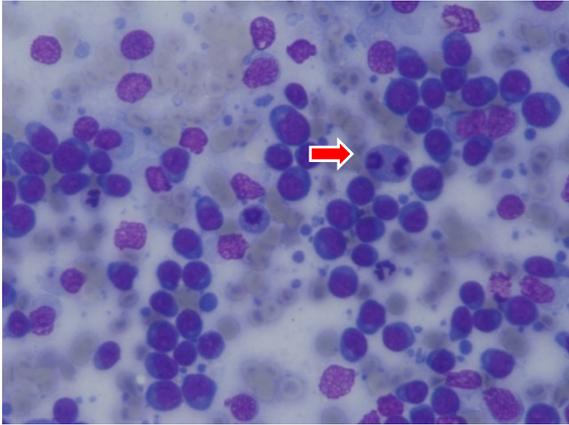
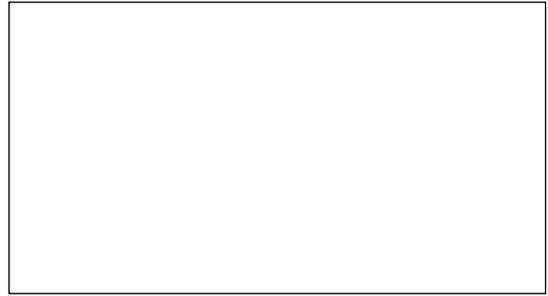
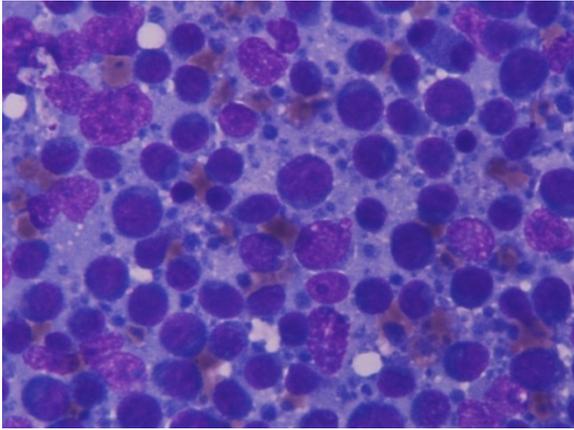
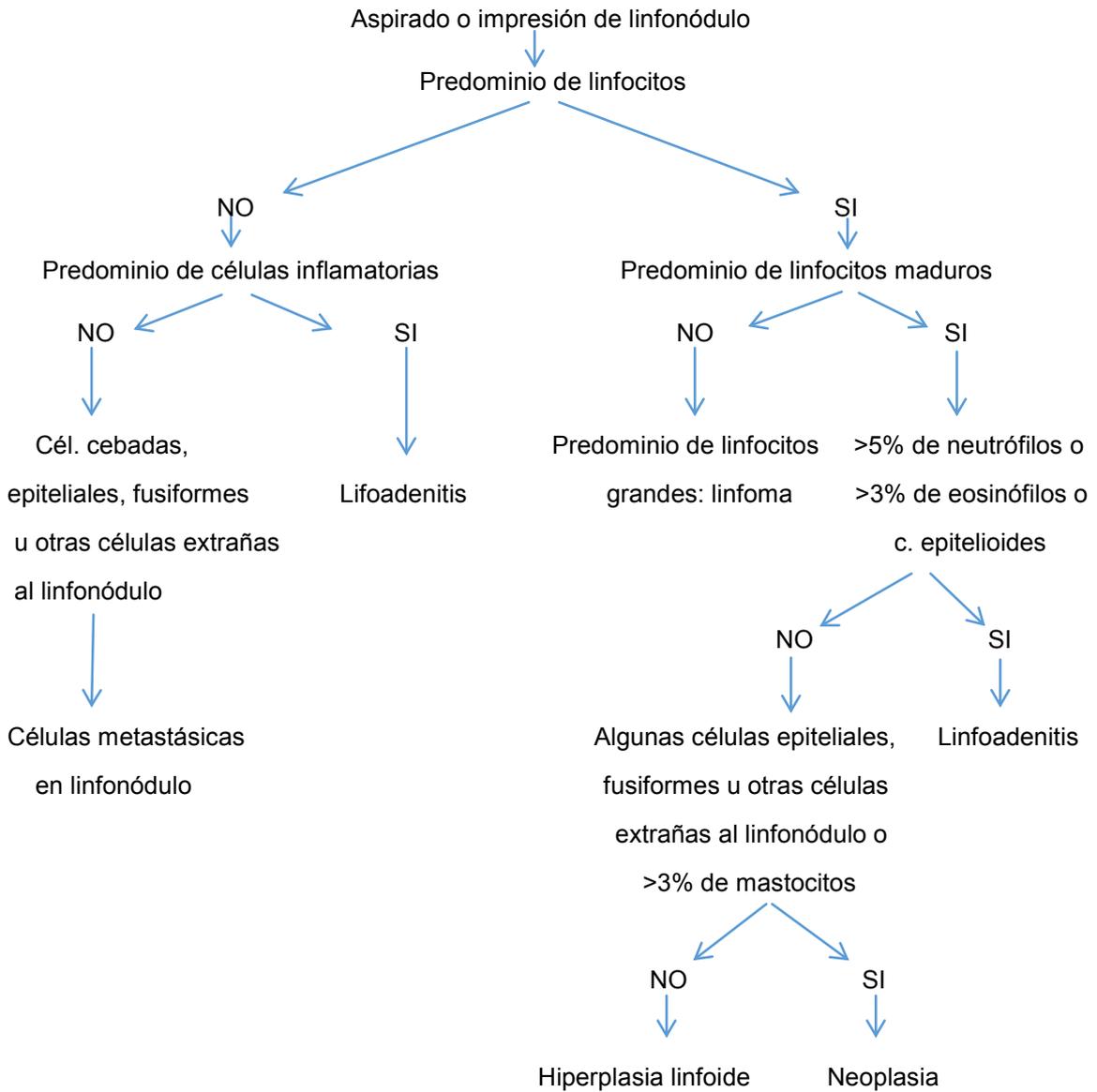


Imagen 8. Linfoma. Figura mitótica aberrante. Tinción 15[®] Obj. 20 X.





Algoritmo de diagnóstico de linfoma canino.



V. DISCUSIÓN

El linfoma canino es una neoplasia hematopoyética que abarca diversos tipos histológicos, con comportamiento biológico definido por la morfología celular y las características tisulares (Valli, 2010).

En el perro es el tercer tipo de cáncer más frecuente y representa aproximadamente del 7 al 24 % de todas las neoplasias caninas y el 83 % de las neoplasias hematopoyéticas (Vail, 2009). Asimismo, esta enfermedad es de gran interés por su aumento creciente en los últimos años, tanto a nivel animal como humano (Rivas, 1998). Además, entre los tumores hemolinfáticos representan el 80 % de hemopatías malignas.

Nuestros resultados muestran que el 68,08 % de los casos analizados fueron diagnosticados como linfoma por citología. Lo que muestra el valioso aporte de la citología para el diagnóstico de linfoma, como lo indican algunos autores (Qizilbash, 1985; Fournel-Fleury, 1997), que destacan la posibilidad de realizar diagnósticos muy específicos en base a la observación de preparados obtenidos por punción.

En cuanto a la edad de presentación encontramos que en el grupo de caninos estudiados fluctúa entre 2 y 16 años, con un valor medio de 9 años. Este hallazgo es coincidente con los resultados presentados por numerosos estudios que indican que la edad de presentación es en animales entre 6 a 12 años de edad, en tanto Vezalli en 2009, en un estudio retrospectivo de clasificación de 171 casos de linfoma, determinó una variación desde 2 hasta 13 años (media 7,5).

La mayor frecuencia de linfoma observada fue a los 12 años: 14,60 % (13/89). Este resultado se asemeja al indicado por Vail en 2009: 84 % en perros de 10 a 11 años de edad, a diferencia de otros autores que hallaron mayor presentación entre los 5 a 6 años (Moulton, 1978). Por otro lado, el 1,5 % de los casos se presentó en perros menores de 1 año, como también lo ha descrito Morris en 2002.

Al comparar los rangos de edad de presentación, observamos que el 58,43 % de los casos de linfoma se presentó en caninos mayores a 7 años de edad y el 39,32 % entre los mayores a 2 años y menores o igual a 7 años, y solo el 2,25 % en los menores a 2 años.

La presentación en animales jóvenes es más agresiva y de mal pronóstico, como es para el caso del linfoma a células grandes (linfomas, en los que los linfocitos tienen diámetros grandes, núcleos vesiculares y nucléolos prominentes en comparación con

aquellos de linfomas linfocíticos o indiferenciados), que a menudo afecta a un grupo de edad más joven, media de cuatro años.

En cuanto al sexo del animal, para el caso de esta neoplasia hemos hallado 53,85 % en hembras frente a un 46,15 % en machos, coincidentemente con otros autores que han reportado que la incidencia es la misma para hembras y machos (Elgue, 2012). Un menor riesgo ha sido descrito en hembras intactas (Priester, 1971), pero la mayoría de las descripciones demuestran que el género no es un factor de riesgo importante (Parodi, 1977; Priester, 1980). Sin embargo, en un estudio retrospectivo de 186 casos de linfoma canino, realizado en Londrina, Estado de Paraná (Brasil), se concluyó que en algunas razas definidas como Pastor Alemán, Rottweiler, Bóxer y Cocker Spaniel Inglés, el género podría influenciar para la aparición del linfoma, siendo la edad media de presentación de dicho estudio de 5,9 años.

En cuanto a condición racial, existe predisposición por ciertas razas como Bóxer (Priester, 1980), Rottweiler, Terrier Escocés, Basset Hound, Airdale Terrier, Chow Chow, Pastor alemán, Poodle, San Bernardo (Rosenthal, 1982), Bulldog Inglés, Beagle, Cobrador Dorado (Alvarez, 2011) y Scottish Terrier (Moulton, 1978). En un estudio retrospectivo realizado en Paraná, se determinó que las razas cruzadas tuvieron una mayor presentación que las razas puras. Así mismo, Vezalli en 2009 determinó que las razas cruzadas son las que presentan mayor frecuencia, seguido por los de raza Pastor Alemán 20,96 % (26/124). Nuestro estudio mostró, coincidentemente con las publicaciones citadas respecto a la frecuencia de aparición en las distintas razas, el mayor porcentaje correspondió a Mestizos 20,23 %, Boxer 13,09 %, Labrador 11,90 %, Rottweiler 8,33 %, Golden y Cocker 7,14 %.

La necesidad de un diagnóstico precoz (Carter y col., 1986, 1988; Jacobs, 1988; Hawkins y col., 1993; Fisher y col., 1995; Caniatti y col., 1996) con promoción de los métodos citológicos se perfila como imprescindible en esta enfermedad, dado que cuando se la diagnostica en estadios avanzados, el tratamiento paliativo con quimioterapia tiene poca utilidad (Rivas, 1998).

En este trabajo hemos observado en el estudio citológico de los casos con linfoma, linfoblastos con marcados criterios de malignidad: anisocariosis, macrocariosis, nucléolos evidentes, núcleos desnudos, figuras mitóticas aberrantes y alteración de la relación núcleo-citoplasma, similar a lo descrito en la bibliografía consultada.

VI. CONCLUSIONES

- La actualización bibliográfica permanente permite conocer nuevos aspectos de los linfomas, aportando nuevas herramientas para su diagnóstico precoz.
- El estudio retrospectivo de los linfomas diagnosticados en el Servicio de Anatomía Patológica del Laboratorio de Patología Especial de la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLP aportó información acerca de la presentación de linfomas en caninos en nuestro medio. En este sentido se observó que la edad promedio fue de 9 años, que hubo predisposición por animales de raza y no observándose diferencias en cuanto al sexo.
- El estudio citológico es un método de fácil aplicación, de bajo costo y de rápidos resultados para el diagnóstico de linfoma.
- El estudio de las características celulares de los preparados citológicos de los casos seleccionados valida la importancia del citodiagnóstico como herramienta eficiente para el diagnóstico de linfoma y proporciona elementos útiles para su clasificación, pronóstico y terapéutica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez Berger F. 16 de Agosto 2011. Linfoma en perros. *OncologíaVet.* 2011; 19: 52. [Online] <http://www.oncologiavet.blogspot.com.ar/2011/08/linfoma-en-perros.html>.
2. Banks WJ. Lymphatic system and immunity. En: *Applied Veterinary Histology.* Third Ed. Mosby year book, U.S.A., 1993; p. 87 and 283-288.
3. Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF. Canine lymphoma: immunocytochemical analysis off fine-needle aspiration biopsy. *Vet. Pathol.* 1996; 204-212.
4. Carter RF, Valli VE, Lumsden JH. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. 1986; 154-164.
5. Chuaqui BJ, González BS. Tumores de tejidos linforreticulares y hematopoyéticos. En: *Manual de Patología general.* Pontificia Universidad Católica de Chile, 2011. Disponible en: http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_099.html.
6. Couto C, Gullen J, Pedroia U, Turrel J. Central Nervous System lymphosarcoma in the dog. *J Am Vet Med Ass.* 1984; 809-813.
7. Couto C. Linfoma no cão e no gato. En: Nelson R, Couto C (eds). *Medicina interna de pequenos animais.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 2001; 882-889.
8. Dhaliwal R, Kitchell B. Canine lymphosarcoma: clinical features. *Compendium.* 2003; 572-580.
9. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. The anatomy of the immune response. En *Roitt's Essential Immunology*, 13th Edition. UK, Ed. Wiley, 2017; 168-182.
10. Donald Mc Gavin, Zachary J. *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* 4ta Ed. USA: Mosby, 2007; 724.
11. Elgue V, Piaggio J, Amaral C, Pessina P. Factores asociados del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria de Uruguay. Montevideo, 2012; 25-30.
12. Ettinger SN. Principles of treatment for canine lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003; 92-97.
13. Feller AC. Splenic architecture reflected in the connective tissue structure of the human spleen. *Experientia.* 1985; 164-167.

14. Fisher D, Naydan D, Werner L. Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirates and needle biopsy samples, *Vet Clin Pathol.* 1997; 66-69.
15. Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Marchal T, Chabanne L, Delverdier A, Bryon PA, Feldman P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: Comparison with human Non-Hodgkin's lymphomas. *J. Comp. Path.* 1997; 35-59.
16. Fujita T, Casímura M, Adachi K. Scanning electron microscopy and terminal circulation of the spleen. *Experientia.* 1985; 167-179.
17. Gall EA, Mallory TB. Malignant Lymphoma: A Clinico-Pathologic Survey of 618 Cases. *Am J Pathol.* 1942; 381-429.
18. García RL, Bueno A, Feijoó E, Robledo M, Echezarreta G, Ortíz F, Benitez 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; 621-625.
19. 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.
20. Gear R. Practical update on canine lymphoma. Classification and diagnosis. In *Practice.* 2009; 380-384.
21. Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H. Growth fractions in malignant non-Hodgkin's Lymphomas as determined in situ with monoclonal antibody Ki67. *Haematol. Oncol.* 1984; 2: 365-371.
22. Hahn K, Freeman K, Barnhill M. Serum alpha 1 – acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with lymphoma treatments with doxorubicin, *J Am Vet Med Assoc.* 1999; 2: 1023-1025.
23. Harris NL, Jaffe ES. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia. *Histopathology.* 1997; 69-89.
24. Hawkins EC, Morrison WB, DeNicola DR, Blevins WE. Cytologic analysis of bronchoalveolar fluid from 47 dogs with multicentric malignant lymphoma. *J Am Ves Mcd Assoc.* 1993; 1418-1425.
25. Henry K. Thethymus gland. *Systeinic Pathology*, 38 edición. EJ. Churchill-Livingstone. New York, 1992; 2-140
26. Isaacson PG, Spencer J. Malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue. *Histopathol.* 1989; 445-462.
27. Jacobs RM. Diagnostic cytology. *Sem VaMcd Surgery Small An.* 1988; 83-182.

28. Jubb, Kennedy and Palmer's. Pathology of Domestic Animals. 6th Edition. 2016; 3: 215-243.
29. Kaeene J, Miller R. Re-analysis of 2,4-D use and the occurrence of canine malignant lymphoma, Vet Hum Toxicol. 1999; 164-170.
30. Kaiserling E. Non-Hodgkin Lymphom, Ed Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York, 1977; 1: 10-155.
31. Kay NE, Ackerman SK, Douglas SD. Anatomy of the immune sistem. Semin. Haematol. 1979; 252-282.
32. Knapp W, Dorken B, Glis WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, Von dem Borne AEG. Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Ed Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio, 1989; 128-138.
33. Lennert K, Feller A. Histopathology of non Hodgkin lymphoma (based on the update Kiel classification), 2a ed. Berlín: Springer-Verlag. 1990.
34. Linch DC, Kott LJ, Rodeck CH, Huens ER. Studies of circulating haemopoyetic progenitor in human fetal blood. 1982; 976-979.
35. Madewell B. Hematological and bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphoma, J Am Anim Hosp Assoc. 1986; 235-240.
36. Miller JFAP. Celular interactions in immune response. Semin Haematol. 2002; 282-292.
37. Mitchel J, Nossal GJV. Localization and fate off foregeing antigens in tissues. Immunological Diseases. Max Sanders ED. Londres, 1978; 1: 22-34,
38. Moriarty AT, Banks ER, Bloch T. Cytologogic criteria for subclassification of Hodgkin's disease using fine needle aspiration. Diagnostic Cytopathology. 1989; 122-125.
39. Morris J, Dobson J. Diagnóstico y estadificación. En: Oncología en pequeños animales. Buenos Aires: Ed Intermedica. 2002; 13-26.
40. Moulton J. Tumors in domestic animals. 2nd ed. Berkeley, USA: California, 1978; 465.
41. Obeso G, Sanz ER, Rivas C, Marcos BG, Delgado R. B-cell follicular lymphomas. Clinical and biological characteristics. Leukemia-Lymphoma. 1994; 105-111.
42. Ortiz-Masllorens E. Iniciación a la Inmunología. Ed. Ibáñez. Plaza Asoc. S.L. Madrid, 1997; 1-24.
43. Padilla M. Clasificación de los linfomas. pasado, presente y futuro. Rev Inst Med. 2009; 134.

44. Parodi AL. Classification of Malignant Lymphoma in Domestic Animals: History and Conceptual Evolution *European Journal of Veterinary Pathology*. 2001; 43-50.
45. Pennimpede E, Gomez C, Stanchi N. *Introducción a la Inmunobiología*. (1ra ed.) Editorial EDULP. 2004
46. Priester W, McKay F. The occurrence of tumors in domestic animals, *National Cancer Institute Monogr*. 1980; 1-210.
47. Priester WA, Mantel N. Occurrence of tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *J Natl Cancer Inst*. 1971; 1333-1344.
48. Puicón VN, Sandoval NC, Gouveia DW. Clasificación Histopatológica de Linfomas Caninos en la Casuística del Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (1996-2012) *Rev Inv Vet Perú*, 2014; 508-515.
49. Qizilbash AH, Elavathil LJ, Chen V, Young JEM, Stuart DA. Aspiration biopsy cytology of lymph nodes in malignant lymphoma. *Diagnostic Cytopathology*. 1985; 1: 18-22.
50. Quesenberry P, Levitt L. Haematopoietic stem cells. *N Eng J Med*. 1979; 755-760.
51. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. *Atlas of Tumor Pathology*. Vol. Section III. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1966.
52. Reif J, Lower K, Ogilvie G. Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma, *Am J epidemiol*. 1995; 352-359.
53. Rivas CS. Linfomas Caninos. Estudio óptico, electrónico e inmunohistoquímico. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria Universidad Complutense de Madrid. 1998.
54. Robbins y Cotran. *Patología Estructural y Funcional*. 9a. Ed Booksmedicos.org. 2017; 1: 586-621.
55. Roitt IM. *Essential immunology*. Ed. Blackwell sci. Oxford, 1988; 134-153.
56. Rojo JN, Janeway CA. The Biologic activity of anti-T cell receptor V región monoclonal antibodies is determined by the epitope recognized. *J. Immunol*. 1988; 1081-1088.
57. Romani A, Sant' ana FJ. Linfossarcoma multicêntrico em um cão relato de caso. *Ciência Animal Brasileira*. Goiânia, 2005; 223-225.
58. Rosenthal RC. Epidemiology of canine lymphosarcoma. *The Compendium on Continuing Education*. 1982; 855-858.

59. Ryser JE, Vassalli P. Mouse Bone Marrow Lymphocytes and their differentiation. *J. Immunol.* 1974; 719-728
60. Safran N, Perk K, Eyal O, Dahlberg JE. Aislamiento y caracterización preliminar de un nuevo retrovirus aislado de un perro leucémico. *Res Vet Sci.* 1992; 250-255.
61. Spencer J, McDonald T, Fina T, Isaacson PG. The development of gut associated lymphoid tissue in the terminal ileum of fetal human intestine. *Clin Exp Immunol.* 1986; 536-543.
62. Spencer J, Finn T, Isaacson PC. A comparative study of the gut associated lymphoid tissue in primates and rodents. 1986; 509-519.
63. Teske E, Egberink H. Clustering in canine malignant lymphoma. *Vet Q.* 1994; 134-136.
64. Vail D, Ogilvie G. Neoplasias Linfóides. En: Birchard, SJ.; Sherding, R. G. *Manual Saunders Clínica de Pequeños Animais.* 2 ed. São Paulo, 2003; 227-236.
65. Vail D, Young K. En: Withrow S. *Oncología Clínica de pequeños animales.* 4ed. Saunders Elsevier. España, 2009; 685-711.
66. Vail D, Thamm D. Tumores hematopoyéticos. En: Ettinger S. Feldman E. *Tratado de Medicina Interna veterinaria, enfermedades del perro y el gato.* 6ª Edición. Elsevier Company. España, 2007; 732-790.
67. Valli V, Caswell J, Jacobs R, Parodi A. Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals, Washington: Armed Forces Institute of Pathology and the World Health Organization. 2002. <http://www.worldcat.org/title/histological-classification-of-hematopoietic-tumors-of-domestic-animals/oclc/50469953>.
68. Valli V, Caswell J, Ramos-Vara J. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Vet Pathol.* 2010; 198.
69. Valli V. *Veterinary comparative hematopathology.* 5a ed. USA: Blackwell Publishing. 2007; 119-360.
70. Valli VE, San Myint M. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Veterinary Pathology.* 2011; 198-211.

71. Vela Casas F. Linfomas no-Hodgkin y enfermedad de Hodgkin. *Pediatr Integral*. 2004; 475-486.
72. Veldhoen N, Stewart J, Brown R. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53. *Oncogene*. 1998; 249-255.
73. Vezzali E, Parodi A, Marcato P. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2009; 1: 38-49.
74. Vonderhaar BK. *Pharmacol. Ther.* 1998; 169-178.
75. Wilkerson JA. Intraoperative cytology of lymph nodes and lymphoid lesions. *Diagnostic Cytopathology*. 1985; 1: 46-51.
76. Wolf BC, Neiman RS. Disorders of the spleen. Ed. WB. Saunders Company Philadelphia, 1989; 3-30.