

# Informe final publicable de proyecto

## Linfomas caninos B y T: Evaluación de la clonalidad, valoración de síndromes paraneoplásicos asociados y factores vinculados al tratamiento y pronóstico

Código de proyecto ANII: FMV\_3\_2020\_1\_162741

15/08/2023

**SÁNCHEZ SOLÉ, Rosina** (Responsable Técnico - Científico)

**BREIJO DOTTA, Martín Andres** (Investigador)

**JARK, Paulo César** (Investigador)

**PESSINA SERDIO, Ana Paula** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE VETERINARIA (Institución Proponente) \\  
FACULTAD DE VETERINARIA. FUNDACIÓN MARCO PODESTÁ

## Resumen del proyecto

El linfoma es uno de los tumores malignos más comunes en el perro y de causa multifactorial. Representa el 7-24% de todas las neoplasias caninas y el 80% de los tumores hematopoyéticos. La clasificación inmunofenotípica es usada para determinar el tipo celular responsable de la enfermedad (linfocitos B, TCD45+, TCD45-), el cual se correlaciona con la malignidad del tumor. Actualmente, la Facultad de Veterinaria (UdelaR) realiza la inmunofenotipificación de los linfomas mediante citometría de flujo. Esto representó un avance significativo en el diagnóstico y tratamiento de los linfomas caninos, y nos permitió constatar que la frecuencia de linfomas de peor pronóstico (fenotipo TCD45+) superó lo reportado a nivel internacional. Este proyecto nos permitió profundizar en el diagnóstico de la enfermedad poniendo a punto técnicas no disponibles en Medicina Veterinaria en Uruguay, como la apreciación de la clonalidad por PCR-PARR, la evaluación del MHC-II y Ki-67 por citometría de flujo, y la determinación de gammapatías por electroforesis capilar. Estas herramientas nos permitieron determinar con mayor certeza el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Por otra parte, la respuesta al tratamiento de los linfomas es limitada, presentando los pacientes con linfoma T de alto grado sobrevividos significativamente más cortos, que los pacientes con linfoma B. En el presente evaluamos el nivel de expresión del gen MDR-1 (multidrug resistance) en pacientes con linfomas de distinto fenotipo, cuya sobreexpresión podría estar vinculada a respuestas terapéuticas pobres o insuficientes. A partir de muestras de pacientes caninos con diagnóstico de linfoma que asistieron al Hospital de Facultad de Veterinaria estudiamos nuevas variables que definen mejor el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento del linfoma multicéntrico canino. Nuestros resultados permitieron mejorar el manejo terapéutico de la enfermedad y nos permitieron brindarles a los médicos veterinarios tratantes nuevas herramientas con gran valor en la toma de decisiones.

**Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Oncología en pequeños animales**

**Palabras clave: síndromes paraneoplásicos / clonalidad / pronóstico /**

## Introducción

La aparición de neoplasias es un problema frecuente en la práctica veterinaria dada la longevidad alcanzada en animales de compañía. El linfoma es un tumor maligno linfoide que se origina en órganos sólidos (linfonódulos, hígado y bazo) y representa una de las neoplasias malignas más comunes (Ratcliffe y col., 2009), comprendiendo del 7 al 24% del total de neoplasias caninas (Withrow y col., 2013). Es además la neoplasia hematopoyética más frecuente en esta especie (Meza y García, 2014). Se ha sugerido que el linfoma canino muestra fuertes similitudes con el Linfoma no-Hodgkin (LNH) humano, basados especialmente en la genética tumoral, la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (Marconato y col., 2012; Seelig y col., 2016). En ambas especies la incidencia de esta neoplasia ha aumentado significativamente en las últimas décadas, por lo que se han puesto mayores esfuerzos vinculados a su diagnóstico y tratamiento (Seelig y col., 2016).

Generalmente en perros, los linfomas se caracterizan por presentar una linfadenopatía generalizada (linfonódulos superficiales y profundos), afectando eventualmente el parénquima hepático, el esplénico y/o la médula ósea (Marconato y col., 2012). La presentación clínica del linfoma puede acompañarse de determinados síndromes paraneoplásicos, cuyo monitoreo puede ser de utilidad en el manejo clínico de la enfermedad. Se ha reportado que la hipercalcemia y las gammapatías son algunos de los síndromes más frecuentes en el perro. La hipercalcemia podría estar asociada a la producción de un péptido similar a la parathormona por parte de los linfocitos TCD4 neoplásicos (Ruslander y col., 1997), aunque también se ha reportado hipercalcemia en linfomas B. Por otra parte, las gammapatías se han observado en perros con mieloma múltiple, plasmocitoma esplénico y hepático y con linfoma (Tappin y col., 2011). Como resultado de la proliferación clonal de linfocitos B se detecta la producción una única inmunoglobulina o una única subunidad (Giraudel y col., 2002). Las gammapatías se han descrito en varios trastornos de linfocitos B y T en humanos (Mims, 2018). Sin embargo, en caninos con linfoma pocos informes describen variaciones en las fracciones proteicas, y ninguno de ellos considera inmunofenotipo (Gavazza y col., 2009; Tappin y col., 2011). Si bien las gammapatías se asocian a enfermedades linfoproliferativas, algunas enfermedades de causa infecciosa también pueden presentarlas (Giraudel y col., 2002; De Caprariis y col., 2009).

En los últimos años, la citometría de flujo se usa de forma rutinaria para determinar el fenotipo de linfomas y leucemias en medicina veterinaria, al proporcionar datos objetivos sobre el tamaño de las células y el nivel de expresión de los antígenos, así como también colabora en el diagnóstico de casos ambiguos (Gelain y col., 2008). Se ha reportado tanto en

caninos como en humanos que la incidencia del linfoma B es ampliamente superior (80-85% de los casos) a los linfomas originados a partir de linfocitos T (Anoliek y col., 2014, Seelig y col., 2016). Dentro de los linfomas T se han descrito diferentes subtipos con diferentes grados de agresividad. La mayoría de los linfomas T son CD4+ CD45+, de alto grado, con un curso de enfermedad agresivo, mientras que una minoría suelen ser linfomas T CD4+ CD45-, denominados linfomas de zona T, de bajo grado y con un pronóstico mucho más favorable (Avery y col., 2014). Recientemente, en la Facultad de Veterinaria, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado la inmunofenotipificación por citometría de flujo como herramienta para el diagnóstico de los linfomas, pudiéndose ahora establecer el origen celular de los linfomas caninos en Uruguay. Hemos evidenciado que en nuestro país hay una mayor proporción de linfomas T agresivos (TCD45+) respecto a lo reportado internacionalmente. Estos avances ayudaron al clínico veterinario en la toma de decisiones terapéuticas y pronósticas de sus pacientes.

Actualmente el uso de esta técnica se ha visto expandido gracias a la búsqueda de marcadores de valor pronóstico. En este sentido, la baja expresión de MHC-II evaluada por citometría de flujo demuestra ser un fuerte predictor de mal pronóstico en los linfomas B caninos, tal como ya había sido reportado en humanos (Rimsza y col., 2004; Veelken y col., 2007; Rao y col., 2011; Poggi y col., 2013; Poggi y col., 2016). Sin embargo, en el linfoma de células T la expresión es variable. Respecto a los linfomas T CD45+/CD4+, la mayoría son presentan baja expresión de MHC II (Avery y col., 2014; Deravi y col., 2017; Harris y col., 2019). Por analogía con los trastornos linfoproliferativos de células T humanas, estas características sugieren que la contraparte normal de esta neoplasia es una célula T que ha completado su maduración y es un timocito simple positivo o un linfocito T periférico maduro (Han y Bueso-Ramos, 2007). Dentro de los TCL existen subgrupos minoritarios (CD8+ y CD4/CD8—), en los cuales los niveles de expresión de MHC II no varían con respecto a los linfocitos neoplásicos CD4+, ni afectan la sobrevida, asociándose a pronósticos pobres con sobrevidas similares a las reportadas para TCL CD4+ (Harris y col., 2019, 2020). Estos autores presumen que los TCL CD4?CD8?, quienes presentaron niveles de MHC II menores respecto a los CD8+, pueden surgir de un precursor tímico antes de la expresión de CD4 y CD8, mientras que los TCL CD4+ surgen de un timocito ligeramente más maduro que se ha comprometido con el linaje CD4. El fenotipo descrito para el linfoma T CD45-, se caracteriza por expresar altos niveles de MHC II, CD25 y CD21, todos los cuales apuntan a un fenotipo activado (Avery y col., 2014; Seelig y col., 2014). Es importante resaltar que las comparaciones con la enfermedad humana deben hacerse con cautela porque en general la expresión de MHC II es constitutiva en perros (Doveren y col., 1985), aunque niveles de expresión pueden indicar activación celular (Out y col., 2002), mientras que es una característica exclusiva de las células T humanas activadas (Holling y col., 2002). Teniendo en cuenta que existen informes de casos de linfoma T de alto grado inmunofenotípicamente compatibles con el linfoma de la zona T (TZL, CD45-) (Paracchini winter y col., 2019), los niveles de expresión de CD21 y MHC II, que son componentes de muchos paneles de citometría de flujo, pueden colaborar en el diagnóstico, estableciendo o descartando el TZL. Como se describió anteriormente, la alta expresión de MHC II por citometría de flujo en caninos refleja una inmunovigilancia más conservada en linfomas B y también podría contribuir a una supervivencia más prolongada en algunos subgrupos de linfoma T (Rao y col., 2011; Avery y col., 2014). Por todo lo descrito anteriormente, y al no existir trabajos que comparen la expresión de este marcador entre fenotipos, en este proyecto nos propusimos como uno de nuestros objetivos determinar si la expresión de MHC-II estaba relacionada con los subgrupos de linfoma (LB, LTCD45+ y LTCD45?).

El uso del Ki67 como marcador diagnóstico y pronóstico en diversas neoplasias malignas humanas ha sido bien documentado (Brown y Gatter, 1990; Scholzen y Gerdes, 2000; Schwarting, 2000). En particular, en el linfoma no Hodgkin, se ha encontrado que Ki67 es un factor pronóstico independiente, evidenciándose una alta correlación entre el porcentaje de células positivas a Ki67 y el grado histológico (Grogan y col., 1988; Broyde y col., 2009; Ali y col., 2010). La literatura actual sugiere la combinación del inmunofenotipo y la determinación de Ki-67 por citometría de flujo (CF) como una herramienta confiable y complementaria a la citología, para clasificar los linfomas caninos (Poggi y col., 2015). En el linfoma canino la expresión de Ki67 ha mostrado una correlación significativa con el grado de malignidad (Fournel-Fleury y col., 1997b; Patruno y col., 2006; Poggi y col., 2015). Poggi y col. (2015) informaron por primera vez la determinación de KI67 por CF en linfomas caninos, indicando un punto de corte de 12,2% para distinguir entre linfomas de alto y bajo grado, independientemente del inmunofenotipo. Este trabajo describe un amplio rango de positividad Ki67 en linfomas caninos con diferencias entre categorías y cierta heterogeneidad dentro de los linfomas de alto grado, mostrando los linfomas de células T niveles más altos de Ki67. Esta heterogeneidad abre la puerta a un posible papel de Ki67 en la subclasificación de casos o en la estratificación de grupos pronósticos dentro de categorías específicas. Además, la presencia de linfomas de alto grado que muestran Ki67 bajo sugieren un posible papel de la determinación de Ki67 en la detección temprana de linfomas que se transforman de formas de bajo a alto grado.

Con la generación de nuevos conocimientos surgieron nuevas interrogantes y la necesidad continuar estudiando esta patología. En relación al diagnóstico, se hizo necesario contar con información adicional a través del desarrollo de técnicas complementarias. Por ejemplo, en medicina veterinaria existen algunos casos de linfoma donde hay cierta

ambigüedad diagnóstica, donde las técnicas morfológicas de rutina no permiten diferenciar las células linfocíticas neoplásicas de aquellas de origen inflamatorio (Lana y col., 2006). La detección de la clonalidad por la técnica de PCR-PARR (PCR for antigen receptor gene rearrangements) recientemente desarrollada en la Facultad de Veterinaria en el marco de este proyecto, permite esta diferenciación. La misma se basa en que los linfocitos B o T pertenecientes al mismo linaje contienen regiones de ADN únicas en longitud y secuencia (Lana y col., 2006). En las células B, esta región resulta de la recombinación de segmentos del gen V, D y J para producir la región CDR3 (región 3 determinante de complementariedad) que codifica la porción de unión a antígeno de la cadena pesada de inmunoglobulina. En las células T, la región CDR3 que codifica el receptor gamma de células T, se produce por recombinación de las regiones V y J. La detección de un pico monoclonal u oligoclonal por esta técnica es altamente sugestivo de linfoma (Burnett y col. 2003).

Se ha reportado que, los pacientes con linfomas T cuando son tratados con protocolos quimioterápicos preestablecidos tienen peor pronóstico y menor tiempo de supervivencia que los pacientes con linfoma B de alto grado (Teske y col., 1994; Valli y col., 2013). Es así que el protocolo CHOP (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, prednisona), usado de rutina para tratar los linfomas B, tiene menor éxito en linfomas T de alto grado (Marconato, 2011). Esta respuesta diferencial podría deberse a que los linfocitos T neoplásicos presentan una sobreexpresión del gen que codifica a la glicoproteína P (MDR-1), la cual disminuye la concentración intracelular de fármacos como la doxorubicina o vincristina, incluidos en los protocolos mencionados (Klimecki y col., 1994).

Basados en estos antecedentes, buscaremos profundizar en el diagnóstico de esta enfermedad en caninos y así contribuir a mejorar la calidad de vida de los animales de compañía. Finalmente, la información generada nos permite contribuir a la investigación traslacional de la clínica oncológica humana dada las similitudes existentes entre el linfoma de alto grado canino y el humano.

### **Metodología/diseño del estudio**

Toma de muestras: A cada paciente se le extrajo una muestra de sangre de la vena cefálica y tres biopsias por punción con aguja fina del tejido tumoral (linfonódulo) (linfoma B, n=15; linfoma TCD45+, n=15; LTCD45-, n=10), así como a pacientes eutanasiados por causas no oncológicas, que oficiaron como grupo control (n=10). Las muestras de tejido tumoral se dividieron en 3 submuestras. Una de ellas para realizar la citología y análisis de clonalidad por PCR-PARR. Otra submuestra para citometría de flujo (inmunofenotipo y marcadores pronósticos). La tercera submuestra se congeló y almacenó a -80°C; para evaluar la expresión del transcripto MDR-1 por PCR en tiempo real, acorde a la metodología previamente validada por nuestro grupo de trabajo (Pessina y col., 2012).

Citometría de flujo: Todas las muestras se procesaron dentro de las 12 horas de extraídas (Jalla y col., 2004). Los linfocitos se obtuvieron a partir de 50 microlitros de punción de linfonódulos (concentración 500.000-1.000.000 células totales, Suárez y col., 2015) incluyendo muestras con viabilidad celular superior al 80% (Ioduro de propidio, Thermo Fisher Scientific). El inmunofenotipo se determinó utilizando los marcadores de diferenciación linfocítica: CD3, CD4, CD5, CD8, CD21, CD34, CD45. Se analizaron, además, los marcadores pronósticos MHC II y Ki 67. Este último por ser intracelular, requirió un paso adicional de fijación y permeabilización (Citofix/Citoperm, BD) antes de ser incubado con el anticuerpo. La incubación de todos los anticuerpos se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (BIO-RAD), en un ambiente oscuro durante 45 minutos y a temperatura ambiente. A continuación, se realizó la lisis de eritrocitos, utilizando 1ml de buffer de lisis (Quiklysis, Visur), en oscuridad durante 10 minutos. Luego las células nucleadas estuvieron listas para ser adquiridas en el citómetro BD Accuri C6 (Becton Dickinson). Las muestras se analizaron en duplicado y junto a un tubo sin marcación que ofició de control negativo.

Determinación de transcritos de MDR-1: El ARN total se extrajo usando TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), se precipitó con LiCl para remover inhibidores de la síntesis de cDNA y se trató con DNase para remover ADN contaminante (Naderi y col., 2004). La reacción de transcripción reversa se realizó usando SuperScript III First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen, Carlsbad-CA) con primers no específicos. La concentración de RNA se determinó por absorbancia a 260 nm y la pureza e integridad del mismo a través de la relación de absorbancia 260/280 nm y por electroforesis. La cuantificación del transcripto se determinó en RT-PCR en tiempo real (Rotor-Gene™ 6000; Corbett Life Sciences, Sydney-Australia) usando SYBR green (Quantimix; Biotools, Madrid-Spain) y primers diseñados específicamente para el gen de interés, usando PRL19 y HPRT como controles internos. El número de ciclos requeridos para alcanzar la "threshold" (CT) se determinó para cada gen en cada animal. Los datos de expresión de mRNA del gen de interés se normalizaron respecto al gen usado como control interno ( $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{gen de interés}) - \Delta CT(\text{control interno})$ ) y se expresó en relación a la muestra utilizada como control positivo ( $\text{deltadeltaCT} = \Delta\Delta CT - \Delta\Delta CT(\text{control positivo})$ ), cuantificación relativa; Livak and Schmittgen, 2001).

Se realizó un Proc Univariate (SAS) para identificar "outliers" y verificar la normalidad de los residuales. Para el análisis de los datos se utilizó el procedimiento mixto (ProcMixed, Statistical Analysis System, SAS), incluyendo en el modelo el

grupo (sanos, linfoma B, Linfoma T CD45- y linfoma TCD45+), el sexo y su interacción, como efectos fijos y la corrida de PCR como efecto aleatorio. Los datos se presentarán como promedios±SEM. El nivel de significación será  $P < 0.05$

PCR-PARR: Para la extracción de células, las láminas post-tinción utilizadas para citología, se trataron con isopropanol según lo descrito por Márquez y col. (2011). Para la extracción de ADN se usó el método convencional descrito por Sambrook & Green (2012). La restauración del ADN se llevó a cabo según la metodología descrita por Márquez et al. (2011), incubando las muestras de ADN con Tris/HCL, MgCl<sub>2</sub>, Tritón 2%, dNTP y H<sub>2</sub>O. Posteriormente, se adicionó Taq-polimerasa (polimerización a 72°C, 20 minutos en incubadora) y luego se desnaturalizó a 95°C (5 minutos). El PCR-PARR se realizó según lo validado por Berczki y col. (2007). El programa de amplificación consistió en: desnaturalización inicial (5 minutos, 94°C); 35 ciclos 94°C 30 segundos, 54°C para linfomas T y 56°C para linfomas B, 30 segundos y 72°C, 30 segundos; y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para visualizar el resultado de la amplificación por PCR se utilizó electroforesis en gel de agarosa a 2% en Tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) con tinción Red Gel 10.000X. Las muestras de ADN se mezclaron con buffer Blue II 6 X antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a 80-100mV. Las bandas de ADN se visualizaron sobre un transiluminador UV (FOTODYNE, FOTO/Phoresis UV Transilluminator). De forma preliminar, además se evaluó la clonalidad por real time PCR, siguiendo los lineamientos de Langner y col. (2014).

Para evaluar la presencia de clonalidad se realizó estadística descriptiva.

Por otra parte las muestras de sangre se colocaron en tubos secos para la determinación de la calcemia y la búsqueda de gammapatías. La calcemia se valorará por espectrofotometría (Cb350i, Wiener-Rosario-Argentina) utilizando kits comerciales Wiener. La presencia de gammapatías se evaluó mediante la técnica Proteinograma electroforético capilar (Minicap, Sebia-Barcelona-España), utilizando kits comerciales Minicap Proteinó (Enol, Montevideo-Uruguay). Para evaluar la proporción de pacientes con gammapatías e hipercalcemia se utilizó el test de Fisher. Se realizaron correlaciones de Pearson para estudiar asociaciones entre varia

## Resultados, análisis y discusión

De los 47 perros con linfoma multicéntrico incluidos en el primer artículo que se desprendió de este proyecto, el fenotipo de células B se diagnosticó en el 55,3% de los casos. En cambio, el 42,5% de los linfomas fueron de origen celular T (10,64% TZL y 31,9% agresivo linfoma T). La mayoría de los trabajos anteriores mostraban una alta prevalencia de fenotipo B sobre linfomas T (Teske y col., 1994; Ponce y col., 2010; Valli y col., 2011; Valli y col., 2013). Sin embargo, el porcentaje informado de linfomas de células T en caninos difiere entre regiones. Por ejemplo, estudios europeos y norteamericanos mostraron que la incidencia de linfomas de células T es aproximadamente del 30% (Fournel-Fleury y col., 1997; Ruslander y col., 1997; Calvalido y col., 2016; Pawlak y col., 2016). Por otra parte, estudios de varios grupos en América Latina encontraron inmunofenotipos T iguales o superiores a los reportados en el presente estudio (Moreno y Bracarense, 2007; Álvarez-Berger y col., 2009; Neuwald y col., 2014). El trasfondo genético de las poblaciones de perros y los factores ambientales podrían contribuir a estas diferencias regionales (Ruple y col., 2017). Dentro de los linfomas T, el 25% T fueron clasificada como linfoma de células claras pequeñas (linfoma de zona T, TZL) debido a la apariencia y presencia de linfocitos TCD45<sup>+</sup> por citometría de flujo (Seelig y col., 2014; Martini y col., 2016). Aunque los linfomas T agresivos fueron prevalentes (75%), la importancia del diagnóstico de linfoma TCD45<sup>+</sup> se basa en su mejor pronóstico y curso clínico menos agresivo (subtipo indolente) (Ponce y col., 2004; Valli y col., 2006; Valli y col., 2013; Avery y col., 2014).

En este trabajo, además, buscamos diferencias entre fenotipos en cuanto a las variables hematológicas y bioquímicas. El recuento de glóbulos rojos, el hematocrito y los niveles de hemoglobina no difirieron entre los grupos. Sin embargo, el grupo LTCD45<sup>+</sup> tuvo niveles de linfocitos significativamente más altos que los grupos LTCD45<sup>-</sup> y LB ( $p = 0,01$  y  $0,006$ , respectivamente). Los niveles de albúmina, las globulinas alfa-1 y alfa-2 no difirieron entre los grupos. Por otra parte, los niveles de gammaglobulinas en el LTCD45<sup>+</sup> fueron más altos que en los otros grupos de linfoma. Aunque este hallazgo puede resultar paradójico, se ha descrito en varios trastornos de linfocitos B y T en humanos (Mims, 2018). Este perfil podría estar relacionado con las diferencias encontradas en los niveles de linfocitos circulantes y el papel de CD45 en la regulación del sistema inmunológico. Sin embargo, pocos informes describen variaciones en las fracciones proteicas, y ninguno de ellas considera el inmunofenotipo (Gavazza y col., 2009; Tappin y col., 2011). La presencia de hipercalcemia y niveles elevados de LDH en plasma se asociaron con la gravedad del paciente. Solo el grupo TCD45<sup>+</sup> presentó hipercalcemia, aunque tanto el LB como el TCD45<sup>-</sup> grupos tenían elevaciones en la actividad de LDH. La hipercalcemia es un trastorno metabólico frecuentemente asociado con enfermedad maligna avanzada y en estudios previos también se describió únicamente en pacientes con fenotipo T (Ruslander y col., 1997; Marconato y col., 2011; Aresuy col., 2015; Harris y col., 2020). La hipercalcemia se debe a la producción de un péptido relacionado con la hormona paratiroidea por parte de

los linfocitos T CD4 neoplásicos (Bryan, 2016; Goldner, 2016). Curiosamente, hubo una relación directa entre los valores altos de LDH (mayor de 500 UI/l) y menor supervivencia en los linfomas TCD45+.

En referencia a los niveles de expresión del MHC-II nuestros resultados estuvieron acordes a lo descrito en la literatura (Rao y col., 2011; Avery y col., 2014; Deravi y col., 2017; Harris y col., 2019). Nuestros perros con fenotipo LTCD45+ presentaron la expresión más baja de este marcador, mientras que no se observaron diferencias entre LB y LTCD45-. Además, al evaluar los porcentajes de positividad de MHC-II, independientemente del MFI (mean fluorescence intensity), este superó el 98% en todos los linfomas B y TCD45-, sin embargo, en el 57% de los linfomas TCD45+ no llegó al 10%. Se notificó, además, una baja expresión de MHC-II en ninguno, 7,4 % y 43 % de LTCD45-, LB y LTCD45+, respectivamente. Como se describió anteriormente, la alta expresión de MHC II por citometría de flujo en caninos refleja una inmunovigilancia más conservada en LB y también podría contribuir a una supervivencia más prolongada en el subgrupo TZL de linfoma T (Rao y col., 2011; Avery y col., 2014).

En los últimos años, numerosos estudios han destacado la importancia pronóstica de la evaluación de la biología tumoral. En este contexto, el papel de la actividad proliferativa ha recibido especial atención. Uno de los métodos más utilizados para evaluar la fracción de crecimiento de poblaciones neoplásicas es la detección de marcadores de proliferación como el antígeno Ki67 (Schluter y col., 1993). En medicina veterinaria, el valor diagnóstico y pronóstico de Ki-67 se demostró en muchos tipos tumorales y particularmente, en el linfoma canino la expresión de Ki67 ha mostrado una correlación significativa con el grado de malignidad (Fournel-Fleury y col., 1997b; Patrino y col., 2006; Poggi y col., 2015). La determinación de KI67 por citometría de flujo en linfomas caninos se utilizó por primera vez en el año 2015 por Poggi y col. quienes indicaron un punto de corte de 12,2% para distinguir entre linfomas de alto y bajo grado, independientemente del inmunofenotipo. Basados en el trabajo mencionado anteriormente, evaluamos el Ki-67 por citometría de flujo en muestras de punción de linfonodos, y los resultados obtenidos fueron utilizados para clasificar a los linfomas según el grado (bajo o alto), complementando el diagnóstico brindado hasta el momento. Además, hallamos un amplio rango de positividad para Ki67 en las muestras de linfoma y cierta heterogeneidad dentro de los linfomas de alto grado, mostrando los linfomas de células T niveles más altos de Ki67, como ya había sido reportado previamente (Poggi y col., 2015). Además, la presencia de linfomas de alto grado que muestran Ki67 bajo sugieren un posible papel de la determinación de Ki67 en la detección temprana de linfomas que se transforman de formas de bajo a alto grado.

Con respecto al desarrollo del PCR-PARR pusimos a punto la técnica de qPCR para la evaluación de la clonalidad, aspecto fundamental para confirmar el diagnóstico de linfoma en casos ambiguos donde solía confundirse con hiperplasias reactivas. Los ensayos de clonalidad molecular se basan en las características únicas de los linfocitos para alterar somáticamente la estructura de la línea germinal de sus genes receptores de antígenos. Este proceso se conoce como reordenamiento del gen del receptor de antígeno y es un medio para crear una amplia gama de especificidades de receptor a partir de un repertorio de línea germinal limitado. Es importante señalar que, en caninos, y a diferencia de lo que ocurre en humanos, la evaluación de la clonalidad no puede llevarse a cabo por citometría de flujo. En los linfomas B particularmente, es debido a que la relación Kappa/lambda es muy restringida; representando la cadena lambda hasta el 90% en los perros sanos. Respecto a la evaluación de la clonalidad de los linfomas T por citometría de flujo, en nuestro país ni siquiera se realiza en humanos debido a la dificultad que conlleva y los altos costos. Por lo antes expuesto, para la evaluación de la clonalidad desarrollamos el PCR-PARR, en colaboración con un laboratorio veterinario privado donde se llevaron a cabo las pruebas. Cabe señalar que esta técnica proporciona el inmunofenotipo (B vs T) al mismo tiempo que evalúa la clonalidad. Hasta el momento hemos evaluado 30 caninos con linfoma (19 B y 11T), de los cuales se conocía previamente su inmunofenotipo (citometría de flujo) y los resultados fueron concordantes en la mayoría de los casos con la excepción de un linfoma T que mostró resultados dispares. Se ha reportado previamente cierto grado de dificultad de este método para la evaluación de la clonalidad en linfomas de fenotipo T (Langner y col., 2014), con la posibilidad de obtener mejores resultados con el uso de diferentes juegos de primers. Tal como esperábamos, ninguno de los 8 perros con hiperplasia reactiva, añadidos como control, presentó rearrreglos clonales. Actualmente estamos perfeccionándonos en la interpretación de los resultados y próximamente estaremos en condiciones de poner el servicio de evaluación de clonalidad por qPCR, a disposición de los veterinarios clínicos.

Finalmente, en este proyecto nos propusimos también determinar los niveles de expresión de mRNA de factores vinculados a la resistencia a drogas (MDR-1) a partir de punciones de nódulos linfáticos de pacientes diagnosticados con linfoma. Al mismo tiempo, buscamos estudiar si dicha expresión difiere entre grupos (linfoma B, linfoma TCD45+, linfoma TCD45- y sano). Hasta el momento de la elaboración de este informe, los resultados obtenidos son metodológicos ya que se realizó con éxito la extracción de ARN de todas las muestras y se ha realizado el análisis de la expresión de transcritos de algunos pacientes. Resta concretar la totalidad de las corridas de qPCR y realizar el análisis de los datos para poder sacar conclusiones.

Cabe mencionar que gracias a las metodologías desarrolladas en este proyecto pudimos publicar un artículo científico en

una revista internacional arbitrada sobre un caso clínico de leucemia linfocítica crónica en una perra con linfocitosis. Este caso destaca que la combinación de la prueba de inmunofenotipificación, el mielograma, el perfil hematológico y bioquímico son importantes en el complejo proceso de diagnóstico de la LLC. La citometría de flujo, cada vez más utilizada en medicina veterinaria, es un método diagnóstico rápido y mínimamente invasivo que permite no solo confirmar el diagnóstico de LLC sino también diferenciarla de otros procesos reactivos que provocan linfocitosis. La presencia de tinción positiva de anticuerpos primarios específicos para las especies caninas CD45, CD3, CD5 y CD8 y la ausencia de tinción para CD4, CD21 y CD34, confirmaron el diagnóstico de LLC con origen en linfocitos T citotóxicos en nuestro paciente. Este artículo nos permitió expandir nuestro conocimiento en torno a las neoplasias hematopoyéticas.

## **Conclusiones y recomendaciones**

El linfoma canino representa un grupo heterogéneo de neoplasias que surgen de la transformación maligna de células linfocíticas. El enfoque multifocal del linfoma canino es un paso crucial en el diagnóstico con gran impacto pronóstico, así como también para predecir su comportamiento biológico y la respuesta a la terapia.

En Uruguay, la frecuencia de presentación de los linfomas multicéntricos de estirpe T fue superior a lo reportado internacionalmente (42,5% LT, 55,3% LB y 2,2% null). Dentro de los linfomas T, el 25% fue de bajo grado (CD45-) o indolentes asociados a un mejor pronóstico y una mayor supervivencia.

Los patrones hematológicos y bioquímicos difirieron entre los inmunofenotipos de linfomas caninos. Los pacientes con fenotipo LTCD45+ mostraron recuentos de linfocitos y niveles de gammaglobulina más elevados y una supervivencia más prolongada. La hipercalcemia fue observada únicamente en pacientes con linfoma TCD45+. La actividad de la LDH sérica puede proporcionar información pronóstica adicional en el linfoma de células T de alto grado.

La expresión de MHC-II difirió entre los inmunofenotipos de linfoma canino. LTCD45+ mostró la expresión más baja de MHC-II. Los porcentajes de positividad de MHC-II superó el 98% en todos los linfomas B y TCD45-, sin embargo, en el 57% de los linfomas TCD45+ no llegó al 10%. Aunque se necesitan más estudios con un mayor número de animales, consideramos que la evaluación de MHC-II por citometría de flujo es una herramienta sencilla que presenta valor pronóstico.

Sugerimos añadir el KI-67 en el panel diagnóstico de citometría de flujo para agregar valor de diagnóstico y pronóstico, permitiendo discriminar entre linfomas de bajo y alto grado. Los pacientes con TZL, obtuvieron los valores de marcación más bajos, no pudiendo superar el 2% de positividad en ninguno de los casos incluidos en este trabajo. Los valores más altos se registraron en pacientes con linfoma TCD45+.

La PCR en tiempo real con análisis de las curvas de Melting es un método conveniente y confiable para la evaluación de la clonalidad pudiendo ayudar a la detección del reordenamiento del gen del receptor de antígeno clonal en pacientes con linfoma canino en un entorno clínico también en presencia de pequeñas cantidades de células neoplásicas.

## Referencias bibliográficas

- Ali AE, Morgen EK, Geddie WR, Boerner SL, Massey C, Bailey and da Cunha Santos G. Classifying B-cell non-Hodgkin lymphoma by using MIB-1 proliferative index in fine-needle aspirates. *Cancer Cytopathology* 2010; 118: 166–172.
- Álvarez-Berger, F.J., Aburto, E., Aristi, G. and Chávez, G. 2009. Histological and immunophenotypic study of canine lymphoma in the center of Mexico. *Vet Méx.* 40(2), 141–155.
- Aniolek O, Gajewski Z, Ginzinski S. Application of flow cytometry in diagnosing lymphomas in dogs and cats. *Centr Eur J Immunol* 2014; 39(3): 327–330.
- Avery PR, Burton J, Bromberek JL, et al. (2014): Flow cytometric characterization and clinical outcome of CD4+ T-cell lymphoma in dogs: 67 Cases. *J Vet Intern Med* 28: 538–546.
- Aresu, L., Martini, V., Rossi, F., Vignoli, M., Sampaolo, M., Arico, A., Laganga, P., Pierini, A., Frayssinet, P., Mantovani, R., Marconato, L. (2013). Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. *Vet Comp Oncol*, 13(4), 348–62.
- Beaver, L.M., Strottner, G., and Klein, M.K. (2010). Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006–2008). *J Am Vet Assoc*, 237 (9), 1052–1055.
- Broyde A, Boycov O, Strenov Y, Okon E, Shpilberg O and Bairey O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. *American Journal of Hematology* 2009; 84: 338–343.
- Brown DC and Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489–503.
- Burnett, R. C.; Vernau, W.; Modiano, J.F.; Olver, C.S.; Moore P.F.; Avery, A.C. Diagnosis of Canine Lymphoid Neoplasia Using Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes. *Vet Pathol* 2003; 40:32–41.
- Calvalido, J., Wood, G., Mutsaers, A., Wood, D., Sears, W. and Wood, J.P. 2016. Comparison of serum cytokine levels between dogs with multicentric lymphoma and healthy dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 182, 106–112.
- Comazzi, S; Gelain, M.E. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal* 2011; 149–155.
- De Caprariis, D; Sasanelli, M; Paradies, P; Otranto, D; y Lia, R. (2009) Monoclonal gammopathy associated with heartworm disease in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 45, 296–300
- Deravi, N., Berke, O., Woods, J. P., & Bienzle, D. (2017). Specific immunotypes of canine T cell lymphoma are associated with different outcomes. *Veterinary immunology and immunopathology*, 191, 5–13.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J.L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 43, 240–246.
- Doveren RF, Buurman WA, Schutte B, et al. Class II antigens on canine T lymphocytes. *Tissue Antigens* 1985;25: 255–265.
- Fournel-Fleury C, Magnol JP, Chabanne L, Ghernati I, Marchal T, Bonnefond C, et al. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *Journal of Comparative Pathology* 1997b; 117:61–72
- Gagliardi, R., Llambi, S., Arruga, M.B. 2015. SNP genetic polymorphisms of MDR-1, CYP1A2 and CYPB11 genes in four canine breeds upon toxicological evaluation. *J Vet Sci* 2015, 16(3), 273–280.
- Gagliardi, R., Llambi, S., Arruga, M.B. 2014. Estudio de mutaciones puntuales en el gen de resistencia múltiple a drogas en caninos de Uruguay. *AICA* 4 (2014) 132–134
- Gavazza, A., Sacchini, F., Lubas, G., Gugliucci, B. and Valori, E. 2009. Clinical, laboratory, diagnostic and prognostic aspects of canine lymphoma: a retrospective study. *Comp. Clin. Pathol.* 18, 291–299.
- Gelain, M.E.; Mazzilli, M.; Riondato, F.; Marconato, L.; Comazzi, S. 2008. Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121 (2008) 179–188
- Giraudel, J. M., Pages, J. P. y Guelfi, J. F. (2002) Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986–1999) and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association* 38, 135–147.
- Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, Slymen DJ, Rybski JA, Rangel CS, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody i-67. *Blood* 1988;71: 1157–1160.
- Han X, Bueso-Ramos CE. Precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma and acute biphenotypic leukemias. *Am J Clin Pathol* 2007;127:528–544.
- Harris, L. J., Hughes, K. L., Ehrhart, E. J., Labadie, J. D., Yoshimoto, J., & Avery, A. C. (2019). Canine CD4+ T-cell lymphoma identified by flow cytometry exhibits a consistent histomorphology and gene expression profile. *Veterinary and comparative oncology*, 17(3), 253–264.



- Harris, L. J., Rout, E. D., Labadie, J. D., Avery, P. R., Fernandez, M., Yoshimoto, J., & Avery, A. C. (2020). Clinical features of canine nodal T-cell lymphomas classified as CD8+ or CD4-CD8- by flow cytometry. *Veterinary and comparative oncology*, 18(3), 416–427.
- Holling TM, van der Stoep N, Quinten E, et al. Activated human T cells accomplish MHC class II expression through T cell-specific occupation of class II transactivator promoter III. *J Immunol* 2002;168:763–770.
- Klimecki, W.T., Futscher, B.W., Grogan, T.M., Dalton, W.S. (1994). P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood*, 83(9), 2451-8.
- Lana, SE; Jackson, T.L; Burnett, R.C; Morley, P.S; Avery, A.C. Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma, *J Vet Intern Med* 20:329, 2006.
- Langner, K. F., Joetzke, A. E., Nerschbach, V., Eberle, N., Schuberth, H. J., Koy, M., Nolte, I., & Betz, D. (2014). Detection of clonal antigen receptor gene rearrangement in dogs with lymphoma by real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *BMC veterinary research*, 10, 1. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-1>
- Marconato, L. (2011). The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: A review. *Comazzi, S; Gelain, M.E. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. The Veterinary Journal* 2011; 149-155. w of recent developments and future prospects. *Vet J*, 188: 34–38.
- Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol* 2012 .
- Martini, V., Poggi, A., Riondato, F., Gelain, M. E., Aresu, L. and Comazzi, S. 2015. Flow-cytometric detection of phenotypic aberrancies in canine small clear cell lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 13(3), 281–287.
- Martini, V., Marconato, L., Poggi, A., Riondato, F., Aresu, L., Cozzi, M. and Comazzi, S. 2016. Canine small clear cell/T-zone lymphoma: clinical presentation and outcome in a retrospective case series. *Vet. Comp. Oncol.* 14(1), 117–126.
- Meza AB y García LE. Citología de linfonódulos. Capítulo 17 pp 313-329. En: Nuria de Buen de Arguero Atlas de citopatología veterinaria. 2014.
- Mims, M.P. 2018. Lymphocytosis, lymphocytopenia, hypergammaglobulinemia, and hypogammaglobulinemia. In *Hematology, basic principles and practice*, Eds., Hoffman, R., Benz, E.J., Silbstein, L.E., Heslop, H.E., Weitz, J.I., Anastasi, J., Salama, M.E. and Abutalib, S.A. Philadelphia, PL: Elsevier, pp: 682–690.
- Moreno, K. and Bracarense, A. 2007. Linfoma canino de células T: aspectos epidemiológicos, clínicos e morfológicos de 38 casos. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.* 44, 103–110.
- Morgan, E., O'Connell, K., Thomson, M., Griffin, A. (2018). Canine T cell lymphoma treated with lomustine, vincristine, procarbazine, and prednisolone chemotherapy in 35 dogs. *Vet Comp Oncol*, 16(4), 622-629.
- Moore AS. Treatment of T cell lymphoma in dogs. *Vet Rec.* 2016 Sep 17;179(11):277.
- Neuwald, E.B., Teixeira, L.V., Conrado, F.O., da Silva, M.O.D., Hlavac, N.R.C. and González, F.H.D. 2014. Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 34(4), 349–354.
- Out TA, Wang SZ, Rudolph K, et al. Local T-cell activation after segmental allergen challenge in the lungs of allergic dogs. *Immunology* 2002; 105:499–508.
- Parachini-Winter, C., Curran, K. M., Russell, D. S., & Gorman, E. (2019). A case of canine high-grade T-cell lymphoma immunophenotypically consistent with T-zone lymphoma. *Veterinary clinical pathology*, 47(4), 643–648.
- Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J.P., Fournel-Fleury, C. and Ponce, F. 2009. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J. Vet. Intern. Med.* 23(2), 301–310.
- Patrino R, Zizzo N, Zito AF, Catalano V, Valerio P, Pellicchia V, D'errico E, Mazzone F, Ribatti D and Ranieri G. Microvascular density and endothelial area correlate with Ki-67 proliferative rate in the canine non-Hodgkin's lymphoma spontaneous model. *Leukemia & Lymphoma* 2006; 47: 1138–143.
- Pawlak, A., Rapak, A., Drynda, A., Poradowski, D., Zbyryt, I., Dzimira, S., Suchanski, J. and Obminska-Mrukowicz, B. 2016. Immunophenotypic characterization of canine malignant lymphoma: a retrospective study of cases diagnosed in Poland Lower Silesia, over the period 2011–2013. *Vet. Comp. Oncol.* 14(1), 52–60.
- Pessina, P. Carcinoma tiroideo en perros: Aspectos moleculares. 2011. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, Uruguay.
- Poggi A, Miniscalco B, Morello E, et al. Flow cytometric evaluation of Ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2015;13:475-480.
- Poggi A, Miniscalco B, Morello E, Gattino F, Delaude A, Ferrero Poschetto L, Aresu L, Gelain ME, Martini V, Comazzi S, Riondato F. Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2017 Jun;15(2):431-440.
- Ponce, F., Magnol, J.P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K. and Fournel-Fleury, C. 2004. Prognostic

significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet. J.* 167(2), 158–166

Rao S, Lana S, Eickhoff J, Marcus E, Avery PR, Morley PS, Avery AC. Class II major histocompatibility complex expression and cell size independently predict survival in canine B-cell lymphoma. *J Vet Intern Med.* 2011 Sep-Oct;25(5):1097-105.

Rassnick, K.M., Mauldin, G.E., Al-Sarraf, R., Mauldin, G.N., Moore, A.S., Mooney, S.C., (2002). MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989–2000). *J Vet Intern Med*, 16 (5), 576–580.

Ratcliffe L, Mian S, Slater K, King H, Napolitano M, Aucoin D y Mobasheri A. Proteomic identification and profiling of canine lymphoma patients. *Veterinary and Comparative Oncology* 2009; 7: 92-105.

Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: A follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 2004;103:4251–4258.

Ruple, A., Avery, A.C. and Morley, P.S. 2017. Differences in the geographic distribution of lymphoma subtypes in Golden retrievers in the USA. *Vet. Comp. Oncol.* 15(4), 1590–1597.

Ruslander DA, Gebhard DH, Tompkins MB, Grindem CB, Page RL. 1997. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo.* 11:169\_172.

Scholzen T and Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 182: 311–322.

Schwartz R. Little missed markers and Ki-67. *Laboratory Investigation* 1993; 68: 597–599.

Brown DC and Gater KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2000; 40: 2–11.

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

Suárez, V.M; Lázaro, O. del Valle Pérez, Díaz Domínguez, G; Macías Abraham, C. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter.* 2015;31(3):242-253

Tappin, SW; Taylor, S.S; Tasker,S; Dodkin, S.J; Papsouliotis,K; Murphy, K.F. Serum protein electrophoresis in 147 dogs. *Veterinary Record* (2011) 168, 456

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

Valli, V.E., San Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., et al. 2011. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet. Pathol.* 48(1), 198–211

Valli, V.E., Kass, P.H., Myint, M.S and Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol*, 50(5), 738-48.

Veelken H, Vik Dannheim S, Schulte Moenting J, et al. Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy. *Ann Oncol* 2007;18:931–939.pog

Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L., 2013. *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed. Elsevier/Saunders, St. Louis, Mo, pp

Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review, *Vet Quart*, 36 (2), 76-104.

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)