

Estudio histológico e inmunofenotípico de linfoma canino en el centro de México

Histological and immunophenotypic study of canine lymphoma in the center of Mexico

Francisco J. Álvarez Berger*

Enrique Aburto Fernández**
Gilberto Chávez Gris†

Gerardo Aristi Urista***

Abstract

Immunophenotype constitutes an important factor in the prognosis of canine lymphoma. It has been demonstrated that dogs with B-cell lymphomas have a longer life span than those with T-cell lymphomas. CD3 and CD79a antigens are the most common markers used for the immunohistochemical determination of T-cell and B-cell on formalin-fixed paraffin wax-embedded canine lymphoma tissues. This study describes the morphological and immunophenotypic characteristics of 31 cases of lymphoma in Mexico, obtained from files of the Pathology Department of Veterinary Medicine and Animal Husbandry Faculty of the National Autonomous University of Mexico. The National Cancer Institute-Working Formulation (NCI-WF) classification system was used for the histological classification. Fourteen cases (45.16%) were B cell origin, 15 cases (48.39%) were T-cell origin and 2 cases (6.45%) presented an indeterminate origin. Histopathological diffuse large cell lymphoma (DL) was the most common found (38.71%), followed by lymphocytic (DSL), immunoblastic (IB), intermediate and high-grade lymphomas represented 77.42% of the cases. In this study there was higher prevalence of T-cell lymphoma. The results in this work could indicate prevalent differences in the immunophenotype of the canine lymphoma in Mexico compared with other geographical areas.

Key words: LYMPHOMA, DOG, NEOPLASIA, IMMUNOHISTOCHEMISTRY.

Resumen

El inmunofenotipo constituye un factor importante en el pronóstico del linfoma canino. Se ha demostrado que perros con linfoma de células B presentan tiempos de sobrevivencia más largos que los perros con linfoma de células T. Los antígenos CD3 y CD79a son los marcadores más utilizados en inmunohistoquímica para la determinación del fenotipo celular T y B, respectivamente, en muestras fijadas en formalina y conservadas en bloques de parafina. En este estudio se describen las características morfológicas e inmunofenotípicas de 31 casos de linfoma en México, de casos del archivo del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para la clasificación histológica se utilizó el sistema del National Cancer Institute-Working Formulation (NCI-WF). Catorce casos (45.16%) correspondieron a células B, 15 (48.39%) a células T, y dos (6.45%) fueron de origen indeterminado. Histopatológicamente, el linfoma difuso de células grandes fue el tipo más común, representó 38.71% de los casos; le siguieron los siguientes linfomas: linfocítico, inmunoblástico y linfoblástico. Los linfomas de grado intermedio a alto representaron 77.42% de los casos. En este estudio se encontró mayor prevalencia de linfoma de células T. Los resultados en este trabajo pudieran indicar una diferencia en la prevalencia en el inmunofenotipo del linfoma canino en México, en relación con otras zonas geográficas.

Palabras clave: LINFOMA, PERRO, NEOPLASIA, INMUNOHISTOQUÍMICA.

Recibido el 15 de enero de 2008 y aceptado el 20 de febrero de 2009.

* Coral Springs Animal Hospital, 1730 University Drive, Coral Springs, FL 33071, Estados Unidos de América.

** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

*** Hospital General de México, Secretaría de Salud, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, 06726, México, D. F.

† Unidad de Servicios y Diagnóstico y Constatación, Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, Km 8.5, Tequisquiapan-Ezequiel Montes, 76750, Querétaro, Querétaro, México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, correo electrónico: gris@servidor.unam.mx

Introduction

Canine lymphoma represents one of the most common malignant neoplasms in dogs and it is the most recurrent hematopoietic neoplasm in this species.¹⁻³ Although it is a neoplasm that responds favorably to chemotherapy, certain cases of lymphoma respond better than others to treatment, without establishing a specific chemotherapeutic protocol for all cases. Among the factors that independently define the prognosis are: sex, age, body weight, breed, clinical grade and sub-grade, previous corticosteroid administration, hypercalcemia, anatomical location, initial response to treatment, chromosomal abnormalities, histological classification and cellular immunophenotype.⁴⁻⁷ Cellular immunophenotype is the most important factor associated with the prognosis;^{8,9} nevertheless, there are few studies on the field in the world; there are no published studies on canine lymphoma immunphenotypic classification in Mexico. It has been suggested that the morphological and immunological characteristics of canine lymphoma vary depending on different geographical world zones; likewise, morphological differences among canine lymphoma present in Europe and the United States of America have been documented, as well as differences between different zones within this nation.¹⁰ In Mexico there have been no studies that determine histological and immunophenotypic characteristics of canine lymphoma, that allow a more specific identification of this neoplasm, with the aim to establish an optimal program for the management of these cases. The aims of this study are: classify, based on histological and immunophenotypic characteristics, canine lymphoma in Mexico, and determine if there are or not differences between histological and immunophenotypic characteristics described in this study compared with the described in other geographical zones.

Material and methods

Histological classification

Cases used in this study were obtained from file cases, sent and diagnosed as lymphoma in the Pathology Department of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the National Autonomous University of Mexico. All samples were fixed in formalin at 10%; nevertheless, fixation period was variable for these cases. Subsequently, they were paraffin included, in order to perform 4 µm thick cuts, and stain with hematoxylin eosin (H-E). Samples were observed and were classified according to their histological characteristics, taking as reference The

Introducción

El linfoma canino representa una de las neoplasias malignas más comunes en el perro y es la neoplasia hematopoyética que se presenta con más frecuencia en esta especie.¹⁻³ A pesar de que constituye una neoplasia que responde favorablemente a la quimioterapia, ciertos casos de linfoma responden mejor al tratamiento que otros, sin haberse establecido un protocolo quimioterapéutico específico para todos los casos. Entre los factores que de manera independiente definen el pronóstico se encuentran: el sexo, edad, peso corporal, raza, grado y subgrado clínicos, administración previa de corticosteroides, hipercalcemia, localización anatómica, respuesta inicial al tratamiento, anormalidades cromosómicas, clasificación histológica e inmunofenotipo celular.⁴⁻⁷ El inmunofenotipo celular es el factor más importante asociado con el pronóstico;^{8,9} sin embargo, son pocos los estudios en el ámbito mundial; en México no existen estudios publicados sobre la inmunofenotipificación del linfoma canino. Se ha sugerido que las características morfológicas e inmunológicas del linfoma canino varían dependiendo de las distintas zonas geográficas mundiales; asimismo, se han documentado diferencias morfológicas entre casos de linfoma canino presentes tanto en Europa como en Estados Unidos de América, así como diferencias entre distintas zonas geográficas dentro de esta nación.¹⁰ En México no se han realizado estudios que determinen las características histológicas e inmunofenotípicas del linfoma canino, que permitan una identificación más precisa de esta neoplasia, con el fin de establecer un programa óptimo para el manejo de estos casos. Los objetivos de este estudio son: clasificar, con base en las características histológicas e inmunofenotípicas, al linfoma canino en México, y determinar si existen diferencias o no entre las características histológicas e inmunofenotípicas descritas en este estudio con las descritas en otras áreas geográficas.

Material y métodos

Clasificación histológica

Los casos empleados para este estudio se tomaron de los casos de archivo, remitidos y diagnosticados como linfoma en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todas las muestras fueron fijadas en formalina al 10%; sin embargo, el periodo de fijación para estos casos fue variable. Posteriormente, fueron incluidas en parafina, para realizar cortes a 4 µm de espesor, y teñidas con la tinción de rutina de hematoxilina-eosina

National Cancer Institute-Working Formulation (NCI-WF)¹¹ classification.

Immunophenotypification

Sample cuts of 4 µm of thickness for the immunohistochemical study were done and fixed on slides. They were incubated at 60° C in a dry electric incubator* for 30 minutes, followed by three changes of three minutes in xylol, three minutes in acetone and three minutes in absolute alcohol. For the endogenous peroxidase inhibition, a 1 mL solution of hydrogen peroxide at 30% for each 100mL of methanol was used, for a 30 minute period. Subsequently, the samples were submerged in 96% alcohol for five seconds and rinsed for three minutes with distilled water. For antigen exposition, samples were submerged in a citrate solution (1 liter of distilled water, 2.1 g of citric acid, 13 mL of sodium hydroxide) with a pH of 5.7 to 6.0 for CD3 (polyclonal rabbit anti-human CD3 antibody)** and alkaline solution (10 mmol/L Tris buffer, 1mL mmol/EDTA) with pH 9.0 for CD79a (monoclonal mouse anti-human CD79a antibody).*** Samples were heated for three minutes in microwaves (80 powers) in a plastic container with lid, reaching approximately 90°C, with 40 minutes to settle and rinsed in distilled water. Afterwards, two changes of five minutes each were done in a buffer solution (PBS) (6.17 g of dibasic sodium phosphate, 0.89 g monobasic sodium phosphate, 9 g sodium chloride and one liter of distilled water).

For the blockage of the non-specific binding of the primary antibody, normal goat serum was used at room temperature for 30 minutes in humid chamber. Afterwards, goat serum was drained, the corresponding primary antibody was applied in a 1:100 dilution using solvent for commercial antibody† and was incubated in humid chamber at 4°C for 24 hours. Later, they were rinsed with three changes of three minutes each in PBS with Tween 20 solution (6.17 g of dibasic sodium phosphate, 0.89 g of monobasic sodium phosphate, 9 g of sodium chloride and one liter of saline solution, and 1 mL of Tween 20 solution for each liter was added) at pH of 7.6 for the secondary biotinylated antibody‡ application and incubated in humid chamber for 30 minutes at room temperature. It was rinsed in BFS with Tween 20 solution three times three minutes each. Afterwards, Biotin-Avidin* enzyme reactive was applied and then incubated in humid chamber for 30 minutes at room temperature. Later, it was rinsed in BFS with Tween 20 solution, for three times, three minutes each. For the developing, diaminobenzidine (DAB) solution was used (5 mL of Tris 2.4 pH buffer, 50 mL of distilled water, 0.0125 g of diaminobenzidine and 30 µL of hydroxide peroxide at 30%), slides were

(H-E). Se observaron las muestras y se les clasificó de acuerdo con sus características histológicas, tomando como referencia el esquema de clasificación del National Cancer Institute-Working Formulation (NCI-WF).¹¹

Inmunofenotipificación

Para el estudio inmunohistoquímico se realizaron cortes de las muestras a 4 µm de grosor y se fijaron sobre laminillas para su posterior incubación a 60°C en incubadora seca eléctrica* por 30 minutos, seguido de tres cambios de tres minutos en xilol, tres minutos en acetona y tres minutos en alcohol absoluto. Para la inhibición de la peroxidasa endógena, se utilizó solución de 1 mL de peróxido de hidrógeno a 30% por cada 100 mL de metanol, por un periodo de 30 minutos, sumergiendo posteriormente las muestras en alcohol al 96% por cinco segundos y lavando con agua destilada por tres minutos. Para la exposición de antígenos, se sumergieron las muestras en solución de citratos (1 litro de agua destilada, 2.1 g de ácido cítrico, 13 mL de hidróxido de sodio) con pH de 5.7 a 6.0 para el CD3 (anticuerpo policlonal de conejo anti-CD3 humano)** y solución alcalina (10 mmol/L Tris amortiguador, 1mL mmol/EDTA) con pH 9.0 para el CD79a (anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD79a humano).*** Mediante un contenedor de plástico con tapa, las muestras fueron calentadas en microondas durante tres minutos (80 power), alcanzando 90°C aproximadamente, con reposo de 40 minutos y lavadas con agua destilada, luego se realizaron dos cambios de cinco minutos cada uno en solución amortiguadora (PBS) (6.17 g de fosfato de sodio dibásico, 0.89 g de fosfato de sodio monobásico, 9 g de cloruro de sodio y cbp un litro de agua destilada).

Para el bloqueo de la unión no específica del anticuerpo primario se utilizó suero normal de cabra a temperatura ambiente por 30 minutos en cámara húmeda, posteriormente se escurrió el suero de cabra, se aplicó el anticuerpo primario correspondiente en dilución 1:100 utilizando diluyente para anticuerpo comercial† y se incubó en cámara húmeda a 4°C por 24 horas. Después se enjuagaron con tres cambios de tres minutos cada uno en PBS con solución de Tween 20 (6.17 g de fosfato de sodio dibásico, 0.89 g de fosfato de sodio monobásico, 9 g de cloruro de sodio y cbp un litro de solución salina y se agregó 1 mL de solución Tween 20 por cada litro) a pH de 7.6 para la aplicación del anticuerpo secundario biotinilado‡ y se incubó en cámara húmeda por 30

*Feli, S.A, México.

**Dako Cytomation, Estados Unidos de America.

***Dako Cytomation, Estados Unidos de America

†Dako Cytomation, Estados Unidos de America.

‡Dako Cytomation, Estados Unidos de America.

submerged in a Petri dish for three to five minutes, they were rinsed with distilled water for a minute, running water for three minutes and were submerged in copper sulfate solution at 1% for ten minutes and then rinsed for one minute in running water. Finally, samples were contrasted with Mayer's hematoxylin for two seconds, dehydrated in Scott's solution (sodium bicarbonate 3.5 g, magnesium sulfate 20 g, distilled water 1 L) for two minutes and in alcohol at 96% for ten seconds; finally, they were mounted using DPX medium on cover slides.

From each case, counting was done for malignant cells marked positively to CD3 and CD79a, in five fields with high-dry objective (40X), averaging the results of the five counts and estimating the approximate percentage for each cellular population.

Statistical analysis

The results of the histological classification were statistically analyzed with the chi-square test according to classifications previously published by other authors, who used the NCI-WF classification system based on low, intermediate and high histological grades.^{5,6,12-15}

According to the immunophenotype, results were statistically analyzed with chi-square test according to classifications previously published by other authors, who used the NCI-WF classification system based on T, B or noT/noB cellular origin.^{8,13-19} A $P < 0.05$ significance was established for data analysis. The GraphPad Prism 4.0** computer program was used.

Results

Thirty one cases were evaluated, 18 were males (58.06%) and 13, females (41.93%). The average presentation age was 6.5 years (range: 2 to 12 years). The breeds with higher frequency were: Crossbred, 4/31; Cocker Spaniel, 3/31; Labrador Retriever, 4/31; Rottweiler, 3/31; Golden Retriever, 2/31; German Sheppard, 2/31; Giant Schnauzer, 2/31 (Table 1). Histologically, the 31 selected cases in this study, 6/31 (19.35%) were classified according to the NCI-WF11 as small cell lymphocytic lymphoma; 1/31 (3.22%), mixed follicular; 1/31 (3.22%), follicular large cell; 1/31 (3.22%), diffuse small cleaved cell; 12/31 (38.71%), diffuse large cell; 6/27 (19.35%), immunoblastic; 3/31 (9.68%), lymphoblastic and 1/31 (3.32%), small non-cleaved cell lymphoma.

When considering the malignancy histological grade, 22.57% of the cases correspond to low grade; 45.15%, to intermediate grade; and 32.25%, to high grade (Table 2). Immunophenotypically, 13 cases (41.94%) were classified as B-cell lymphomas; 15 (48.39%), T-cell lymphomas; and three (9.68%), no

minutos a temperatura ambiente. Se enjuagó en BFS con solución de Tween 20 tres veces de tres minutos cada una. Posteriormente, se aplicó el reactivo enzima Avidina-Biotina,* y se incubó en cámara húmeda 30 minutos a temperatura ambiente, después se enjuagó en BFS con solución de Tween 20, tres veces de tres minutos cada una. Para el revelado, se utilizó solución de diaminobencidina (DAB) (5 mL de amortiguador Tris pH 2.4, cbp 50 mL de agua destilada, 0.0125 g de diaminobencidina y 30 μ L de peróxido de hidrógeno al 30%), se sumergieron las laminillas dentro de una caja de Petri durante tres a cinco minutos, se enjuagaron con agua destilada por un minuto, agua corriente por tres minutos y se sumergieron en solución de sulfato de cobre a 1% diez minutos y se enjuagaron un minuto en agua corriente. Finalmente, las muestras se contrastaron con hematoxilina de Mayers por dos segundos, deshidratadas en solución Scott (3.5 g, de bicarbonato de sodio bicarbonato, 20 g de sulfato de magnesio, 1 L de agua destilada) dos minutos y en alcohol a 96% por diez segundos, finalmente, fueron montadas empleando medio DPX colocando el cubre-objetos.

De cada caso, se realizaron conteos de las células malignas marcadas positivamente para CD3 y CD79a, en cinco campos con el objetivo seco fuerte (40X), promediando los resultados de los cinco conteos y estimando el porcentaje aproximado para cada población celular.

Análisis estadísticos

Los resultados de la clasificación histológica fueron analizados estadísticamente con la prueba de Ji cuadrada con clasificaciones publicadas anteriormente por otros autores que utilizaron el sistema de clasificación NCI-WF basándose en los grados histológicos bajo, intermedio y alto.^{5,6,12-15}

De acuerdo con el inmunofenotipo, los resultados fueron analizados estadísticamente con la prueba de Ji cuadrada de acuerdo con clasificaciones publicadas anteriormente por otros autores, que utilizaron el sistema de clasificación NCI-WF basándose en el origen celular T, B o no T/no B.^{8,13-19} Se estableció una significancia de $P < 0.05$ para el análisis de los datos. Se utilizó el programa de cómputo GraphPad Prism 4.0.**

Resultados

Se evaluaron 31 casos, de los cuales 18 fueron machos (58.06%) y 13, hembras (41.93%). La edad promedio

*Equipo Comercial ABC, Dako Citomation, Estados Unidos de América.

**GraphPad Software Incorporated. Estados Unidos de América.

T/no B or undetermined lymphomas (Table 3, Figures 1-3).

From six cases classified as diffuse small cell or lymphocytic lymphoma, two were B immunophenotype, three T-cells and one no T/no B; one case of mixed follicular T-cells, one small cleaved T-cells and one as follicular large B-cells.

From 12 cases of diffuse large cell lymphoma, three were B-cells and nine T-cells; five immunoblastic B-cell lymphoma and one no B/no T case.

From three lymphoblastic, one T-cells, one B-cells and one no B/no T; as well as one case of small cleaved B-cells. (Table 4).

The histological results of the present study represent a greater proportion of low grade lymphoma with respect to other studies (Table 5). A statistical significant difference was found in two evaluated studies and no statistical difference was found with the remaining studies (Table 6). On the other hand, when evaluating the malignant grade in two studied geographical areas, a significant statistical difference was present in the United States of America ($P < 0.0001$), while no statistical difference was found in Europe ($P < 0.5984$) in relation to this study (Table 7). In this study, a greater proportion of T-cell lymphomas origin (CD3 +) was found in relation to other studies (Table 8). Regarding the immunophenotype results of both geographical areas, there was a significant statistical difference with the European region ($P = 0.001$) and no statistical difference was found with the United States of America region ($P = 0.1158$) (Table 9).

de presentación fue de 6.5 años (rango: 2 a 12 años). Las razas con mayor frecuencia fueron: Mestizo, 4/31; Cocker Spaniel, 3/31; Cobrador de Labrador, 4/31; Rottweiler, 3/31; Cobrador Dorado, 2/31; Pastor Alemán, 2/31; Schnauzer Gigante, 2/31 (Cuadro 1). Histológicamente, los 31 casos seleccionados en el presente estudio, 6/31 (19.35%) fueron clasificados de acuerdo con el esquema NCI-WF¹¹ como linfoma linfocítico de células pequeñas; 1/31 (3.22%), folicular mixto; 1/31 (3.22%), folicular de células grandes; 1/31 (3.22%), difuso de células pequeñas hendidas; 12/31 (38.71%), difuso de células grandes; 6/27 (19.35%), inmunoblástico; 3/31 (9.68%), linfoblástico y 1/31 (3.22%), linfoma de células pequeñas no hendidas.

Al considerar el grado histológico de malignidad, 22.57% de los casos corresponden a grado bajo; 45.15%, a grado intermedio; y 32.25%, a grado alto (Cuadro 2). Inmunofenotípicamente, 13 casos (41.94%) fueron clasificados como linfomas de células B; 15 (48.39%), linfomas de células T, y tres (9.68%), linfomas no T/no B o indeterminado (Cuadro 3, Figuras 1-3).

De los seis casos clasificados como linfoma difuso de células pequeñas o linfocítico, dos fueron de inmunofenotipo B, tres de células T y uno no T/no B; un caso de linfoma folicular mixto de células T, uno de células pequeñas hendidas de células T y uno como folicular de células grandes de células B.

De los 12 casos de linfoma difuso de células grandes, tres fueron de células B y nueve de células T;

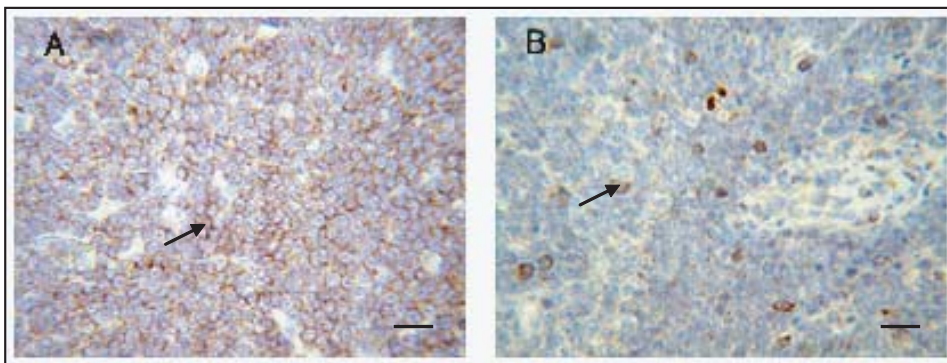


Figura 1: Inmunohistoquímica de un linfoma inmunoblástico de inmunofenotipo celular A. El marcaje es positivo (→) a CD79a y negativo a CD3, en la muestra se observan algunas células T con marcaje positivo (→) a CD3 presentes en el tejido. 40X Barra = 20 μ m

Figure 1: Immunohistochemistry of a B-cell immunoblastic lymphoma. A. Marking is positive (→) to CD79a. B. Some T-cells with positive marking (→) to CD3 are observed. 40X Bar = 20 μ m.

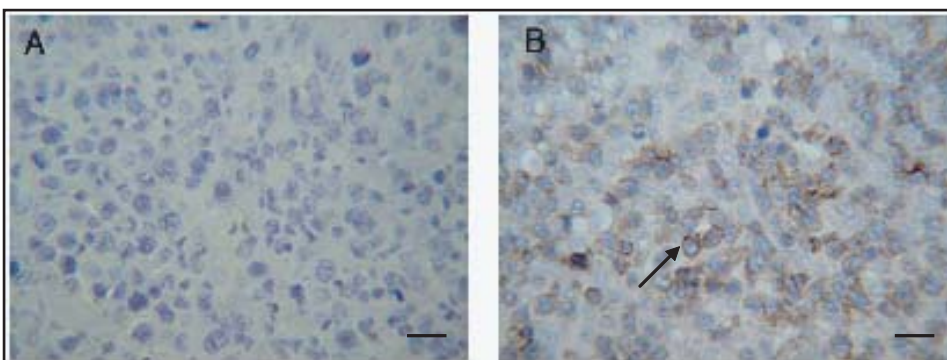


Figura 2: Inmunohistoquímica de un linfoma difuso de células grandes hendidas de inmunofenotipo celular T. El marcaje es negativo a CD79a, positivo (→) a CD3. 40X Barra = 20 μ m

Figure 2: Immunohistochemistry of a T-cell immunophenotype diffuse large cleaved cell lymphoma. A. Marking is negative to CD79a. B. Positive marking (→) to CD3. 40X Bar = 20 μ m.

Cuadro 1
CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOFENÓTICA,
RAZA, SEXO Y EDAD DE LOS 31 CASOS
HISTOLOGICAL AND IMMUNOPHENOTYPIC CLASSIFICATION,
BREED, SEX AND AGE OF THE 31 CASES

<i>Breed</i>	<i>Sex</i>	<i>Age</i>	<i>Histological classification</i>	<i>Histological grade</i>	<i>Immunophenotype</i>
Akita	F	9	LB	High	B
Afgane	F	7	IB	High	B
Airedale Terrier	F	6	DSC	Intermediate	T
Airedale Terrier	M	8	FM	Low	T
Alaskan Malamute	F	10	DL	Intermediate	T
Bloodhound	M	7	IB	High	B
Labrador Retriever	M	8	DSL	Low	T
Labrador Retriever	M	6	DL	Intermediate	T
Golden Retriever	F	6	DSL	Low	B
Golden Retriever	F	6	DL	Intermediate	T
Cocker Spaniel	M	4	DSL	Low	T
Cocker Spaniel	M	8	DL	Intermediate	T
Cocker Spaniel	M	8	DSL	Low	N To B/no T
Great Dane	F	8	LB	High	N To B/no T
Undefined	M	4	SNC	High	B
Labrador Retriever	M	2	DL	Intermediate	B
Irish Wolfhound	M	7	DL	Intermediate	T
Crossbred	M	7	IB	High	N To B/no T
Crossbred	F	10	DSL	Low	B
Crossbred	F	4	DL	Intermediate	T
Crossbred	F	7	LB	High	T
German Shepherd	M	3	IB	High	B
Belgian Shepherd	M	7	DL	Intermediate	B
Rottweiler	M	5	IB	High	B
Rottweiler	M	7	IB	High	B
Rottweiler	M	7	DL	Intermediate	T
Scottish Terrier	M	12	DL	Intermediate	B
Giant Schnauzer	F	4	FL	Intermediate	B
Giant Schnauzer	M	6	DL	Intermediate	T
Miniature Schnauzer	F	7	DSL	Low	T
Old English Sepherd	F	2	DL	Intermediate	T

DSL: Diffuse small cell lymphocytic or plasmacytoid, FSC: Predominant follicular small cleaved cells, FM: M and small cells, FL: Predominant follicular large cells, DSC: Diffuse small cleaved cell, DM: Diffuse mixed si
DL: Diffuse large cells, IB: Immunoblástico, LB: Lymphoblastic, SNC: Small non-cleaved cells.

M: male, F: female

Low grade: DSL, FSC, FM. Intermediate grade: FL, DSC, DM, DL. High grade: IB, LB, SNC.

Cuadro 2RESULTADO DE LA CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA CON EL SISTEMA NCI-WF¹¹HISTOLOGICAL CLASSIFICATION RESULT WITH THE NCI-WF SYSTEM¹¹

Category	Histological grade	Number of cases	Percentage	Percentage considering grade
DSL	Low	6	19.35	22.57
FSC		0	0	
FM		1	3.22	
FL	Intermediate	1	3.22	45.15
DSC		1	3.22	
DM		0	0	
DL		12	38.71	
IB	High	6	19.35	32.25
LB		3	9.68	
SNC		1	3.22	
MF		-	-	
Total		31	100	100

DSL: Diffuse small cell lymphocytic or plasmacytoid, FSC: Predominant follicular small cleaved cells, FM: Mixed follicular large and small cells, FL: Predominant follicular large cells, DSC: Diffuse small cleaved cells, DM: Diffuse mixed small and large cells, DL: Diffuse large cells, IB: Immunoblastic, LB: Lymphoblastic, SNC: Small non-cleaved cells. MF: Mycosis fungoides.

Low grade: DSL, FSC, FM. Intermediate grade: FL, DSC, DM, DL. High grade IB, LB, SNC

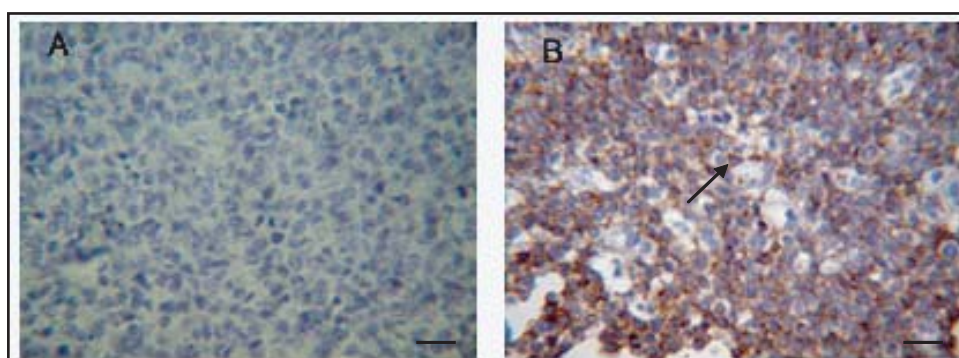


Figura 3: Inmunohistoquímica de un linfoma difuso de células grandes no hendidas de inmunofenotipo celular T. El marcaje es negativo a CD79a, positivo (→) a CD3. 40X Barra = 20 µm

Figure 3: Immunocytochemistry of a T-cell immunophenotype diffuse large non-cleaved lymphoma. A. Marking is negative to CD79a. B. Positive marking (→) to CD3. 40 X Bar = 20 µm.

Discussion

Up to date, several classification systems of non-Hodgkin's lymphoma have been developed; nevertheless, only Kiel and NCI-WF classification systems have demonstrated greater usefulness in canine lymphoma classification because it is the most used system and it does not require especial stains for immunohistochemistry.^{4,6,20} The NCI-WF was selected for the present study due to

cinco linfomas inmunoblásticos de células B y un caso no B/no T.

De tres linfoblásticos, uno de células T, uno de células B y uno de no B/no T, así como un caso de linfoma de células pequeñas hendidas de células B (Cuadro 4).

Los resultados histológicos del presente estudio presentaron una mayor proporción de linfomas de grado bajo con respecto a los demás estudios (Cuadro

Cuadro 3
RESULTADO DE LA CLASIFICACIÓN INMUNOFENOTÍPICA
IMMUNOPHENOTYPIC CLASSIFICATION RESULT

	<i>Number of cases</i>	<i>Percentage</i>
B-cells	13	41.94
T-cells	15	48.39
Undetermined (no-T/no-B)	3	9.68
Total	31	100

Cuadro 4
RELACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOFENOTIPO
HISTOLOGICAL AND IMMUNOPHENOTYPE CLASSIFICATION RELATION

<i>Category</i>	<i>Number of cases</i>	<i>Immunophenotype</i>		<i>No B/no T</i>
		<i>B</i>	<i>T</i>	
DSL	6	2	3	1
FSC	0			
FM	1		1	
FL	1	1		
DSC	1		1	
DM	0			
DL	12	3	9	
IB	6	5		1
LB	3	1	1	1
SNC	1	1		
MF				
Total	31	13	15	3

DSL: Diffuse small cell lymphocytic or plasmacytoid, FSC: Predominant follicular small cleaved cells, FM: Mixed follicular large and small cells, FL: Predominant follicular large cells, DSC: Diffuse small cleaved cells, DM: Diffuse mixed small and large cells, DL: Diffuse large cells, IB: Immunoblástico, LB: Lymphoblastic, SNC: Small non-cleaved cells. MF: Mycosis fungoides.

Low grade: DSL, FSC, FM

Intermediate grade: FL, DSC, DM, DL. High grade: IB, LB, SNC.

its acceptance and diffusion in Mexico, as well as in other regions.^{5,6,12-15,21}

From the present cases, while statistically evaluating the results of malignant grade in contrast to other authors' studies, a statistically significant dif-

Discusión

En la actualidad se han desarrollado diversos sistemas de clasificación del linfoma de tipo no Hodgkin; sin embargo, solamente los sistemas de clasificación de

Cuadro 5
COMPARACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA CON
RESULTADOS DE OTROS AUTORES
HISTOLOGICAL CLASSIFICATION COMPARISON WITH
OTHER AUTHORS' RESULTS

<i>Category</i>	<i>Greenle⁵ et al.</i> <i>(USA) (%)</i>	<i>Carter⁶ et al.</i> <i>(USA) (%)</i>	<i>Teske¹⁵ et al.</i> <i>(EUR) (%)</i>	<i>Ferrer¹³ et al.</i> <i>(EUR) (%)</i>	<i>Fournel Fleury¹⁴</i> <i>et al.</i> <i>(EUR) (%)</i>	<i>Ruslander¹²</i> <i>et al.</i> <i>(USA) (%)</i>	<i>Results in the</i> <i>present study</i> <i>(%)</i>
DSL	10.2	4.9	0.0	14.14	13.04	0	19.35
FSC	0	0	12	0	1.08	0	0
FM	1.1	0.4	4.4	0	0	0	3.22
FL	3.4	0.4	31	4.04	0	0	3.22
DSC	3.4	5.9	8.6	0	0	0	3.22
DM	5.1	2.1	5.2	16.16	1.08	7.69	0
DL	48.3	20.0	30.2	29.29	51.12	30.77	38.71
IB	25.6	24.9	6	11.11	14.13	7.69	19.35
LB	0.6	17.2	0	7.07	1.08	53.85	9.68
SNC	3.2	24.2	0	3.03	4.34	0	3.22
MF	-	-	1.7	15.15	14.13	-	-
N	176	285	116	99	92	15	31

DSL: Diffuse small cell lymphocytic or plasmacytoid, FSC: Predominant follicular small cleaved cells, FM: Mixed follicular large and small cells, FL: Predominant follicular large cells, DSC: Diffuse small cleaved cells, DM: Diffuse mixed small and large cells, DL: Diffuse large cells, IB: Immunoblástico, LB: Lymphoblastic, SNC: Small non-cleaved cells. MF: Mycosis fungoides.

Low grade: DSL, FSC, FM. Intermediate grade: FL, DSC, DM, DL. High grade: IB, LB, SNC

ference was found in respect of studies done in the United States of America, while there was no difference with the rest of the evaluated studies.^{5,6,12-15,21} While comparing the results with the two established geographical areas (United States of America and Europe), statistically significant difference was found in the American Union, while there was no difference with the European.^{14-16,19} Such difference could be due to the fact that 22.57% of the cases were classified as low grade, finding more quantity of these in respect of other studies, where less frequency of this type of lymphoma was observed, which indicate that between 0% and 16.04% of the cases belonged to low grade; a higher difference was observed in respect of studies done in the United States of America geographical zone than studies done in Europe. Nevertheless, the majority of the cases were classified within the intermediate to high grade lymphomas, that coincides with the results of all the authors in other studies,^{5,6,8,12-15,19,21}

5). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa con dos estudios evaluados y no se encontró diferencia estadísticamente significativa con los demás estudios (Cuadro 6). Por otra parte, al evaluar el grado de malignidad en los estudios realizados con dos áreas geográficas, se presentó diferencia estadísticamente significativa con la región de Estados Unidos de América ($P < 0.0001$), mientras que no se encontró diferencia estadística con la región de Europa ($P = 0.5984$) con respecto a este trabajo (Cuadro 7). En este estudio se encontró mayor proporción de linfomas de origen celular T (CD3+) con respecto a otros estudios (Cuadro 8). En los resultados de inmunofenotipo con respecto a las dos áreas geográficas, se presentó diferencia estadísticamente significativa con la región de Europa ($P = 0.001$) y no se encontró diferencia estadísticamente significativa con la región de Estados Unidos de América ($P = 0.1158$) (Cuadro 9).

Cuadro 6

COMPARACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA CON RESULTADOS DE OTROS
AUTORES BASÁNDOSE EN EL GRADO HISTOLÓGICO
HISTOLOGICAL CLASSIFICATION IN COMPARISON WITH OTHER AUTHORS'
RESULTS BASED ON HISTOLOGICAL GRADE

	<i>N</i>	<i>Low grade (%)</i>	<i>Intermediate grade (%)</i>	<i>High grade (%)</i>	<i>Miscellaneous (%)</i>	<i>Origin region</i>	<i>Chi square value</i>	<i>Significance</i>	<i>Statistical difference</i>
Results in the present study	31	22.57	45.15	32.25	0.00	Mexico			
Greenle <i>et al.</i> ⁵	176	11.30	60.20	29.40	0.00	USA	0.3624	0.5472	No
Carter <i>et al.</i> ⁶	285	5.30	28.40	66.30	0.00	USA	19.14	< 0.0001	Yes
Teske <i>et al.</i> ¹⁵	116	16.40	75	6.0	1.70	Europe	1.941	0.1636	No
Ferrer <i>et al.</i> ¹³	99	14.14	49.49	21.21	15.15	Europe	2.361	0.1244	No
Fournel Fleury <i>et al.</i> ¹⁴	92	14.12	51.12	19.55	14.13	Europe	1.816	0.1778	No
Ruslander <i>et al.</i> ¹²	15	0.00	38.46	61.54	0.00	USA	5.149	0.0233	Yes

Cuadro 7

COMPARACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA CON RESULTADOS
DE OTROS AUTORES, CONSIDERANDO EL ÁREA GEOGRÁFICA Y
BASÁNDOSE EN EL GRADO HISTOLÓGICO
HISTOLOGICAL CLASSIFICATION IN COMPARISON WITH OTHER AUTHOR'S RESULTS,
CONSIDERING THE GEOGRAPHICAL AREA AND BASED ON HISTOLOGICAL GRADE

	<i>N</i>	<i>Low grade (%)</i>	<i>Intermediate grade (%)</i>	<i>High grade (%)</i>	<i>Miscellaneous (%)</i>	<i>Chi square value</i>	<i>Significance</i>	<i>Statistical difference</i>
Results in the present study	31	22.57	45.15	32.25	0.00			
Europe ^{14,15,16}	275	15.08	60.32	15.08	9.51	0.9354	0.3334	No
USA ^{19,25,28}	1029	5.45	33.07	57.61	0.00	51.15	< 0.0001	Yes

which suggests that in Mexico, as in other geographical zones, the majority of canine lymphoma presents an intermediate to high histological grade; nevertheless, the results of this study show higher proportion of low malignant grade cases.

Kiel y del NCI-WF han demostrado mayor utilidad en la clasificación del linfoma canino debido a que son los más utilizados y no requieren de tinciones especiales para inmunohistoquímica.^{4-6,20} Para el presente estudio se seleccionó el sistema del NCI-WF,

Cuadro 8

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL INMUNOFENOTIPO CON OTROS AUTORES
 IMMUNOPHENOTYPE RESULTS IN COMPARISON WITH OTHER AUTHORS

	<i>Number of cases</i>	<i>B-cells (%)</i>	<i>T-cells (%)</i>	<i>No B/no T (%)</i>	<i>Origin region</i>	<i>Chi square value</i>	<i>Significance</i>	<i>Statistical difference</i>
Study results	31	41.94	48.39	9.68				
Fournel <i>et al.</i> ¹⁴	92	73.91	26.09		Europe	23.37	0.0001	Yes
Ferrer <i>et al.</i> ¹³	99	58	42		Europe	8.652	0.0033	Yes
Kosarek <i>et al.</i> ¹⁷	185	65.41	22.70	11.89	USA	4.322	0.0376	Yes
Caniatti <i>et al.</i> ¹⁸	18	77.78	16.67	5.56	Europe	18.43	0.0001	Yes
Fisher <i>et al.</i> ¹⁹	11	88.89	11.11		USA	45.34	0.0001	Yes
Dobson <i>et al.</i> ⁸	48	82.60	13.0	4.35	Europe	25.55	0.0001	Yes
Burnett <i>et al.</i> ¹⁶	24	50	35	15	USA	0.1539	0.8627	No
Teske <i>et al.</i> ¹⁵	95	58.90	37.90	3.20	Europe	6.525	0.0106	Yes

Cuadro 9

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL INMUNOFENOTIPO CON RESULTADOS DE OTROS AUTORES, CONSIDERANDO EL ÁREA GEOGRÁFICA
 IMMUNOPHENOTYPE RESULTS IN COMPARISON WITH OTHER AUTHORS' RESULTS, CONSIDERING THE GEOGRAPHICAL AREA

	<i>Number of cases</i>	<i>B-cells (%)</i>	<i>T-cells (%)</i>	<i>No B/no T cells (%)</i>	<i>Chi square value</i>	<i>P</i>	<i>Statistical difference</i>
Results in the present study	31	41.94	48.39	9.68			
Europe ^{8,14-16,27}	374	62.83	29.68	1.60	10.88	0.001	Yes
USA ^{19,25,28}	220	65.00	23.18	11.82	2.473	0.116	No

As aforementioned, the NCI-WF classification system is not an ideal histological classification of canine lymphoma, because there can be differences in other geographical zones; therefore, its evaluation with new systems as the Histological Classification of Hematopoietic Tumors and Lymphoid Tissues of the World Health Organization is suggested.²² The antibodies utilized in this study, anti-CD3 and anti-CD79a,

por su mayor aceptación y difusión en México, así como en otras regiones.^{5,6,12-15,21}

De los casos presentados, al evaluar estadísticamente los resultados del grado de malignidad con los estudios de otros autores, se encontró diferencia estadísticamente significativa con respecto a estudios realizados en Estados Unidos de América, mientras que no se encontró diferencia

confirmed its usefulness in the immunophenotypification of canine lymphoma tissues preserved in paraffin, as it had been used by other authors.^{8,10,13,14,16,17,23-27} While evaluating the results of the utilized markers, a statistically significant difference was found in respect of seven of the eight studies done, five of them in European regions and two in the United States of America.^{8,13-19}

While comparing the results with the established geographical regions, a statistically significant difference was found only with the European region. This difference could be explained due to the fact that, in contrast with Europe and the American Union, in the present study it was found higher percentage of T-cell origin lymphoma cases than B origin.^{8,13,14,17-19,27,28} This last suggests that in Mexico there is greater proportion of T-cell canine lymphoma cases; nevertheless, it is relevant to do more studies to confirm it. Likewise, highest percentage of no T/no B or null cells in respect of geographic zones was found in Mexico, difference well-known to European studies, which suggests that in Mexico, or America, there is greater proportion of no B/ no T-cell cases.

In three cases of the present study, one histological classified as lymphoblastic, other as immunoblastic and one more as lymphocytic lymphoma, it was useful to mark any of the utilized antibodies (CD3 and CD79a), classifying as null or no B/no T-cells. Previously, it had been reported a low incidence of no B/no T-lymphomas, independently of the histological type,^{8,19,27,28} such a phenomenon has also been recognized in human non-Hodgkin's type lymphoma, where the origin of these types of lymphomas is attributed to cytosine natural cells or NK, which in humans are: CD56, CD94 and CD16.²⁹

These antigens, in reviewed literature, have not been utilized in dogs; in this sense, it is unknown if there is a cross reaction between these species.^{8,14,18,28} A second possibility to CD3 and CD79a negative marking, is that their origin came from B-precursor or T-immature cells, which in this state they do not present CD79a and CD3 expression in their membranes; therefore, it would be necessary to utilize specific membrane markers for membrane antigen expression in these cell phases. The utilization of CD9 and CD10 for B-precursor lymphocytes and B-pre cells, as well as CD44, CD25 and CD117 for early precursor T-lymphocytes and T-immature lymphocytes is reported in humans.²⁹

In one study, Greenle *et al.*⁵ used CD25 as marker in five, and all of them were negative; therefore, it was not possible to determine its utility in dogs. Up to date, CD9, CD10, CD44 and CD117 markers have not been used in canine cases.^{8,14,18,28} It is possible that failures for the use of these immunomarkers are

con el resto de los estudios evaluados.^{5,6,12-15,21} Al comparar los resultados con las dos áreas geográficas establecidas (Estados Unidos de América y Europa), se encontró diferencia estadísticamente significativa con la región de la Unión Americana, mientras que no se halló diferencia con la de Europa.^{14-16,19,25,28} Dicha diferencia pudiera deberse a que 22.57% de los casos fueron clasificados de grado bajo, encontrando mayor cantidad de éstos con respecto a otros trabajos, en donde se observó menor frecuencia de este tipo de linfoma, y que indican que entre 0% y 16.04% de casos pertenecieron al grado bajo; se observó una mayor diferencia con respecto a los estudios realizados en la zona geográfica de Estados Unidos de América que con los estudios realizados en Europa. Sin embargo, la mayoría de los casos fueron clasificados dentro de los linfomas de grado intermedio a alto, ello coincide con los resultados de otros estudios,^{5,6,8,12-15,19,21} lo que sugiere que en México, como en otras áreas geográficas, la mayoría de los casos de linfoma canino presenta un grado histológico de intermedio a alto; sin embargo, los resultados en este estudio muestran mayor proporción de casos de grado bajo de malignidad.

Como se ha mencionado, el sistema de clasificación NCI-WF no es un sistema ideal de clasificación histológica del linfoma canino, debido a que pueden encontrarse diferencias con otras zonas geográficas, por lo que se sugiere su evaluación con nuevos sistemas, como la Clasificación Histológica Internacional de Tumores Hematopoyéticos y Tejidos Linfoides de la Organización Mundial de la Salud.²² Los anticuerpos utilizados en este trabajo, anti-CD3 y anti-CD79a, confirman su utilidad en la inmunofenotipificación de los tejidos de linfoma canino preservados en parafina, como había sido empleado por otros autores.^{8,10,13,14,16,17,23-27} Al evaluar los resultados de los marcadores empleados, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con respecto a siete de los ocho estudios realizados, cinco de ellos en regiones europeas y en dos de Estados Unidos de América.^{8,13-19}

Al comparar los resultados con las dos regiones geográficas establecidas, se encontró una diferencia estadísticamente significativa sólo con la región de Europa. Esta diferencia pudiera deberse a que, en comparación con Europa y la Unión Americana, en el presente estudio se encontró mayor porcentaje de casos de linfoma de origen celular T que de origen B.^{8,13,14,17-19,27,28} Esto último sugiere que en México existe mayor proporción de casos de linfoma canino de células T; sin embargo, es pertinente realizar mayores estudios para confirmarlo. Asimismo, en México se encontró mayor porcentaje de linfomas de células no T/no B o células nulas con respecto a las

due to the presence of anaplastic or wrong differentiated malignant lymphocytes, which do not express the same molecules or proteins present in well differentiated cells.

Other possibility for the negative result either to CD3 or to CD79a, is an inadequate fixation of the sample, which would have caused structural damages to membrane antigens, propitiating that antigens would not be recognized by the antibodies.

The present study, while being a retrospective one, lacks control of the fixation and management of the sample before this is paraffin processed. Here, two cases presented positive marking for both antibodies. There are reports of T-lymphoblastic lymphomas that demonstrate the conjunctive expression of CD3 and CD79a in the same cell;¹⁷ nevertheless, malignant cells were recognized as positives to specific markers and there was a percentage predominance in the expression of one of the membrane antigens; consequently, they were classified as B or T-lymphomas, depending on the predominant neoplastic cells of each marker, with an estimate of 60% of B-cells with neoplastic characteristics, in one of the cases, and 50% of neoplastic B-cells in the second case; this criterion has been taken by other authors.^{8,28} The utilization of the morphological criterion for canine lymphoma classification, has demonstrated to be inadequate in previous studies.³⁰ In contrast to the immunophenotype, either by immunohistochemistry or flow cytometry, this technique has demonstrated to have great utility in the diagnosis through the identification of line cell specific markers.

Currently, it has been demonstrated that in the majority of human lymphomas and leukemia, there is gene expression profiling that characterizes the different types of these neoplasms; also, among the different histological and immunophenotypic types of lymphoma and leukemia, different subtypes based on gene expression profiling can be identified.³¹

In the future, this type of projects could be performed easier, obtaining a better canine lymphoma classification, based on the histological, immunophenotypic and genetic characteristics.

Referencias

1. TESKE E. Canine Malignant Lymphoma: A Review and Comparisson with Human Non-Hodgkin's Lymphoma. *Vet Q* 1994;16: 209-219.
2. COUTO CG. Canine Lymphomas: Something Old, Something New. *Compend Cont Ed Pract Vet* 1985; 7: 291-302.
3. HAHN KA, RICHARDSON RC, HAHN EA, CRISMAN CL. Diagnostic and Prognostic Importance of Chromosomal Aberrations Identified in 61 Dogs with Lymphosarcoma. *Vet Pathol* 1994; 31:528-540.

dos zonas geográficas, diferencia más notoria con los estudios de Europa, lo que sugiere que en México, o en América, existe una mayor proporción de casos de células no B/ no T.

En tres casos del presente trabajo, uno clasificado histológicamente como linfoma linfoblástico, otro como inmunoblástico y uno más como linfoma linfocítico, no se logró marcar para ninguno de los anticuerpos utilizados (CD3 y CD79a), clasificándose como células nulas o no B/no T. Anteriormente se había informado sobre una baja incidencia de linfomas no B/ no T, independientemente del tipo histológico,^{8,19,27,28} dicho fenómeno también se ha reconocido en linfoma tipo no Hodgkin en humanos, donde se atribuye que el origen de este tipo de linfomas es a partir de células naturales citocidas o NK; para su confirmación, sería necesario utilizar otros anticuerpos específicos para antígenos de membrana de las células NK, que en humanos son: CD56, CD94 y CD16.²⁹

Estos antígenos, en la revisión de la literatura, no han sido utilizados en perros; en este sentido, se desconoce si existe una reacción cruzada entre estas especies.^{8,14,18,28} Una segunda posibilidad del marcaje negativo a CD3 y CD79a, es que su origen fuera a partir de células precursoras B o inmaduras T, las cuales en este estado no presentan la expresión de CD79a y CD3 en sus membranas, por lo que sería necesario utilizar marcadores de membrana específicos para la expresión de antígenos de membrana en estas fases celulares. En humanos se informa la utilización de CD9 y CD10 para linfocitos precursores B y células pre B, así como CD44, CD25 y CD117 para precursores tempranos de linfocitos T y linfocitos inmaduros T.²⁹

En un estudio, Greenlee *et al.*⁵ emplearon el CD25 como marcador en cinco, y todos ellos fueron negativos, por lo cual no fue posible determinar su utilidad en perros. Los marcadores CD9, CD10, CD44 y CD 117 no han sido utilizados hasta ahora en casos de cánidos.^{8,14,18,28} Es posible que las fallas para el empleo de estos inmunomarcadores se deba a la presencia de linfocitos malignos anaplásicos o mal diferenciados, que no expresen las mismas moléculas o proteínas presentes en las células bien diferenciadas.

Otra posibilidad del resultado negativo tanto a CD3 como a CD79a, es el de una fijación inadecuada de la muestra, que hubiera causado daños estructurales a los antígenos de membrana, propiciando que los anticuerpos no reconocieran a dichos antígenos.

El presente estudio, al ser de carácter retrospectivo, carece de control sobre la fijación y manejo de la muestra antes de ser procesada en parafina. Aquí, dos casos presentaron marcaje positivo para ambos anticuerpos. Existen informes de linfomas linfoblásticos T que demuestran la expresión conjunta de CD3 y CD79a en la misma célula;¹⁷ sin embargo,

4. MADEWELL BR. Canine Lymphoma. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract* 1985; 15: 709-722
5. GREENLEE PG, FILIPPA DA, QUIMBY FW, PATNAIK AK, CALVANO SE, MATUS RE *et al.* Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 1990; 66:480-490.
6. CARTER RE, VALLI VE, LUMSDEN JH. The Cytology, Histology and Prevalence of Cell Types in Canine Lymphoma Classified According to the National Cancer Institute Working Formulation. *Can J Vet Res* 1986; 50:154-164.
7. MORRIS JS, DUNN JK, DOBSON JM. Canine Lymphoid Leukemia and Lymphoma with Bone Marrow Involvement: A Review of 24 Cases. *J Small Anim Practice* 1993; 34:72-79
8. DOBSON JM, BLACKWOOD LB, MCINNES EF, BOSTOCK DE, NICHOLLS P, HOATHER TM *et al.* Prognostic Variables in Canine Multicentric Lymphosarcoma. *J Small Anim Pract* 2001; 42: 377-384.
9. PAGE R. Canine and Feline Lymphoma: Review of Prognostic Factors and Treatment Options. 26th World Congress Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association; 2001 August 8-11; Vancouver, British Columbia, Canada. Vancouver, British Columbia, Canada: WSAVA, 2001: 546-548.
10. RASKIN RE, FOX LE. An Interim Analysis of Geographic Differences in Morphology and Immunophenotype from 138 Cases of Canine Lymphoma. Mid-year Conference Proceedings of the 22nd Annual Conference of the Veterinary Cancer Society; 2002 April 11-14; Galena Illinois USA. Galeana Illinois USA: VCS, 2002: 11.
11. NATIONAL CANCER INSTITUTE. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. National Cancer Institute Sponsored Study of Classifications of Non-Hodgkin's Lymphomas: Summary and Description of a Working Formulation for Clinical Usage. *Cancer* 1982; 49: 2112-2135.
12. RUSLANDER D, MOORE AS, GLIATTO JM, L'HEUREUX D, COTTER SM. Cytosine Arabinoside as a Single Agent for the Induction of Remission in Canine Lymphoma. *J Vet Inter Med* 1994; 8:299-301.
13. FERRER L, FONDEVILA D, RABANAL R, TARRES J, RAMIS A. Immunohistochemical detection of CD3 Antigen (Pan T Marker) in Canine Lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5:616-620.
14. FOURNEL-FLEURY C, MAGNOL JP, BRICAIRE P, MARCHAL T, CHABANNE B, DELVERDIER A *et al.* Cytohistological and Immunological Classification of Canine Malignant Lymphomas: Comparison with Human Non-Hodgkin's Lymphomas. *J Comp Path* 1997; 117:35-59.
15. TESKE E, WISMAN P, MOORE PF, VAN HEERDE P. Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Exp Hematol* 1994; 22:1179-1187.
16. BURNETT RC, VERNAU W, MODIANO JF, OLVER CS, MOORE PF, AVERY AC. Diagnosis of Canine Lymphoid Neoplasia Using Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes. *Vet Pathol* 2003; 40:32-41.
17. KOSAREK CE, KISSEBERTH WC, KOCIBA GJ. Use of

en estos casos las células malignas fueron reconocidas como positivas para los marcadores específicos y existía una predominancia en el porcentaje en la expresión de alguno de los antígenos de membrana, por lo que fueron clasificados en linfomas B o T, dependiendo de las células neoplásicas predominantes de cada marcador, con un estimado de 60% de células B con características neoplásicas, en uno de los casos, y 50% de células B neoplásicas en el segundo caso; este criterio ha sido tomado por otros autores.^{8,28} La utilización del criterio morfológico para la clasificación del linfoma canino, ha demostrado ser inadecuado en estudios previos.³⁰ A diferencia del inmunofenotipo, ya sea por inmunohistoquímica o citometría de flujo, esta técnica ha demostrado ser de gran utilidad en el diagnóstico a través de la identificación de marcadores específicos de líneas celulares.

Recientemente se ha demostrado que en la mayoría de los linfomas y leucemias en humanos, existen perfiles de expresión génica que caracterizan a los diferentes tipos de estas neoplasias; además, dentro de los distintos tipos histológicos e inmunofenotípicos de linfoma y leucemia, se pueden identificar diferentes subtipos con base en el perfil de expresión génica.³¹

En el futuro, este tipo de proyectos podrían ser realizados con mayor facilidad, obteniendo así mejor clasificación del linfoma canino, basada en características histológicas, inmunofenotípicas y genéticas.

Microarrays for Analysis of Canine Lymphoma. Proceedings of the 22nd Annual Conference of the Veterinary Cancer Society; 2002 april 11-14, Galena Illinois USA. Galeana Illinois USA: VCS, 2002:22.

18. CANIATTI M, ROCCABIANCA P, SCANZIANI E, PALTRINIERI S, MOORE PF. Canine Lymphoma: Immunocytochemical Analysis of Fine-needle Aspiration Biopsy. *Vet Pathol* 1996; 33:204-212.
19. FISHER DJ, NAYDAN D, WERNER LL, MOORE PF. Immunophenotyping Lymphomas in Dogs: A Comparison of Results From Fine Needle Aspirate and Needle Biopsy Samples. *Vet Clin Path* 1995; 24:118-123.
20. VAIL DM, MACEWEN EG, YOUNG KM. Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemias. In: WITHROW SJ, MACEWEN EG, editors. *Small Animal Clinical Oncology*. 3a ed. Philadelphia, EUA: WB Saunders Company, 2001: 558-590.
21. MILNER RJ, PEARSON J, NESBIT JW, CLOSE P. Immunophenotypic Classification of Canine Malignant Lymphoma on Formalin-Fixed Paraffin Wax-Embedded Tissue by Means of CD3 and CD79a Cell Markers. *Onderstepoort J Vet Res* 1996; 63:309-313.
22. VALLI VE, JACOBS RM, PARODI AL, VERNAU W, MOORE PF. Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals. Washington DC, USA: Armed Forces Institute of Pathology, 2002.
23. KELLER ET. Immune-Mediated Disease as a Risk Factor for Canine Lymphoma. *Cancer* 1992; 70: 2334-2337.

24. DAY MJ. Immunophenotypic Characterization of Cutaneous Lymphoid Neoplasia in the Dog and Cat. *J Comp Path* 1995; 112: 79-96.
25. VERNAU B, MOORE P. Immunophenotyping in the Dog. *Vet Cancer Soc Newsl* 2001; 25:1-10.
26. KIUPEL M, TESKE E, BOSTOK D. Prognostic Factors for Treated Canine Malignant Lymphoma. *Vet Pathol* 1999; 36:292-300.
27. TESKE E. Prognostic Factors for Malignant Lymphoma in the Dog: an Update. *Vet Q* 1994;16:29-31.
28. THOMAS R, SMITH KC, GOULD R, GOWER SM, BINNS MM, BREEN M. Molecular Cytogenetic Analysis of a novel High-grade Canine T-Lymphoblastic Lymphoma Demonstrating Co-expression of CD3 and CD79a Cell Markers. *Chromosome Res* 2001; 9:649-657.
29. ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. Maduración de los linfocitos B y expresión de los genes de las inmunoglobulinas. En: ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS, editores. *Inmunología Celular y Molecular*. 3ª ed. Madrid (España): Ed. Interamericana-McGraw Hill, 1999: 71-101.
30. VERNAU W, MOORE PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69:145-164.
31. ALIZADEH AA, EISEN MB, DAVIS RE, LOSSOS IS, ROSENWALD A, BOLDRICK JC *et al*. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403:503-511.