

Inmunotipificación de linfoma canino y su relación con el pronóstico clínico

ARTÍCULO
CORTO



Mónica Aristizábal-Arbeláez¹, Lina Osorio-Morales¹, Francisco Pedraza-Ordóñez^{1, 2}

¹Grupo de Investigación en Patología Veterinaria, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

²Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

fpedraza@ucaldas.edu.co

(Recibido: octubre 5, 2010; aprobado: noviembre 24, 2010)

RESUMEN: El linfoma canino ha sido útil como modelo animal en los linfomas no Hodgkin de los humanos. En este trabajo se relatan cinco casos de linfoma maligno (linfosarcoma) en caninos que murieron por causa de la enfermedad. Los casos fueron inmunomarcados utilizando anticuerpos mono y policlonales contra antígenos de superficie de Linfocitos T y B con el fin de clasificar las neoplasias y establecer parámetros de pronóstico alrededor de esta característica celular. Dos casos fueron clasificados como originarios de las células T y ninguno originado en las células B. Se discute sobre la posibilidad de utilizar la inmunomarcación en futuros casos donde se pueda establecer criterios de pronóstico y tratamiento en los pacientes afectados por linfoma canino.

Palabras clave: anticuerpos, inmunomarcación, linfosarcoma, neoplasias, perros

Immunophenotyping of canine lymphoma and relationship with clinical prognosis

ABSTRACT: Canine lymphoma has been a useful animal model for non-Hodgkin's lymphomas in humans. Five cases of malignant lymphoma (lymphosarcoma) in dogs that died due to illness are accounted for in this study. The cases were immuno-labeled using monoclonal and polyclonal antibodies against surface antigens of T and B Lymphoid cells in order to attempt the neoplasias classification and to establish prognostic parameters around this cellular characteristic. Two cases were classified as originating from T cells and no one in the B cells. The possibility of using immunohistochemistry in future cases where prognostic criteria and treatment in patients affected by canine lymphoma can be established is discussed.

Key words: antibodies, immune-labeled, lymphosarcoma, neoplasias, dogs

Introducción

El linfoma es una de las neoplasias frecuentes en la especie canina representando el 24,7% (Gavazza et al., 2008) de las neoplasias de todos los sistemas orgánicos y aproximadamente el 83% de los tumores hematopoyéticos (Kaiser, 1981; Jacobs et al., 2002). Debido a que el linfoma canino tiene muchas similitudes con el linfoma no Hodgkin (LNH), es un modelo atractivo para los estudios en humanos (Jamadar et al., 2009; Vail et al., 2009). En humanos, los linfomas Hodgkin y los LNH se diferencian, entre otras características, porque los primeros muestran la presencia de unas células gigantes (más de 50 μm) denominadas de *Reed-Sternberg* (Chuaqui & González, 2011). Los LNH son más frecuentes y el riesgo de sufrir la enfermedad y morir es cada vez mayor, lo que obliga a un tratamiento quirúrgico, radioterapia, quimioterapia o terapia biológica, para tratar de controlar la enfermedad (Gavazza et al., 2008). Recientemente fue publicado un artículo señalando que el uso de animales de compañía aparentemente tiene un efecto benéfico en el sentido de reducir la probabilidad de sufrir LNH (Tranah et al., 2008).

Igual como ocurre en humanos, existen varios sistemas de clasificación de tumores linfoides en los animales domésticos. La denominada clasificación de Kiel, actualizada con base a criterios inmunocitológicos se puede aplicar a la citología por aspiración con aguja fina (Fournel et al., 1997), existiendo correlaciones fuertes con la clasificación de la OMS (Uppenkamp & Feller, 2002; Ponce et al., 2010; Vezzali et al., 2010). Otra clasificación tiene que ver con el sitio donde se origina, pudiendo ser mediastínico, multicéntrico, gastrointestinal y extranodal, este último involucra a los riñones, el sistema nervioso central, la piel y el corazón, entre otros (Gavazza et al., 2008). El linfoma multicéntrico es el más frecuente (85% de los casos), se localiza a nivel de los ganglios linfáticos pudiendo algunas veces involucrar al hígado, bazo y médula ósea, explicando de esa forma la presentación de los signos clínicos inespecíficos como anorexia, pérdida de peso, vómito, diarrea, poliuria, polidipsia y fiebre (Gavazza et al., 2008).

La mayoría de los linfomas en los caninos son de grado histológico alto o intermedio, mientras que el linfoma de bajo grado (menos agresivo) representa cerca del 5% de los casos (Arespacochaga et al., 2007). Varios factores pronósticos se han reportado en el linfoma canino, entre ellos el género (MacEwen et al., 1987), el peso corporal (Garrett et al., 2002), la presencia de anemia (Miller et al., 2009), el estadio clínico (Hosoya et al., 2007) y el inmunofenotipo (Greenlee et al., 1990).

La inmunotipificación de linfomas en caninos ha permitido en muchos casos la aproximación entre el diagnóstico y el pronóstico, facilitando las decisiones clínicas de tratamiento o eutanasia de los pacientes, sin embargo, en algunos casos en los que la inmunotipificación no fue posible, el diagnóstico clásico morfológico fue la única opción para establecer ese factor pronóstico (Arespacochaga et al., 2007).

El estudio tuvo como objetivo analizar las posibles diferencias en la expresión de receptores de membrana que permitieran clasificar los casos de linfoma en dos grupos (células B o células T) y comparar esa expresión con la condición de malignidad de los diagnósticos obtenidos.

Material y Métodos

Animales y tipo de estudio

Se realizó un estudio retrospectivo utilizando el archivo del Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad de Caldas, donde se encontraron dieciocho casos registrados con el diagnóstico de Linfoma canino entre el año 2000 y el 2008. Once casos presentaron datos clínico-patológicos completos, de los cuales ocho caninos habían muerto o fueron eutanasiados por causa de la enfermedad avanzada y ninguno había recibido tratamiento. De estos últimos, solo de cinco casos se tenía archivo de tejidos conservados en bloques de parafina y finalmente fueron usados para la presente investigación. Todos los animales fueron atendidos por consulta externa

en el Hospital Veterinario de la Universidad de Caldas por manifestar decaimiento general, inapetencia, aumentos de volumen en nodos linfoides en diferentes partes del cuerpo y en la piel. El criterio diagnóstico incluyó radiografías, biopsias por aspiración con aguja fina y finalmente histopatología a partir de especímenes obtenidos en las necropsias.

Estudio inmunohistoquímico

El estudio inmunohistoquímico fue realizado en el Laboratorio de Patología de la Universidad Estadual Paulista (FCAV-UNESP), en Sao Paulo, Brasil, de acuerdo a la técnica estandarizada en el Laboratorio de Neuropatología (Pedraza et al., 2008). Los anticuerpos primarios, los secundarios y el tipo de recuperación antigénica se resumen en la Tabla 1. Los cortes de tejido fueron desparafinados por calor y colocados en baños de alcohol en concentraciones decrecientes

para deshidratarlos. Posteriormente se utilizó un bloqueador de peroxidasa endógena (Dako®) durante 20 minutos. Los cortes fueron bañados en solución tampón de salina fosfato (PBS) e incubados por 30 minutos en una solución de albúmina sérica bovina en PBS al 2,5% para bloquear proteínas inespecíficas. Tres incubaciones se realizaron seguidas cada una por dos lavados con PBS; primero, con el anticuerpo primario específico para cada antígeno celular; segundo, con un anticuerpo secundario biotinilado dirigido contra el anticuerpo primario; y tercero, con el complejo avidina-biotina (Dako®) diluido en PBS durante 30 minutos a 30°C. El complejo se reveló con la adición de 3,3 diaminobenzidina.

Finalmente los cortes fueron contra coloreados con hematoxilina de Harris, deshidratados por el paso en varios alcoholes crecientes, aclarados con xilol y montados con bálsamo de Canadá.

Tabla 1. Relación de anticuerpos utilizados para detectar dos poblaciones de linfocitos en tejido neoplásico linfoide de caninos.

Reactivación / Recuperación Antigénica	Anticuerpos primarios	Dilución / Tiempo	Anticuerpos secundarios	Dilución / Tiempo
Stem Cock ¹	Antilinfocito B NCL-BLA 36 ³	1:200 12-18 horas	Cabra anti-ratón ^b	1:200 45 minutos
Pronasa ²	Antilinfocito T CD ₃ ^{4a}	1:100 2 horas	Cabra anti-conejo ^c	1:300 45 minutos

¹ Stem cock, 20 minutos (solución de citrato pH 6,0). ² Recuperación enzimática, 15 minutos.

³ Anticuerpo monoclonal. ⁴ Anticuerpo policlonal. ^a Dako A0452. ^b Dako E0433. ^c Dako E0432.

Resultados y Discusión

Todos los casos fueron considerados de alta malignidad, tanto por la clasificación morfológica de las neoplasias como por la condición clínica de los pacientes que finalmente murieron por causa de la enfermedad. La inmunodetección, usando anticuerpos contra el antígeno CD₃ de la superficie celular de Linfocitos T, permitió la localización de este tipo de células en un alto grado de infiltración en dos de los cinco casos,

diagnosticados histopatológicamente como linfoma, uno de ellos con metástasis a varios órganos. Los Linfocitos B evidenciados por la detección del antígeno BLA, fueron encontrados solo en un caso que había sido también positivo a la marcación de CD₃, sin embargo, por el escaso conteo de linfocitos marcados (calculado en menos del 5% de la proporción) se consideró negativo (Figura 1 y Tabla 2), aunque existen reportes de linfomas linfoblásticos T que demuestran expresión conjunta de CD₃ y CD_{79a}

(usado para Linfocitos B) en la misma célula (Sapierzyński, 2010). Los restantes tres casos, un linfoma, un linfoma multicéntrico y un linfosarcoma multicéntrico linfoblástico, fueron negativos para la detección de ambos marcadores y fueron clasificados como linfomas no B/no T. Lo mismo ha ocurrido en LNH en humanos, donde se atribuye que el origen de este tipo de linfomas es a partir de células naturales asesinas (NK);

para su confirmación, sería necesario utilizar otros anticuerpos específicos para antígenos de membrana de esas células, que en humanos son CD56, CD94 y CD16 (Abbas et al., 1999). Estos antígenos no han sido utilizados en perros y, por lo tanto, se desconoce si existe una reacción cruzada entre estas especies (Dobson et al., 2001; Thomas et al., 2001).

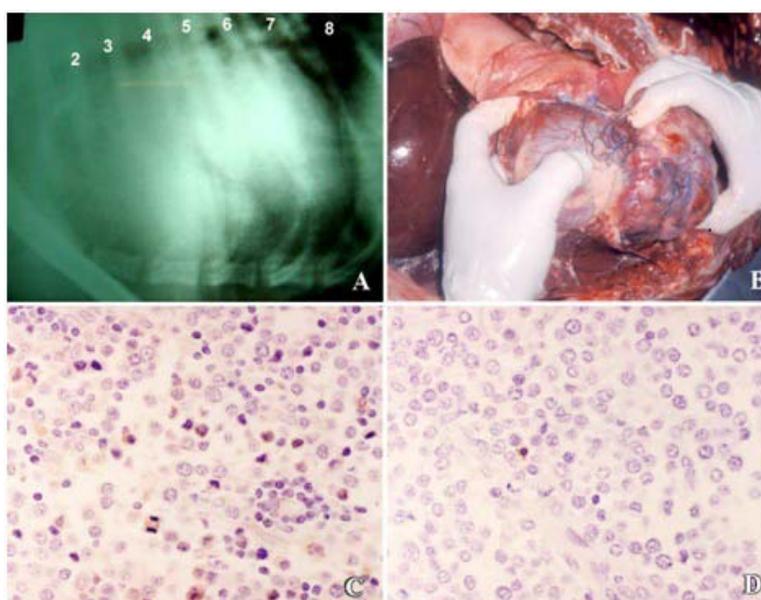


Figura 1. A: radiografía mostrando un desplazamiento cardíaco hacia el quinto y el octavo espacios intercostales. B: se aprecia en la mano izquierda el corazón y en la mano derecha un aumento de volumen de aproximadamente el doble de tamaño del corazón. C: coloración inmunohistoquímica para CD3 (Linfocitos T). D: coloración inmunohistoquímica para BLA (Linfocito B).

Tabla 2. Principales datos de los pacientes relacionados.

Número	Raza	Sexo	Edad	Diagnóstico histopatológico	Característica Inmunofenotípica	
					CD ₃	BLA
00-003	Mestizo Pastor	Macho	8 años	Linfoma y metástasis	Positivo	Negativo
	Boxer	Macho	6 años	Linfoma	Positivo	Negativo *
06-126	Siberiano	Hembra	10 años	Linfosarcoma multicéntrico linfoblástico	Negativo	Negativo
07-097	Labrador dorado	Macho	7 años	Linfoma	Negativo	Negativo
08-054	Labrador	Macho	7 años	Linfoma multicéntrico	Negativo	Negativo

* Inicialmente positivo, sin embargo, fue considerado negativo por la escasa marcación contra el antígeno BLA de la superficie celular del Linfocito B.

Una segunda posibilidad para que no hubiera marcación es que su origen fuera a partir de células precursoras B o inmaduras T, las cuales en este estado no presentan la expresión de los anticuerpos usados, por lo que sería necesario utilizar marcadores de membrana específicos, como ocurre en humanos con los CD9 y CD10 para precursores B y CD44, CD25 y CD117 para precursores T (Abbas et al., 1999).

El control positivo para los dos marcadores usados en el presente estudio correspondió a un linfonodo normal de canino, el cual fue procesado con 12 horas de fijación en una solución de formol tamponado en fosfato, mientras que los casos analizados estuvieron por un periodo de tiempo que varió entre los cinco días y los dos meses en solución fijadora de formol ácido, lo cual podría ser un motivo para ocasionar daños estructurales a los antígenos de membrana y de esta forma los anticuerpos no pudieran ligarse a ellos, tal vez utilizando otros sistemas simultáneos de recuperación antigénica (como la utilización de un sistema pascal de presión) los resultados podrían variar en este sentido. De igual forma, el uso de un linfonodo normal como control positivo podría estar relacionado con otra posibilidad para intentar explicar la falla en la utilización de estos inmunomarcadores, tal como está reportado en la literatura, que puede ser la presencia de linfocitos malignos anaplásicos o mal diferenciados que no expresen las mismas moléculas o proteínas presentes en las células bien diferenciadas (Álvarez et al., 2009).

Existen reportes en el sentido de que la clasificación morfológica del linfoma canino como único parámetro de pronóstico clínico no es adecuada, mientras que la inmunotipificación ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico a través de identificación de marcadores específicos en las líneas celulares (Vernau & Moore, 1999). Se sabe que la mayoría de linfomas y leucemias en humanos tienen perfiles de expresión génica que caracterizan a los diferentes tipos histológicos e inmunofenotípicos de linfoma y leucemia; se pueden identificar diferentes subtipos con base en el perfil de expresión génica

(Alizadeh et al., 2000). En el presente estudio se pudo establecer que los pacientes afectados con este tipo de tumores en algunas ocasiones se agravan y terminan muriendo por causa de la enfermedad, esto es, por la carencia de un protocolo de manejo que incluya un diagnóstico temprano con un criterio inmunomolecular que facilite el establecimiento de un pronóstico y permita recuperar algunos casos mediante tratamiento quimioterapéutico. En el futuro, este tipo de estudios podrían ser realizados con mayor facilidad, obteniendo así una mejor clasificación del linfoma canino, con base en las características histológicas, inmunofenotípicas y genéticas.

Conclusiones

Fue posible marcar Linfocitos T y B en casos de linfoma canino que habían sido archivados en bloques de parafina, lo que permite suponer una eficiente utilización de la técnica de inmunohistoquímica para casos rutinarios en el Hospital Veterinario de la Universidad de Caldas.

El linfoma canino en Manizales deber ser mejor estudiado y caracterizado con el fin de iniciar protocolos de tratamiento en pacientes que puedan ser sometidos a este tipo de terapia.

Es necesario proponer investigaciones tendientes a la inmunotipificación de linfomas caninos, relacionando las diferentes moléculas presentes en ellos con el pronóstico clínico de los pacientes afectados.

Referencias Bibliográficas

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S.; editores. **Maduración de los linfocitos B y expresión de los genes de las inmunoglobulinas, Inmunología Celular y Molecular**. 3.ed. Madrid, España: Interamericana - McGraw-Hill, 1999. p.71-101.
- Alizadeh, A.A.; Eisen, M.B.; Davis, R.E. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, v.403, p.503-511, 2000.

- Álvarez-Berger, F.J.; Fernández, E.A.; Aristi-Urista, G.; Chávez-Gris, G. Estudio histológico e inmunofenotípico de linfoma canino en el centro de México. **Veterinaria México**, v.40, n.2, p.141-155, 2009.
- Arespachochaga, G.; Schwendenwein, I.; H. Weissenbock. Retrospective Study of 82 Cases of Canine Lymphoma in Austria based on the Working Formulation and Immunophenotyping. **Journal Comparative Pathology**, v.136, p.186-192, 2007.
- Chuaqui, B.J.; González, B.S.; editores. Tumores de tejidos linforreticulares y hematopoyéticos. En: **Manual de Patología general**. Pontificia Universidad Católica de Chile, 2001. Disponible en: http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_099.html Accesado en: 15/02/2011.
- Dobson, J.M.; Blackwood, L.B.; McInnes, E.F. et al. Prognostic Variables in Canine Multicentric Lymphosarcoma. **Journal Small Animal Practice**, v.42, p.377-384, 2001.
- Fournel-Fleury, C.; Magnol, J.P.; Bricaire, T. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, v.117, p.35-59, 1997.
- Garrett, L.D.; Thamm, D.H.; Chun, R. et al. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p.704-709, 2002.
- Gavazza, A.; Lubas, G.; Valori, E.; Gugliucci, B. Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. **Veterinary Research Communications**, v.32, p.291-293, 2008 (suppl.1).
- Greenlee, P.G.; Filippa, D.A.; Quimby, F.W. et al. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, v.66, p.480-490, 1990.
- Hosoya, K.; Kisseberth, W.C.; Lord, L.K. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.1355-1363, 2007.
- Jacobs, R.M.; Messick, J.B.; Valli, V.E. **Tumors of the hemolymphatic system, Tumors of domestic animals**. 4.ed., Iowa, USA: State Press, 2002. 138p.
- Jamadar-Shroff, V.; Papich, M.G.; Suter, S.E. Soy-derived isoflavones inhibit the growth of canine lymphoid cell lines. **Clinical Cancer Research**, v.15, p.1269-1276, 2009.
- Kaiser, H.E.; editor. Animal neoplasms: a systemic review. Neoplasms. **Comparative Pathology in Animals, Plants and Man**. Baltimore, USA: Williams and Wilkins, 1981. p.747-812.
- MacEwen, E.G.; Hayes, A.A.; Matus, R.E.; Kurzman, I. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, p.564-568, 1987.
- Miller, A.G.; Morley, P.S.; Rao, S. et al. Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.116-122, 2009.
- Pedraza, F.J.; Schild, A.L.; Alessi, A.C. Immunohistochemical description of encephalitis in Brazilian cattle naturally infected with bovine herpes virus type 5 (BoHV-5). **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.40, p.69-75, 2008.
- Ponce, F.; Marchal, J.P.; Magnol, V. et al. A morphologic study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Veterinary Pathology**, v.47, p.414-433, 2010.
- Sapierzyński, R. Practical aspects of immunocytochemistry in canine lymphomas. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.13, n.4, p.661-668, 2010.
- Thomas, R.; Smith, K.C.; Gould, R. et al. Molecular Cytogenetic Analysis of a novel High-grade Canine T-Lymphoblastic Lymphoma Demonstrating Co-expression of CD3 and CD79a Cell Markers. **Chromosome Res**, v.9, n.8, p.649-657, 2001.
- Tranah, G.J.; Bracci, P.M.; Holly, E.A. Domestic and Farm-Animal exposures and risk of Non-Hodgkin's lymphoma in a population based study in the San Francisco Bay Area. **Cancer epidemiology biomarkers prevention**, v.17 n.9, 2008.
- Uppenkamp, M.; Feller, A.C. Classification of malignant lymphoma. **Onkologie**, v.25, p.563-570, 2002.
- Vail, D.M.; Thamm, D.H.; Reiser, H. et al. Assessment of GS-9219 in a pet dog model of non-Hodgkin's lymphoma. **Clinical Cancer Research**, v.15, p.3503-3510, 2009.
- Vernau, W.; Moore, P.F. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment

of clonality by polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.69, p.145-164, 1999.

Vezzali, E.; Parodi, A.L.; Marcato, P.S.; Bettini, G.
Histopathologic classification of 171 cases

of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.8, p.38-49, 2010.