



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

MONOGRAFÍA

**PROPUESTA PARA LA CLASIFICACIÓN DEL LINFOMA FELINO
BASADO EN LAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DISPONIBLES EN
MEDICINA VETERINARIA**

Nicole Natalie McIntosh Pardo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: Dra. Lorena Andrea Aguilar Guzmán
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2022



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

MONOGRAFÍA

**PROPUESTA PARA LA CLASIFICACIÓN DEL LINFOMA FELINO
BASADO EN LAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DISPONIBLES EN
MEDICINA VETERINARIA**

Nicole Natalie McIntosh Pardo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

FIRMA

PROFESOR GUÍA: Dra. Lorena Aguilar Guzmán

PROFESOR CORRECTOR: Dr. Federico Cifuentes Ramos

PROFESOR CORRECTOR: Dr. Gustavo Farías Roldan

SANTIAGO, CHILE
2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi profesora guía, Lorena Aguilar, por su apoyo incondicional y paciencia eterna, por cada reunión para resolver dudas, por cada conversación que no necesariamente tenía que ver con la monografía, por siempre estar presente, gracias por hacer este trabajo un poquito más ligero.

A mi padre y hermano por su paciencia, apoyo y cariño cada vez que venía de visita los fines de semana.

A mi madre que ya no está acá, sin su apoyo para lograr entrar a estudiar medicina veterinaria nada de esto hubiera sido posible.

A mis tías Mercedes, Angelica, Nancy y Rosario, por recibirme en su casa durante estos largos años de estudios, por sus cariños y compañía. Y a mi tía Mónica, por su constante preocupación durante estos años de estudio.

A Claudia, a pesar de la distancia siempre había una palabra de ánimo en el momento preciso y a Hilda por su amistad sin condiciones y compañía siempre que lo necesitara.

ÍNDICE DE CAPITULOS

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Introducción.....	1
Revisión Bibliográfica.....	2
Generalidades Del Linfoma Felino.....	2
Etiología y Fisiopatología.....	2
Epidemiología	4
Diagnóstico.....	5
Presentación clínica y Clasificación	6
Tratamiento.....	8
Pronóstico	9
Objetivo general y objetivos específicos.....	10
Materiales y métodos.....	11
Resultados.....	13
Objetivo 1.....	13
Objetivo 2.....	28
Discusión.....	34
Conclusión.....	41
Bibliografía.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación del grado de diseño experimental de los artículos incluidos en la revisión sistemática para el diagnóstico del linfoma felino	12
Tabla 2: Valoración de los artículos científicos según el Grado de diseño experimental	15
Tabla 3: Valoración de los artículos científicos según el FI de la revista en que fueron publicados, comparado con el GDE	16
Tabla 4: Descripción, ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas para el diagnóstico del linfoma felino	20
Tabla 5: Subtipos de linfoma encontrados en la literatura seleccionada, divididos según fenotipo	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de flujo con las etapas de selección de los artículos científicos incluidos en esta monografía, de acuerdo con la metodología de revisión bibliográfica sistemática PRISMA.....	14
Figura 2: Número de artículos científicos sobre diagnóstico o clasificación del fL, según su año de publicación	15
Figura 3: Número de publicaciones según la ubicación anatómica del linfoma que estudiaban	20
Figura 4: Técnicas utilizadas en los artículos seleccionados	23
Figura 5: Registro de los inmunofenotipos encontrados en los artículos seleccionados	24
Figura 6: Número de publicaciones comparando el inmunofenotipo y la ubicación anatómica de los linfomas encontrados en los artículos seleccionados	25
Figura 7: Número de pacientes estudiados considerando la ubicación anatómica y el inmunofenotipo de los linfomas encontrados en los artículos seleccionados.....	25
Figura 8: Esquemas de clasificación de fL más utilizados por las distintas publicaciones seleccionadas	26
figura: Diagrama para el abordaje de sospecha de linfoma felino	29
Figura 10: Secuencias para el diagnóstico y clasificación de linfoma felino hasta el nivel de subtipo	30
Figura 11: Propuesta de Algoritmo para la clasificación del fL	32
Figura 12: Algoritmo de clasificación para el linfoma alimentario en felinos	33

RESUMEN

El linfoma es la neoplasia hemopoyética más frecuente en felinos. Su incidencia ha ido en aumento, así como ha ido variando el tipo de linfoma más prevalente. Se ha asociado a distintas etiologías como la infección con el virus de la leucemia felina o el de la inmunodeficiencia felina, a cuadros inflamatorios y exposición a contaminantes ambientales como el humo del tabaco. El tratamiento más frecuentemente utilizado es la quimioterapia, junto con la cirugía o radioterapia, dependiendo de la ubicación, características del tumor y la disponibilidad de estos tratamientos, ya que, por ejemplo, la radioterapia es una técnica muy útil que aún no está disponible en Chile. Para poder realizar un correcto tratamiento es fundamental que exista una clasificación clara de los distintos tipos de linfoma felino, para lo que se requiere un buen proceso diagnóstico, sin embargo, aún no existe un sistema de clasificación que sea de consenso. Es por lo anterior que el objetivo de esta monografía fue proponer un sistema de clasificación basado en las técnicas diagnósticas disponibles en medicina veterinaria y la información que estas entregan.

Dentro de la búsqueda realizada, se seleccionaron finalmente 28 estudios entre los años 2002 y 2021, de los cuales se utilizaron los 23 que fueron categorizados con Grado de Diseño Experimental I – III. En base a ellos se identificaron las técnicas diagnósticas más utilizadas y que proporcionaran la mayor cantidad de información para caracterizar los linfomas según su ubicación, fenotipo, tamaño y morfología celular, patrón de crecimiento y conteo mitótico. De esta manera, concluimos que, después de determinar la ubicación anatómica de el o los tumores mediante técnicas imagenológicas (radiografía, ecografía, resonancia magnética, entre otras), las técnicas diagnósticas fundamentales para realizar una buena clasificación se basan en la histopatología y la inmunohistoquímica, que pese a ser técnicas clásicas, entregan una caracterización completa y confiable del linfoma. Solo en casos excepcionales, en los cuales exista duda de la identificación de los tipos celulares, se recomienda el uso de la técnica de PCR para el Reordenamiento del Receptor de Antígeno, que distingue entre cuadros de tipo monoclonales de los policlonales (neoplasia de inflamación, respectivamente). Siguiendo la secuencia de caracterización tumoral antes mencionada, propusimos un esquema de clasificación, el cual puede ser aplicado a los distintos tipos de linfoma comenzando desde su ubicación anatómica.

Palabras claves: Linfoma felino; Clasificación del linfoma felino; Diagnóstico del linfoma felino; Histopatología; Inmunohistoquímica; Citometría de flujo; PARR; REAL/WHO.

ABSTRACT

Lymphoma is the most common hemopoietic neoplasm in cats. Its incidence has increased, specially its most prevalent type. It has been associated with different aetiologies such as infection with feline leukemia virus or feline immunodeficiency virus, inflammatory conditions, and exposure to environmental pollutants such as tobacco smoke. The most frequently used treatment is chemotherapy, in combination with surgery or radiotherapy, depending location and characteristics of the tumour and the availability of these treatments, since, for example, radiotherapy is a very useful technique that is not yet available in Chile. To carry out a correct treatment, a clear classification of the different types of feline lymphoma is crucial, for which a good diagnostic process is required, however, there is still no consensus in a universal classification system. For this reason, the objective of this monograph is to propose a classification system based on the diagnostic techniques available in veterinary medicine and the information they provide.

Within the search carried out, 28 studies between the years 2002 and 2021 were finally selected, and 23 of them categorized with Degree of Experimental Design I - III were used. The most widely diagnostic techniques were identified in this sample, obtaining, in this way, solid information to characterize lymphomas according to their location, phenotype, cell size and morphology, growth pattern, and mitotic count. In this way, we conclude that, after determining the anatomical location of the tumour(s) using imaging techniques (radiography, ultrasound, magnetic resonance imaging, among others), the fundamental diagnostic techniques for a good classification are based on histopathology and immunohistochemistry, which despite being classical techniques, provide a complete and reliable characterization of lymphoma. Only in exceptional cases, in which there is doubt about the identification of the cell types, the use of PCR for Antigen Receptor Rearrangement (PARR) is recommended, which distinguishes between monoclonal and polyclonal type pictures (neoplasia inflammation, respectively). Following the tumour characterization sequence, we proposed a classification scheme, which can be applied to the different types of lymphoma starting from its anatomical location.

Keywords: Feline lymphoma; Feline lymphoma classification; Feline lymphoma diagnosis; Histopathology; Immunohistochemistry; Flow cytometry; PARR; REAL/WHO.

INTRODUCCIÓN

El linfoma es un conjunto de tumores sólidos del sistema inmune, que tiene su origen en los linfocitos. El linfoma felino (fL) es uno de los cánceres hematopoyéticos más comunes en gatos, así como en humanos y perros, su incidencia anual ha ido aumentando en los últimos años.

Debido a la amplia variedad de formas de presentación del fL, no se ha encontrado una etiología única, sin embargo, se ha relacionado una mayor predisposición a desarrollar esta neoplasia con infecciones por retrovirus, cuadros de inmunosupresión, inflamación crónica y exposición a contaminantes ambientales. En humanos, se han establecido relaciones etiológicas similares a las antes mencionadas, como, por ejemplo, la infección retroviral por virus de la inmunodeficiencia humana con el desarrollo de linfoma no Hodgkin.

Actualmente, el tratamiento de esta patología se basa en protocolos y medicamentos diseñados para humanos, al igual que en caninos, lo que influye en el pronóstico del paciente, como también lo hacen el tipo de tumor, localización anatómica y estado retroviral.

Aún no existe una clasificación estandarizada para el fL, ya que en cada estudio esta varía según la elección de los autores. Sin embargo, al menos se reconocen 3 presentaciones anatómicas generales: Linfoma alimentario, Linfoma nodal periférico y Linfoma extranodal. Por lo anterior, se hace necesario llegar a un consenso para la clasificación del fL, lo que permitiría una adecuada estadificación del tumor y elegir así un tratamiento adecuado y entregar un pronóstico certero.

En esta monografía, para plantear un esquema de clasificación, nos basamos en las técnicas diagnósticas disponibles en medicina veterinaria y en la información que ellas entregan para lograr una mejor caracterización de las distintas presentaciones de la enfermedad.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

GENERALIDADES DEL LINFOMA FELINO

El linfoma es un conjunto de tumores sólidos del sistema inmune (Shankland *et al.*, 2012), y abarca un grupo diverso de neoplasias que tienen en común su origen en linfocitos. Generalmente se origina en tejido linfoide (linfonodos, bazo, médula ósea), aunque puede surgir en casi cualquier tejido (Vail *et al.*, 2019). Se ha descrito el linfoma en distintas especies, incluyendo humanos, caninos y felinos. El Linfoma felino (fL, sigla en inglés), también denominado linfoma maligno o linfosarcoma, es una de las neoplasias más comunes en el gato, abarcando más de la mitad de todos los tumores hemopoyéticos, presentando manifestaciones clínicas diversas dependiendo de los órganos afectados (Choy y Bryan, 2012; Burgess, 2020).

ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA

Uno de los mecanismos de oncogénesis más estudiados es el inducido por retrovirus, los cuales dentro de su ciclo retroviral poseen características que le dan la capacidad de producir enfermedades oncogénicas. Estas son: i) alta tasa de mutación porque poseen dos copias de la molécula de RNA que permite una recombinación viral frecuente; ii) infección y replicación en células en división, las que probablemente sean más susceptibles a la transformación; iii) capacidad de integración en genoma del huésped, generando oportunidades para alterar la transcripción de genes (Magden *et al.*, 2011).

Por otra parte, se han descrito 4 formas principales para explicar el efecto oncogénico de los retrovirus en la célula huésped: i) *transformación viral aguda*, en la que los virus codifican oncogenes derivados del huésped y transforman directamente las células infectadas mediante la expresión de estas proteínas; ii) *transactivación viral*, ya que codifican proteínas accesorias que interrumpen los reguladores normal del ciclo y las vías de señalización celular que resultan en el desarrollo de células con un fenotipo neoplásico; iii) *transformación por proteínas de la cubierta viral*, en la que pueden activar vías de señalización intracelular y es específico del retrovirus ovino Jaagsiekte, y; iv) *transformación viral no aguda*, en la que activan o interrumpen oncogenes o genes supresores de tumores secundarios a la integración viral, lo que genera la interrupción de los perfiles de transcripción celular, mecanismo utilizado por Virus de la Leucemia Felina (FeLV, sigla en inglés) (Maeda *et al.*, 2008).

El FeLV fue aislado en 1964, desde gatos con linfoma maligno, lo que motivó a asociar el fL con esta infección retroviral (Louwerens *et al.*, 2005). El FeLV es un gammaretrovirus que, al infectar al gato mediante la inserción de su genoma, da lugar a cambios en la expresión de oncogenes o de genes supresores de tumores, conduciendo al desarrollo de neoplasias sin necesidad de replicar el virus (Paulin *et al.*, 2018; Hartmann y Hofmann-Lehmann, 2020).

En el año 1985 se comenzó a utilizar la vacuna contra FeLV, con lo cual disminuyó drásticamente la tasa de infección con el virus, así como la incidencia de linfomas asociados a FeLV (linfoma mediastínico), observándose una modificación en la forma de presentación del linfoma, ya que en la década de los 70's hasta el 70% de los linfomas estaban asociados a FeLV, a diferencia con la década del 90' donde solo el 15% estaba asociado al virus (Louwerens *et al.*, 2005). A pesar de esto, los otros tipos de fL aumentaron su incidencia, especialmente la forma alimentaria (Louwerens *et al.*, 2005; Fabrizio *et al.*, 2013). Así también, al estudiar hogares de gatos con alta tasa de infección con FeLV, se encontró pacientes con linfoma, pero FeLV negativo, lo que podría deberse a un mecanismo indirecto de oncogénesis viral, similar a lo que ocurriría en los trastornos linfoproliferativos en humanos, pero es un mecanismo aún no estudiado (Vail y MacEwen, 2000).

También se ha asociado el fL al virus de la inmunodeficiencia felina (FIV, sigla en inglés) (Kaye *et al.*, 2016; Burgess, 2020), encontrándose evidencia de que su presencia puede aumentar la incidencia de linfoma en gatos (Beatty, 2014). La mayoría de los estudios que relacionan FIV con fL sugieren mecanismos indirectos de oncogénesis, lo que implica la activación crónica de linfocitos y/o desregulación en vigilancia inmunológica antineoplásica normal, lo que podría ayudar en la transformación de células linfoides e interferir en su eliminación, lo que se vería particularmente en infecciones retrovirales que se dirigen a células B o T como el FIV (Magden *et al.*, 2011; Magden *et al.*, 2013; Kaye *et al.*, 2016).

Hasta la fecha no se ha identificado un agente etiológico distinto al viral, pero se cree que la inflamación crónica probablemente tenga un rol en la generación de la enfermedad, ya que los felinos frecuentemente desarrollan linfomas en lugares afectados por este tipo de cuadro, como es el caso del linfoma nasal y el alimentario (Vail *et al.*, 2019; Burgess, 2020). Un ejemplo de lo anterior es la Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica (EIIC), que se ha asociado con la presentación de linfoma alimentario en gatos, y se compara con lo que ocurre

en humanos, en donde la enfermedad celíaca predispondría a trastornos linfoproliferativos y cáncer (Burgess, 2020).

En una inflamación crónica, el microambiente celular es altamente reactivo e inestable, atribuible a los efectos combinados de abundantes especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, etc. Este microambiente podría favorecer el inicio y progresión del cáncer ya que mientras mayor es la duración de la inflamación, aumenta probabilidad de inestabilidad genómica, aparición de mutaciones y que estas se perpetúen. Las células normales poseen mecanismos para prevenir la proliferación no regulada y la acumulación de mutaciones en DNA (genes supresores de tumores como p53), pero la falla de estos mecanismos puede contribuir al desarrollo de cáncer (Morrison, 2012). Asociado a lo anterior, se ha postulado a las alergias alimentarias como posible precursor de la EIIC, así como también la aparición o el uso de dietas de prescripción, específicamente las dirigidas a solucionar problemas del tracto urinario inferior, donde tenemos dietas altas en carbohidratos (Louwerens *et al.*, 2005).

En la búsqueda de otros agentes etiológicos, recientemente se ha demostrado que factores ambientales pueden aumentar la incidencia del fL, como lo es la exposición crónica al humo del tabaco, el cual podría estar asociada a un mayor riesgo de desarrollar específicamente linfoma alimentario en gatos (Bertone *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2020; Burgess, 2020).

EPIDEMIOLOGIA

Los gatos FeLV-positivos tienen 60 veces más probabilidades de desarrollar linfoma y los gatos FIV-positivos 5 veces. Existe una distribución bimodal del fL, donde los gatos positivos a infecciones retrovirales presentan linfoma a una edad más temprana, a diferencia de gatos negativos que presentan linfoma a edad más avanzada (Vail *et al.*, 2019).

Los informes epidemiológicos anteriores a 1990 sugieren que el fL representaba entre el 50% y 90% de todos los tumores hematopoyéticos en el gato, y dado que los tumores hematopoyéticos representan aproximadamente un tercio de todos los tumores felinos, se estimó que 200 de cada 100.000 gatos estaban en riesgo (Vail *et al.*, 2019). En la actualidad la incidencia del fL es muy similar o incluso mayor a lo antes mencionado, sin embargo, la diferencia está en el tipo de linfoma, ya que antes de los años 90s predominaba la forma

mediastínica y posterior a esa fecha prevalece la forma alimentaria (Vail, 2014; Vail *et al.*, 2019; Burgess, 2020).

En un estudio realizado en 2005, en el Hospital Docente de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de California en Davis, evaluaron la incidencia de linfoma felino no asociado a virus entre 1983 y 2003. De un total de 546 pacientes con linfoma (79 casos positivos a retrovirus y 477 no asociados a retrovirus), se observó un aumento anual de 18 casos entre 1984 y 1994, en cambio este llegó a 32 nuevos casos por año en la década siguiente, lo que corresponde a un aumento de casi un 50% (Louwerens *et al.*, 2005).

DIAGNÓSTICO

Al igual que en otras especies, la citología por aspirado con aguja fina (PAAF, sigla en inglés), permite determinar si se está frente a un linfoma o no, en base al tamaño y morfología celular, y mediante histopatología por biopsia incisional o excisional del tejido afectado, se realiza la evaluación histológica que proporciona una evaluación más precisa de la morfología y grado de invasión del tumor (Burgess, 2020). Además, dependiendo de la ubicación del tumor, también serán útiles las técnicas de diagnóstico imagenológico como ecografía, radiografía, resonancia magnética, tomografía computarizada y endoscopia (Vail *et al.*, 2019; Burgess, 2020).

Existen otras técnicas que complementan el estudio de los linfomas, como la inmunofenotipificación celular (detección de antígenos de membrana) mediante la inmunohistoquímica (IHQ) y citometría de flujo (CF). Por otro lado, en los últimos años se han incorporado los ensayos de clonalidad basados en PCR (PCR for Antigen Receptor Rearrangements = PARR) para identificar linfomas que por los otros métodos no sean fáciles de diagnosticar. Sin embargo, estas técnicas son menos aplicadas en el diagnóstico y clasificación del fL, principalmente por la gran prevalencia de las formas anatómicas intraabdominales, lo que dificulta el muestreo, así como también la baja disponibilidad y variabilidad de anticuerpos específicos para felinos, o la baja sensibilidad de los partidores hasta ahora diseñados para la técnica PARR (Vail *et al.*, 2019; Burgess, 2020).

Finalmente, siempre es de gran utilidad en el proceso diagnóstico la utilización de exámenes complementarios como pruebas de detección para retrovirus, hemograma, perfil bioquímico,

urianálisis, entre otros, para saber el estado general del paciente, así como posibles afecciones en otros órganos, que puedan complicar el cuadro oncológico (Vail *et al.*, 2019).

Cada una de estas técnicas diagnósticas será abordada en detalle en la sección resultados de esta monografía, tras el análisis de la bibliografía seleccionada en una búsqueda sistemática para esta memoria de título.

PRESENTACIÓN CLÍNICA Y CLASIFICACIÓN

Históricamente la clasificación del fL, a diferencia del linfoma canino, se ha basado principalmente en la ubicación anatómica, sin profundizar en la caracterización celular, categorizándolo en: Linfoma Alimentario (LA) o Gastrointestinal, Linfoma Nodal Periférico (Mediastinal, Multicéntrico) y Linfoma Extranodal (Nasal, Renal, del SNC, Cutáneo, Laríngeo/Faríngeo/Traqueal, Ocular) (Vail *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha visto la necesidad de realizar una clasificación más específica, que permita obtener mayor cantidad de información, por lo que diversos autores han utilizado los 3 esquemas de clasificación diseñados para el linfoma humano, encontrando cierto grado de concordancia. Estos 3 esquemas de clasificación son: Kiel actualizado, *National Cancer Institute Working Formulation* (NCI-WF) y *Revised European–American Lymphoma/WHO* (REAL/WHO) (Barrs y Beatty, 2012a, Vail *et al.*, 2019).

Aunque no tan frecuente, distintos autores han utilizado la clasificación de Kiel actualizada. Entre ellos está Chino *et al.* (2013), el cual se centró en las características citológicas, como el tamaño del núcleo y densidad de la cromatina, y el inmunofenotipo, resultando en dos subtipos, sin embargo, esta forma de clasificación no se relaciona necesariamente con el curso clínico de la enfermedad, lo que es una desventaja para establecer un pronóstico y la elección del tratamiento (Chino *et al.*, 2013; Isaacson, 2000). También se ha utilizado el esquema de clasificación creado por la REAL/WHO, el cual nace de la necesidad de unificar criterios a nivel mundial. Este divide las neoplasias linfoides por etapa de diferenciación (precursoras y maduras) y subdivide por inmunofenotipo (B o T) (Uppenkamp y Feller, 2002).

La tercera forma de clasificación para el fL es el esquema de la NCI-WF, utilizado por ejemplo en el linfoma nasal (Little *et al.*, 2007) y el alimentario (Pohlman *et al.*, 2009; Briscoe *et al.*, 2011). Esta clasificación divide el linfoma en 3 grados de malignidad (alto,

medio y bajo), según la progresión clínica de cada linfoma, sin darle importancia al inmunofenotipo. Además, el NCI-WF distingue entre patrón de crecimiento (difuso y nodal), tamaño celular (pequeño y grande), si son bien o pobremente diferenciados, y la forma del núcleo (hendido y no hendido). En el caso del fL, el grado de malignidad se divide en dos tipos histológicos, alto grado (células grandes, conteo mitótico alto, progresión clínica rápida) y bajo grado o indolente (células pequeñas, conteo mitótico bajo, progresión clínica lenta) (Isaacson, 2000; Uppenkamp y Feller, 2002; Burgess, 2020).

La clasificación adaptada desde la NCI-WF y REAL/WHO han sido los esquemas más utilizados en fL, pese a que no existe una clasificación oficialmente establecida (Barrs y Beatty, 2012a; Vail *et al.*, 2019; Burgess, 2020;).

Según la clasificación anatómica, la forma clínica más frecuente en gatos es el LA, siendo además el tumor más prevalente del sistema gastrointestinal. Este linfoma se divide en 3 subtipos según sus características histológicas: LA de bajo grado (LGAL por su sigla en inglés) (células pequeñas), LA de grado intermedio o alto (I/HGAL) (células grandes o intermedias) y LA linfocítico granular grande (LGL) (Vail *et al.*, 2019). Estos subtipos de linfoma no se asocian a la infección con FeLV y se presentan preferentemente en gatos geriátricos (10-13 años). En general el LGAL es de inmunofenotipo T y el I/HGAL corresponde a fenotipo B (Beaty y Barrs, 2012a; Vail *et al.*, 2019; Burgess, 2019; Mason y Pittaway, 2022). Esta clasificación puede variar según el autor del estudio, como ocurre, por ejemplo, con Krick y Sorenmo (2016) quienes dividen el LA según el tamaño celular y el inmunofenotipo, es decir, en pequeñas o grandes y fenotipo T o B.

Así como se mencionó antes, la inmunotipificación no se utiliza regularmente para clasificar y diagnosticar a un paciente. Con esta técnica se ha observado que los linfomas de células T son menos agresivos, más asociados a LGAL que los de células B, los que además son más comúnmente encontrados en I/HGAL y LGL (Burgess, 2020).

Todo lo anterior, deja de manifiesto la necesidad de utilizar los distintos métodos diagnósticos de forma conjunta, permitiendo el análisis y descripción en mayor detalle de los tipos celulares que conforman las diferentes presentaciones del linfoma, lo que permitiría una adecuada clasificación y, por consiguiente, un abordaje terapéutico más específico, logrando pronósticos más certeros para los pacientes.

TRATAMIENTO

En general, el tipo de tratamiento para fL se define principalmente según la ubicación topográfica del tumor, y si afecta uno o múltiples nódulos linfáticos. Al ser una enfermedad sistémica el principal tratamiento es la quimioterapia, cuyos protocolos más utilizados son los que combinan la Ciclofosfamida (C), Vincristina (O), Prednisolona (P), y Doxorubicina (H) (protocolos COP o CHOP) (Mason y Pittaway, 2022).

En el caso de tumores de bajo grado, como el LGAL, suele ser suficiente los protocolos conservadores de quimioterapia, los que incluye clorambucilo y prednisolona oral, lográndose largos periodos de ausencia de neoplasia (remisión) (Krick y Sorenmo, 2016; Vail *et al.*, 2019; Burgess, 2020). Por el contrario, en el caso I/HGAL es necesaria una quimioterapia más agresiva (multifarmacológica), que incluyen las de tipo COP o CHOP (Burgess, 2020). Sin embargo, al existir pocos datos que comparen estos protocolos adaptados a la oncología veterinaria, el tratamiento se basa finalmente en la preferencia del médico veterinario y del tutor del gato (Burgess, 2020). En el caso del LGL, también es necesaria una quimioterapia agresiva, pero la respuesta es menos eficiente que en el I/HGAL (Krick y Sorenmo, 2016; Vail *et al.*, 2019).

La radioterapia y la cirugía son utilizadas como terapia primaria en casos donde el tumor es localizado (nasal, ocular, algunas presentaciones intestinales) (Vail *et al.*, 2019; Burgess, 2020; Mason y Pittaway, 2022). La radioterapia en particular es el tratamiento de elección en el caso del linfoma nasal sin metástasis (Vail, 2014).

En ciertos casos puede estar comprometido el estado nutricional del paciente, como en el LA, por lo que se debe instaurar un apoyo temprano, realizándose además evaluaciones periódicas que consideren la ingesta calórica y el peso corporal. La suplementación con cobalamina debe realizarse en gatos con hipocobalaminemia, ya que esta descrito como un factor que empeora el pronóstico. Todo lo anterior, podría ayudar a mantener una mejor calidad de vida, estado inmunológico y mejorar la tolerancia a la quimioterapia (Barrs y Beatty, 2012b; Vail *et al.*, 2019).

Una respuesta positiva al tratamiento implica una remisión completa o parcial del linfoma, lo que le permitiría al paciente alcanzar una supervivencia significativamente mayor a 2 años (Vail, 2014; Burgess, 2020).

PRONÓSTICO

El tiempo de supervivencia de gatos con fL tiende a ser menor que en perros, dependiendo de las características citológicas e histológicas el tumor, su ubicación anatómica, así como de la presencia de FeLV o FIV (Vail, 2014; Paulin *et al.*, 2018). Es así como, por ejemplo, los tumores de alto grado progresan rápidamente y responden a la quimioterapia durante periodos limitados, a diferencia de los tumores de bajo grado, que pueden ser fácilmente tratados como una enfermedad crónica (Burgess, 2020).

El linfoma mediastínico es de mal pronóstico ya que solo presenta una buena respuesta a la quimioterapia durante los primeros meses del tratamiento. Por el contrario, el linfoma nasal localizado tiene un pronóstico más favorable dado que el paciente puede sobrevivir entre 1 a 3 años con radioterapia. Finalmente, en el caso del LA, dependiendo del grado histológico, tendrá un mejor o peor pronóstico, siendo el de alto grado peor que el de bajo grado (Vail, 2014; Burgess, 2020).

Por todo lo anterior, el objetivo de nuestro trabajo fue realizar una revisión actualizada de la literatura, poniendo énfasis en el proceso de diagnóstico del fL, para proponer una forma de clasificación en base a la información disponible hasta la fecha.

OBJETIVO GENERAL

Actualizar los métodos diagnósticos del linfoma felino para proponer una clasificación de esta enfermedad en base a la información de la literatura disponible hasta la fecha, para determinar un tratamiento y pronóstico adecuado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las formas de diagnóstico para linfoma felino, realizando una revisión sistemática de la información disponible.
2. Proponer una clasificación para linfoma felino, considerando las técnicas diagnósticas disponibles, para determinar un tratamiento y pronóstico adecuado.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó una recopilación de la información publicada sobre las distintas formas de diagnóstico disponibles para fL, permitiendo unificar criterios y proponer una forma de clasificación que involucre aspectos morfocelulares, moleculares u otras características entregadas por los métodos diagnósticos.

Para la realización de esta monografía nos basamos en el método PRISMA, el cual es un sistema que busca identificar, seleccionar y evaluar de manera crítica estudios e investigaciones científicas relevantes, logrando de esta forma recopilar y analizar datos de los estudios que se incluyen en este trabajo (Urrútia y Bonfill, 2010).

Criterios de inclusión para la búsqueda de la información

La búsqueda de los artículos científicos se realizó en revistas especializadas y en inglés, para lo cual se utilizaron bases de datos como *ScienceDirect* y *PubMed*, empleando las siguientes palabras o frases claves:

- Linfoma felino; *Feline lymphoma*
- Clasificación del linfoma felino; *Feline lymphoma classification*
- Diagnóstico del linfoma felino; *Feline lymphoma diagnosis*
- Linfosarcoma felino; *Feline lymphosarcoma*
- Clasificación del linfosarcoma felino; *Feline lymphosarcoma classification*
- Diagnóstico del linfosarcoma felino; *Feline lymphosarcoma diagnosis*
- Clasificación de neoplasias felinas; *Feline neoplasia classification*

Para ser incluido en esta revisión sistemática, todo el material bibliográfico debía tener una antigüedad máxima de 20 años (2002 - 2021).

En resumen, los criterios de inclusión para los estudios considerados en nuestra monografía fueron los siguientes:

- Estudio original.
- Publicación en revista con comité editorial.

- Publicación en los últimos 20 años.
- Publicación en inglés.
- Estudios en felinos domésticos (*Felis silvestris catus*).
- Estudios en diagnóstico y clasificación de linfoma felino.

Criterios de exclusión

Una vez realizada la búsqueda, las publicaciones fueron revisadas y se descartaron todas aquellas que estaban duplicadas. Luego se filtró según su título y resumen, dejando solo aquellas que tuvieran relación directa con los intereses de este trabajo,

Las publicaciones seleccionadas fueron organizadas de acuerdo con su calificación según el grado de diseño experimental (GDE) (Tabla 1), para graduar la calidad de los manuscritos y posterior utilización para el diseño del algoritmo propuesto.

Tabla 1. Clasificación del grado de diseño experimental de los artículos incluidos en la revisión sistemática para el diagnóstico del linfoma felino.	
GDE	Categorías de estudios de linfoma felino
I	Estudios prospectivos, n >100
II	Estudios retrospectivos, n>100
III	Estudios prospectivos o retrospectivos, n>20 y <100
IV	Estudios prospectivos o retrospectivos, n>5 y <20
Modificado del sistema de calificación publicado por el Centro de Medicina basada en evidencia de la Universidad de Oxford (2011)	

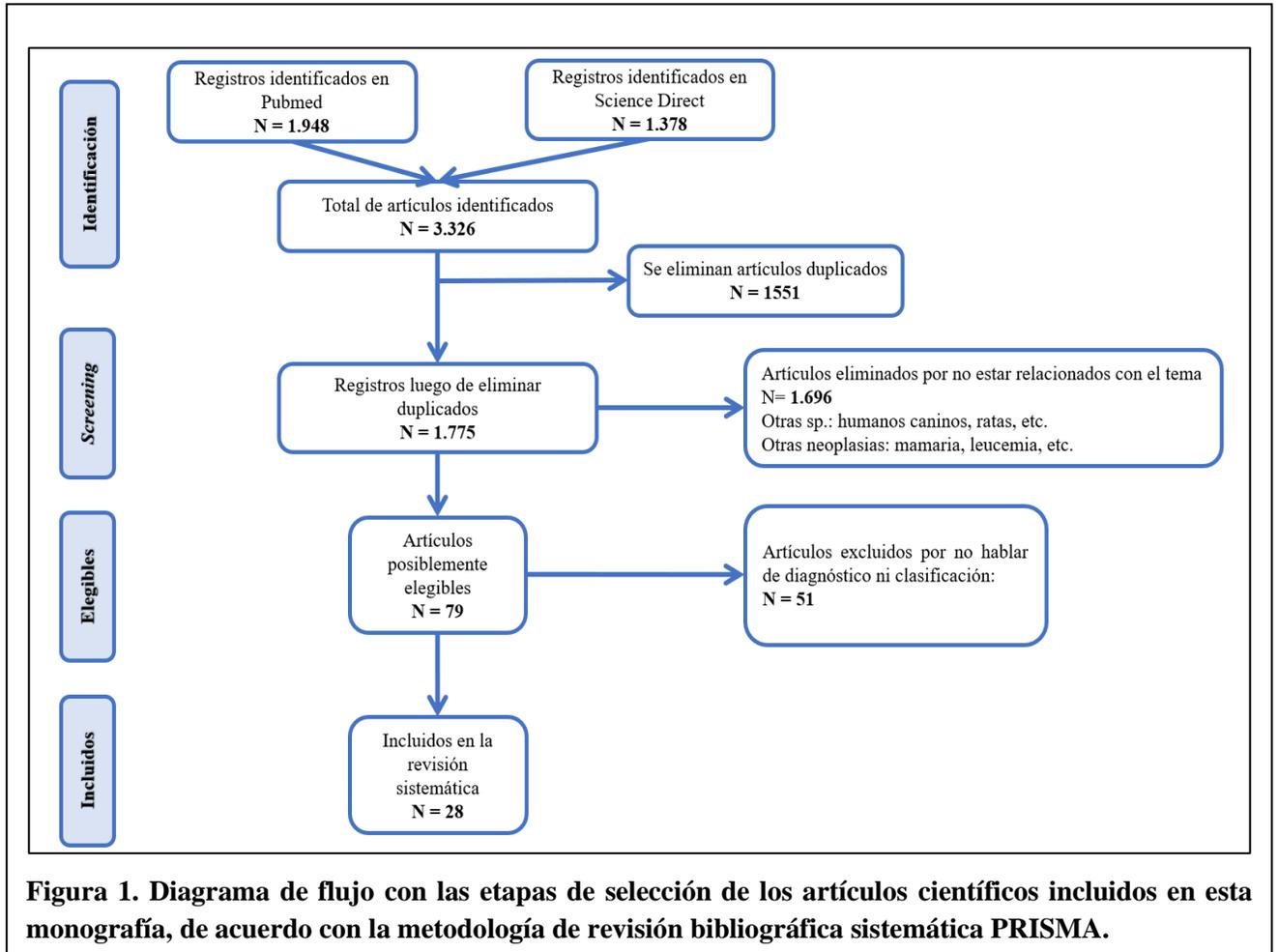
Cada uno de los artículos seleccionados fue leído en forma íntegra, registrándose la información relevante para la propuesta del algoritmo de clasificación. Posteriormente se procedió a la redacción de la monografía.

RESULTADOS

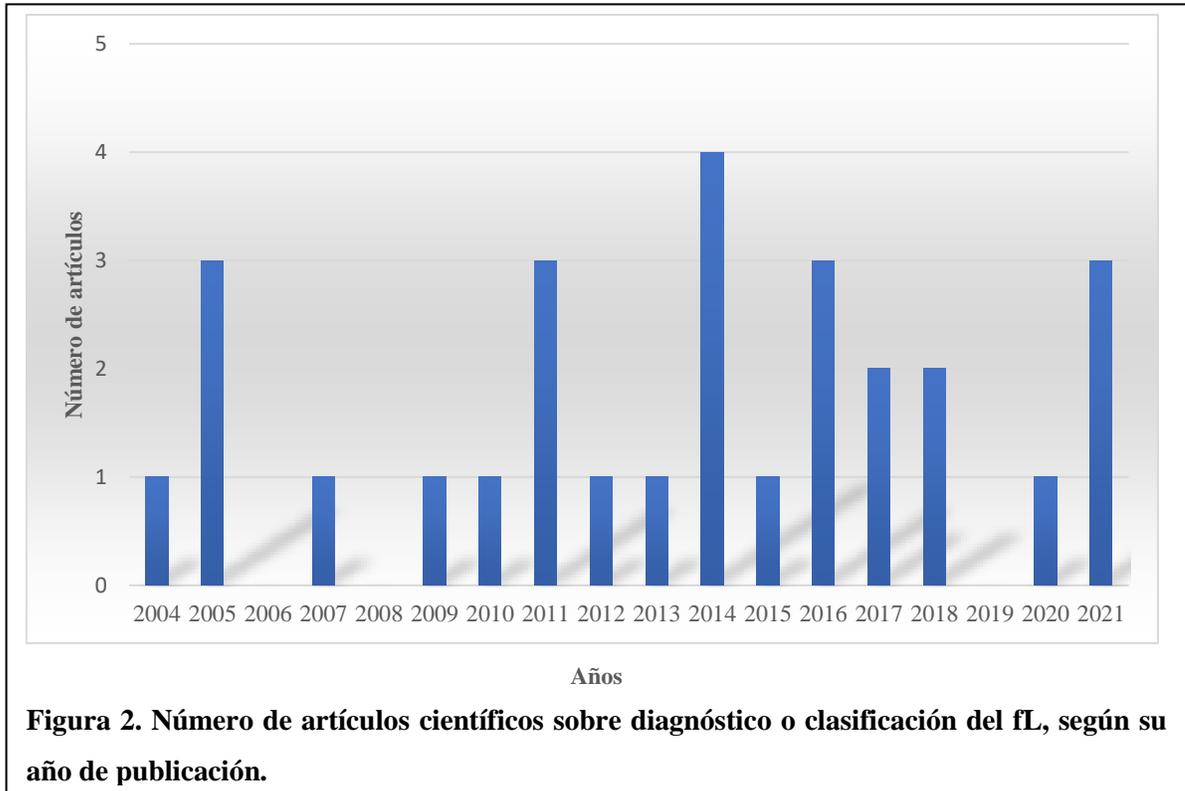
Objetivo 1: *Describir las formas de diagnóstico para linfoma felino, realizando una revisión sistemática de la información disponible.*

La búsqueda de documentos se realizó en las bases de datos *ScienceDirect* y *Pubmed*, lo cual arrojó un total de 3.326 artículos. Se aplicó un tamizaje o *screening* para eliminar aquellos títulos duplicados quedando 1.775 documentos. Posteriormente se revisaron los títulos y sus resúmenes, eliminándose 1.696 documentos por ser estudios realizados en otras especies (humanos, perros, ratas, hurones) o en otras neoplasias (tumores mamarios, pulmón, hígado u otras), quedando 79 artículos para seguir en el proceso de selección. Finalmente, tras revisar los documentos completos se eliminaron 51 estudios porque, pese a tratar de diagnóstico o clasificación, su enfoque estaba en otra temática (pronóstico, tratamiento u otro), quedándonos con 28 artículos para su revisión detallada.

Todo el proceso de selección de las publicaciones se encuentra resumido en el diagrama de flujo que se presenta a continuación (Figura 1).



Se organizaron los artículos según el año de publicación en el siguiente gráfico (Figura 2), observándose que el estudio del fL abarca estos últimos 20 años de manera relativamente homogénea y constante, con una pequeña mayor concentración de artículos en el año 2014, seguido por 2005, 2011, 2016 y 2021.



A continuación, los 28 artículos se categorizaron según el GDE, para graduar su calidad, principalmente según el tipo de estudio (prospectivo o retrospectivo) y el tamaño muestral. De los 28 artículos ninguno cumplió las características del grado I, encontrándose 4 estudios que calificaron con grado II, 19 calificados como grado III y 5 como grado IV (Tabla 2). Esta categorización permitió concentrar la revisión en los trabajos mejor graduados, que corresponden a aquellos entre grado I y III, siendo un total de 23 artículos.

GDE	Categorías de estudios de linfoma felino	N° de artículos científicos
I	Estudios prospectivos, n >100	0
II	Estudios retrospectivos, n>100	4
III	Estudios prospectivos o retrospectivos, n>20 y <100	19
IV	Estudios prospectivos o retrospectivos, n >5 y <20	5

Luego, las publicaciones se ordenaron según el GDE comparándolo con el factor de impacto (FI) de las revistas a las que pertenecen los estudios (Tabla 3), con la intención de obtener más información sobre la calidad de los artículos. Sin embargo, para los estudios seleccionados, el FI de las revistas es más o menos homogéneo, no encontrándose una correlación con el GDE.

Tabla 3. Categorización de los artículos científicos según su GDE, comparado con el FI de la revista en que fueron publicados.			
Título del Artículo Científico	Revista Científica	FI de la Revista Científica	GDE
Feline gastrointestinal lymphoma: Mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality	Veterinary Pathology	3,157	II
The usefulness of immunohistochemistry to differentiate between nasal carcinoma and lymphoma in cats: 140 cases (1986–2000)	Veterinary and comparative oncology	2,613	II
Clinical and histopathological classification of feline intraocular lymphoma	Veterinary Ophthalmology	1,644	II
Novel clonality assays for T cell lymphoma in cats targeting the T cell receptor beta, T cell receptor delta, and T cell receptor gamma loci	Journal of Veterinary Internal Medicine	3,333	II
Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma	Veterinary Immunology and Immunopathology	2,046	III
Immunohistochemical Diagnosis of Alimentary Lymphomas and Severe Intestinal Inflammation in Cats	Journal of Comparative Pathology	1,311	III

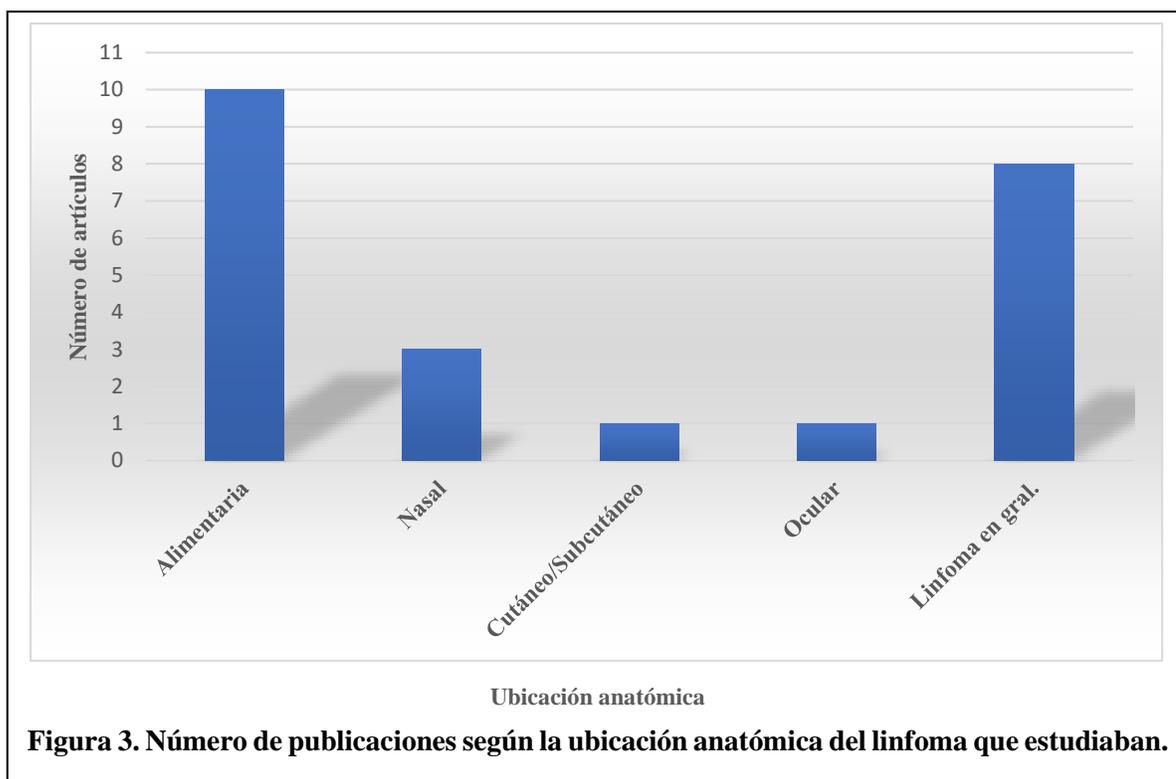
Multiplex PCR and Genescan analysis to detect immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in feline B-cell neoplasms	Veterinary Immunology and Immunopathology	1,943	III
Characterization of Feline Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes for the Molecular Diagnosis of B-cell Neoplasia	Veterinary Pathology	3,157	III
Nasal and Nasopharyngeal Lymphoma in Cats: 50 Cases (1989–2005)	Veterinary Pathology	3,157	III
Immunophenotypic and Histologic Classification of 50 Cases of Feline Gastrointestinal Lymphoma (2009)	Veterinary Pathology	3,157	III
Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO	Veterinary and Comparative Oncology	2,613	III
Characterization of a PCR-based lymphocyte clonality assay as a complementary tool for the diagnosis of feline lymphoma	Veterinary and Comparative Oncology	2,613	III
Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from Inflammation in feline small intestinal biopsy samples	Veterinary Pathology	3,157	III
Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma	Journal of Comparative Pathology	1,311	III
Cytomorphological and immunological classification of feline lymphomas: clinicopathological features of 76 cases	The Journal of Veterinary Medical Science	1,267	III

Patient characteristics, histopathological findings and outcome in 97 cats with extranodal subcutaneous lymphoma (2007–2011)	Veterinary and Comparative Oncology	2,613	III
Feline Upper Respiratory Tract Lymphoma: Site, Cyto-histology, Phenotype, FeLV Expression, and Prognosis	Veterinary Pathology	3,157	III
Characterization of the T-cell receptor gamma chain gene rearrangements as an adjunct tool in the diagnosis of T-cell lymphomas in the gastrointestinal tract of cats	Research in Veterinary Science	2,534	III
Differentiating feline inflammatory bowel disease from alimentary lymphoma in duodenal endoscopic biopsies	Journal of small animal practice	1,522	III
Does categorisation of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats?	Journal of Feline Medicine and Surgery	2,015	III
World Health Organisation classification of lymphoid tumours in veterinary and human medicine: a comparative evaluation of gastrointestinal lymphomas in 61 cats	Journal of Comparative Pathology	1,311	III
Histopathologic, phenotypic, and molecular criteria to discriminate low-grade intestinal T-cell lymphoma in cats from lymphoplasmacytic enteritis	Journal of Veterinary Internal Medicine	3,333	III

Flow cytometry for feline lymphoma: a retrospective study regarding pre-analytical factors possibly affecting the quality of samples	Journal of Feline Medicine and Surgery	2,015	III
An immunohistochemical investigation of 18 cases of feline nasal lymphoma	Journal of Comparative Pathology	1,311	IV
Intraocular and periocular lymphoma in dogs and cats: a retrospective review of 21 cases (2001–2012)	Veterinary Ophthalmology	1,644	IV
The use of flow cytometry for immunophenotyping lymphoproliferative disorders in cats: a retrospective study of 19 cases	Veterinary and comparative oncology	2,613	IV
Cutaneous Lymphoma at Injection Sites: Pathological, Immunophenotypical, and Molecular Characterization in 17 Cats	Veterinary Pathology	3,157	IV
Revisiting lymphocyte clonality testing in feline B-cell lymphoma	Veterinary Immunology and Immunopathology	2,046	IV

Cada uno de los 28 artículos seleccionados fue leído en forma íntegra, registrándose la información relevante, asociada principalmente a las técnicas diagnósticas y sistemas de clasificación del fL.

Lo primero que llama la atención es que, para realizar un estudio, en la mayoría de los casos se establece como requisito la incorporación de pacientes según la ubicación anatómica del linfoma, destacándose la forma alimentaria, seguida de la nasal, cutánea y ocular. Así también, dentro de los artículos que estudiaron el linfoma independiente de la ubicación, también predominó la forma alimentaria, seguida de las formas multicéntrica, mediastínica, cutánea, entre otras (Figura 3).



A continuación, se resumió la información respecto a las distintas técnicas diagnósticas utilizadas en la bibliografía seleccionada (Tabla 4), recalcando las ventajas y desventajas de cada una de ellas.

Tabla 4. Descripción, ventajas y desventajas de las técnicas utilizadas para el diagnóstico del linfoma felino.		
Técnica diagnóstica	Descripción	Ventajas y desventajas
Citología (Irving <i>et al.</i> , 2019; Meinkoth <i>et al.</i> , 2020)	Permite observar características morfológicas celulares de una muestra obtenida por punción con aguja final (PAF) o punción y aspiración con aguja fina (PAAF). Las tinciones más frecuentemente utilizadas son las Romanowsky:	V→ Técnica económica y de mayor facilidad de aplicación. Muchas veces no requiere sedar al paciente (gran ventaja en pacientes graves). D→ Pierde información relevante de la arquitectura de

	Wright's-Giemsa y May-Grünwald Giemsa.	la neoplasia. No permite identificar el linaje de las células que conforman el linfoma.
Histopatología (Briscoe <i>et al.</i> , 2011; Irving <i>et al.</i> , 2019)	Mediante cortes histológicos permite observar el/los tipos de células que se encuentra en un tejido, y la arquitectura, grado de invasión de tejidos, etc. La tinción más frecuentemente utilizada: Hematoxilina-Eosina	V→ Permite obtener información de la arquitectura del tejido, conteo mitótico, grado de invasión del tejido, etc., lo que aporta al diagnóstico final y posterior pronóstico. D→ La toma de muestra puede interferir en el diagnóstico, ya que, por ejemplo, una muestra obtenida por endoscopia puede no ser lo suficientemente representativa, y una muestra obtenida por laparoscopia, puede ser muy riesgosa en pacientes que estén graves.
Inmunohistoquímica (IHQ) (Briscoe <i>et al.</i> , 2011; Mason y Pittaway, 2022).	Técnica que marca con anticuerpos distintos antígenos celulares (intracelulares o de transmembrana) en un tejido previamente fijado, para identificar el tipo específico celular, que se visualiza por la reacción catalizada por la enzima presente en el anticuerpo tornando visibles sustratos invisibles.	V→ Presenta una alta sensibilidad al momento de determinar el inmunofenotipo de las células que componen el tumor. D→ Requiere anestesiarse al paciente para obtener la muestra (biopsia), lo que

	<p>Anticuerpos más utilizados:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Células T → anti CD3 - Células B → anti CD79a, CD20, BLA.36, PAX-5 - Leucocitos → anti CD18 	<p>puede ser contraproducente en casos de pacientes en estado crítico.</p>
<p>PCR para el Reordenamiento del Receptor de Antígeno (PARR) (Irving, 2020; Moore <i>et al.</i>, 2020)</p>	<p>Prueba que evalúa la clonalidad celular mediante PCR para reordenamientos de receptores de antígenos (PARR) en linfocitos B y T, es decir, analiza secciones específicas de genes que codifican para los receptores de células B y T.</p>	<p>V → Necesita poca cantidad de muestra, pudiendo utilizarse muestras frescas o muestras citológicas o histopatología ya fijados.</p> <p>D → No es una técnica de elección al comenzar con el diagnóstico, ya que solamente sirve para diferenciar entre una población reactiva de una neoplásica, por lo que se utiliza al final del estudio del tumor.</p>
<p>Citometría de flujo (Guzera <i>et al.</i>, 2014; Schaefer y Corn, 2020)</p>	<p>Identifica las células mediante el uso de anticuerpos (principalmente monoclonales) marcados con una molécula fluorescente.</p> <p>Anticuerpos utilizados:</p> <ul style="list-style-type: none"> - anti CD4 - anti CD5 - anti CD8 alfa/beta - anti CD21 RPE 	<p>V → Alta sensibilidad para detectar la expresión de antígenos (inmunofenotipo). Permite una evaluación cuantitativa de células y de la expresión de antígenos de superficie. Tiempo de procesamiento de muestra corto.</p> <p>Se puede utilizar para una variedad de tipos de muestras,</p>

		<p>como PAAF, sangre periférica y efusiones.</p> <p>D→ poca disponibilidad de anticuerpos específicos para felinos, teniendo que validar los ya existentes en humanos u otras especies, disminuyendo la especificidad y sensibilidad a la técnica.</p>
--	--	--

Del total de artículos seleccionados (23), 12 utilizaban como parte del proceso diagnóstico la combinación de histopatología e IHQ, siendo consideradas como *gold standard* para confirmar el fL. En 10 publicaciones se realizó la técnica de PARR, junto o por separado de los métodos antes mencionados. Finalmente, solo 4 estudios utilizaron citología y 3 citometría de flujo (Figura 4).

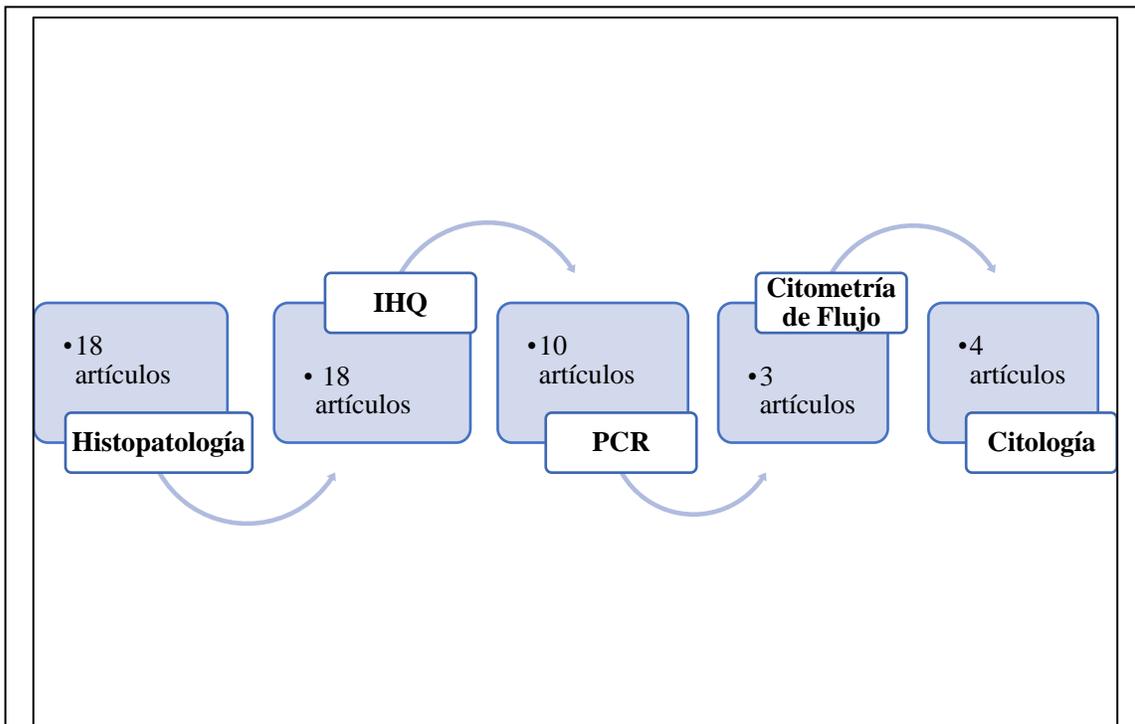
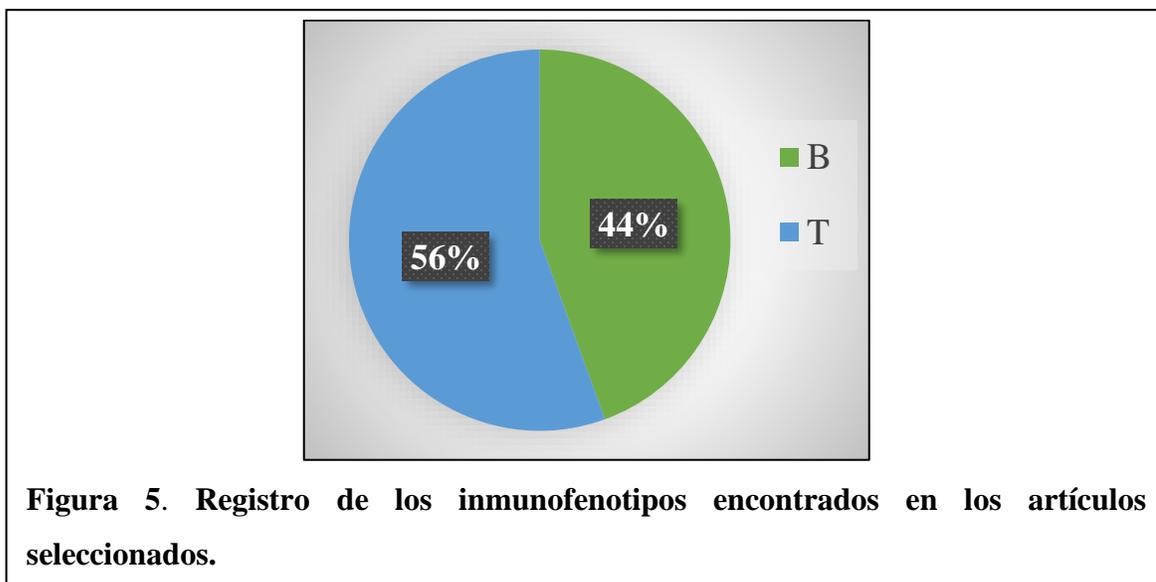


Figura 4. Técnicas utilizadas en los artículos seleccionados.

Estas técnicas diagnósticas son utilizadas con el objetivo de lograr la mejor descripción posible del linfoma, incluyendo establecer el inmunofenotipo. Al analizar los estudios seleccionados (23) se pudo establecer que el linfoma de células T fue el más frecuente, siendo predominante en el 53% de las publicaciones (Figura 5). Comparar esta información con los datos de la figura 3, permite clasificar los linfomas encontrados en los artículos seleccionados según su ubicación anatómica, destacándose el linfoma alimentario de células T (Figura 6).

Finalmente, se realizó el recuento de cada uno de los inmunofenotipos según su ubicación anatómica para establecer la frecuencia de ellos (Figura 7). El linfoma alimentario fue el más frecuentemente estudiado (14 de 23 publicaciones), así como el fenotipo T correspondió a el 49,52% de los individuos estudiados (415 de 838 pacientes), y el fenotipo B correspondió al 36,4%. Cabe destacar que el recuento de estas frecuencias solo consideró a los estudios que no hubieran reclutado pacientes según el inmunofenotipo, es decir, que el reclutamiento fuera aleatorio (Figura 7). Además, cabe mencionar que dentro de cada estudio hubo pacientes que no fueron tipificados como B o T (118 de 838 pacientes; 14,1%), por diferentes razones (no se hizo el análisis; se definieron como mixtos; no hubo información), registrándose como “no determinado” en la tabla.



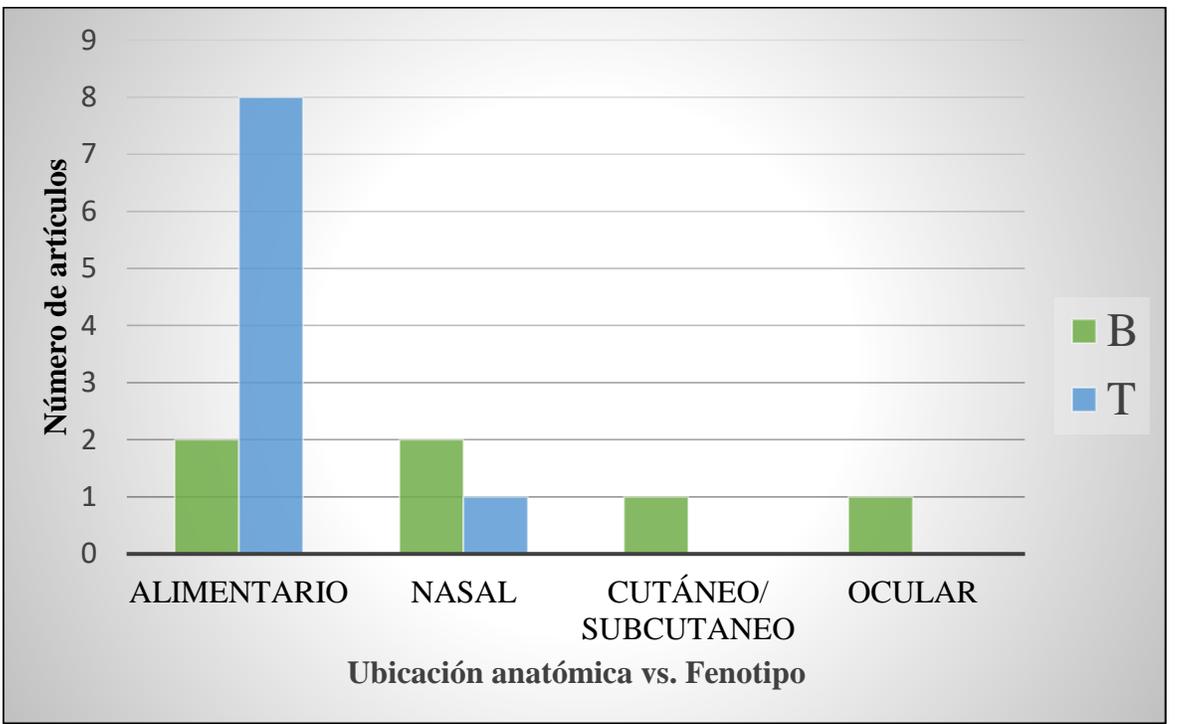


Figura 6. Número de publicaciones comparando el inmunofenotipo y la ubicación anatómica de los linfomas encontrados en los artículos seleccionados.

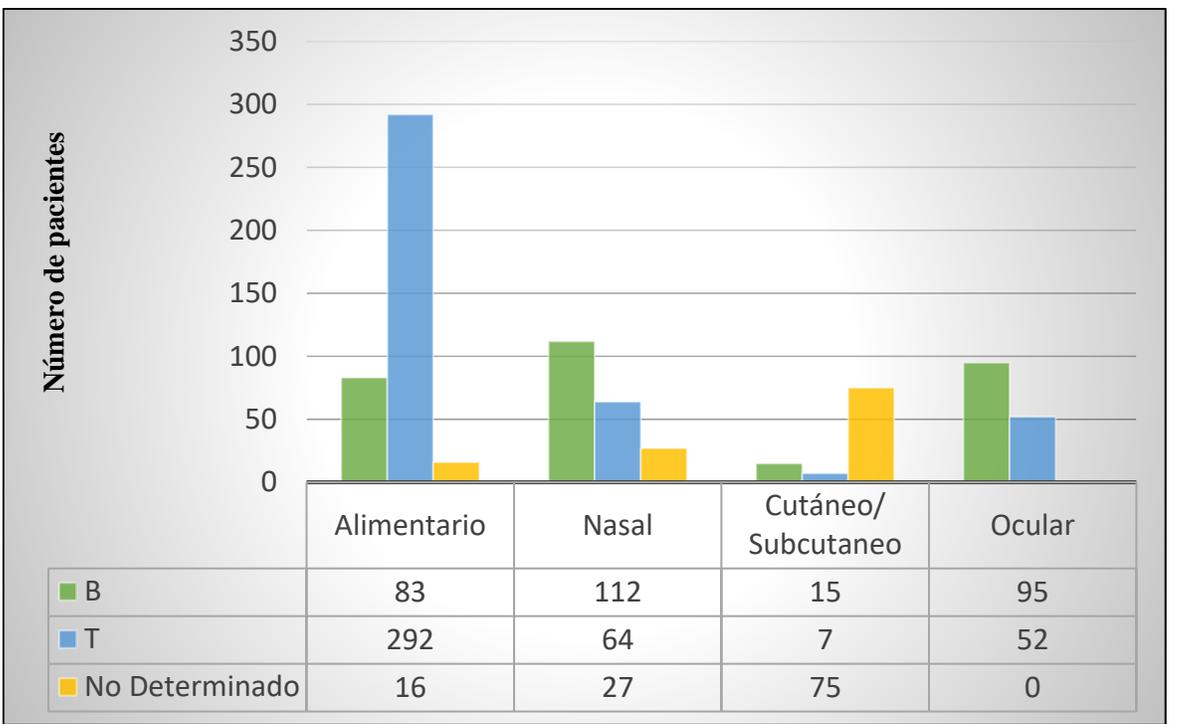
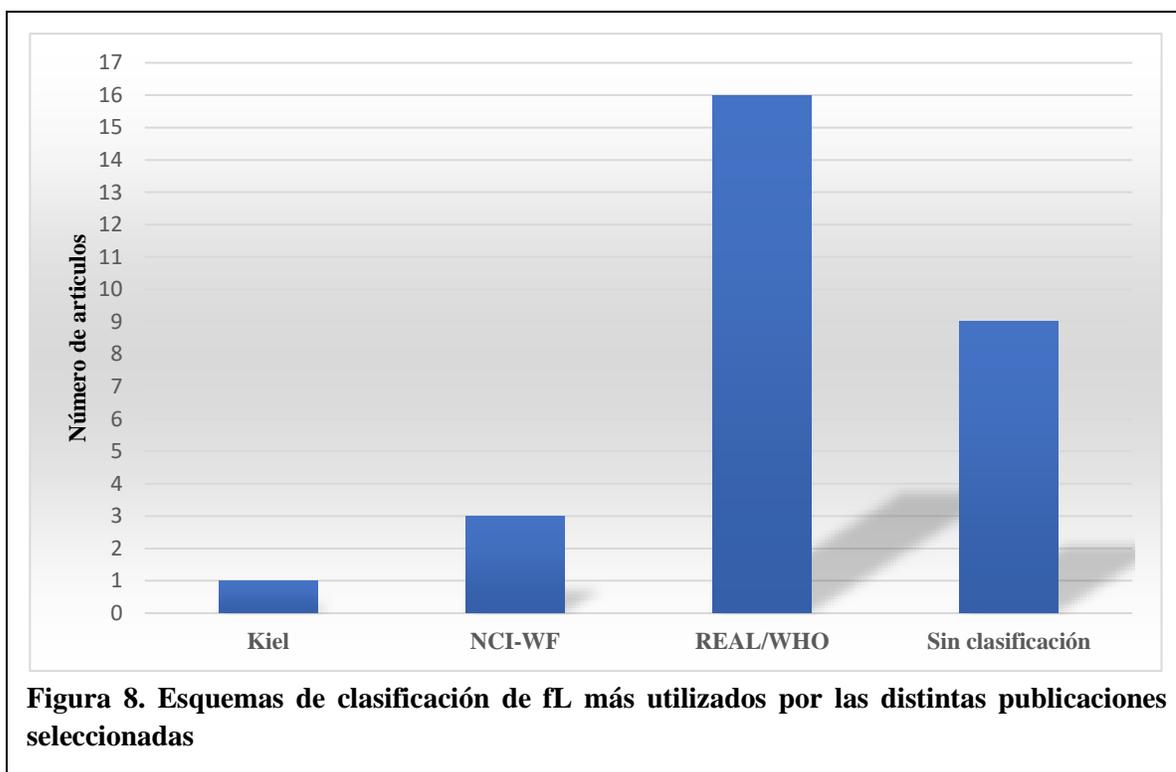


Figura 7. Número de pacientes estudiados considerando la ubicación anatómica y el inmunofenotipo de los linfomas encontrados en los artículos seleccionados.

Tras el análisis detallado de las publicaciones incluidas en esta monografía (28), se encontró que la utilización de las distintas técnicas diagnósticas aportaba la información necesaria para clasificar los linfomas según sus características y los requerimientos de los esquemas de clasificación, descritos en la revisión bibliográfica. Predominó la utilización del esquema de REAL/WHO, sin embargo, es importante considerar que un alto porcentaje de los artículos seleccionados no se enfocaban en el proceso de clasificación del linfoma (32,1%), sino que en la estandarización o validación de alguna técnica diagnóstica (Figura 8). También cabe mencionar, que un artículo utilizaba dos esquemas de clasificación (NCI-WF y REAL/WHO), por lo que en el grafico se cuentan 29 artículos, ya que uno aparece en dos categorías.



Teniendo en cuenta entonces, que la clasificación más utilizada es el esquema de REAL/WHO, en la siguiente tabla se registraron los subtipos de linfoma que aparecían al menos 1 vez en los artículos previamente seleccionados, dividiéndolos según su inmunofenotipo (B o T) (Tabla 5). Los subtipos más frecuentes fueron el DLBCL, en el caso

de las células B, y el PTCL en el caso de los linfomas de células T. Este listado de subtipos de fL será utilizado para generar la propuesta de clasificación de esta monografía.

Células B	Células T
Linfoma Difuso de células B (DLBCL)	Linfoma Periférico de células T (PTCL)
Linfoma de células B rico en células T (TCRBCL)	Linfoma anaplásico de células T (T-ALCL)
Linfoma Inmunoblástico de células B (LCIBL)	Linfoma Asociado a Enteropatía tipo I (EATL-I)
Linfoma anaplásico de células B (B-ALCL)	Linfoma Asociado a Enteropatía tipo II (EATL-II)
Linfoma tipo Burkitt (Burkitt)	Linfoma granular grande (LGL)
Plasmocitoma (PCT)	Linfoma angiotrópico (ATL)
Linfoma folicular (FL)	Linfoma Linfoblástico de células T (T-LBL)
Linfoma de MALT (MALT-L)	
Linfoma linfocítico de células B (B-SLL)	
Linfoma Linfoblástico de células B (B-LBL)	

Objetivo 2: Proponer una clasificación para linfoma felino, considerando las técnicas diagnósticas disponibles, para determinar un tratamiento y pronóstico adecuado.

Luego de analizar las publicaciones seleccionadas en esta revisión sistemática, se confirmó que hasta la fecha no existe un sistema de clasificación estandarizado para el fL, que haya sido aceptado por la comunidad médico-veterinaria, como si ha ocurrido en el caso de los caninos. Es por esta razón que, utilizando la información analizada se diseñó un diagrama que muestra de manera secuencial las técnicas diagnósticas y la información que aporta cada una de ellas, según el tipo de muestra obtenida, en el proceso de caracterización de los linfomas (Figura 9). Acá se puede observar que las dos maneras de analizar un linfoma es a través de muestras obtenidas por PAAF y biopsia. La primera es una técnica que entrega resultados más rápidos a través de la citología, por lo que es muy utilizada en la práctica clínica, pero no entrega tanta información como lo hace la biopsia a través de la histopatología e IHQ, las que son suficientes para una buena caracterización de la neoplasia. Otra alternativa para la fenotipificación es la citometría de flujo, que utiliza muestras recién obtenidas mediante PAAF, y para la clonalidad está la técnica PARR, para la cual se pueden utilizar muestras obtenidas por biopsia o PAAF, incluso ya fijadas.

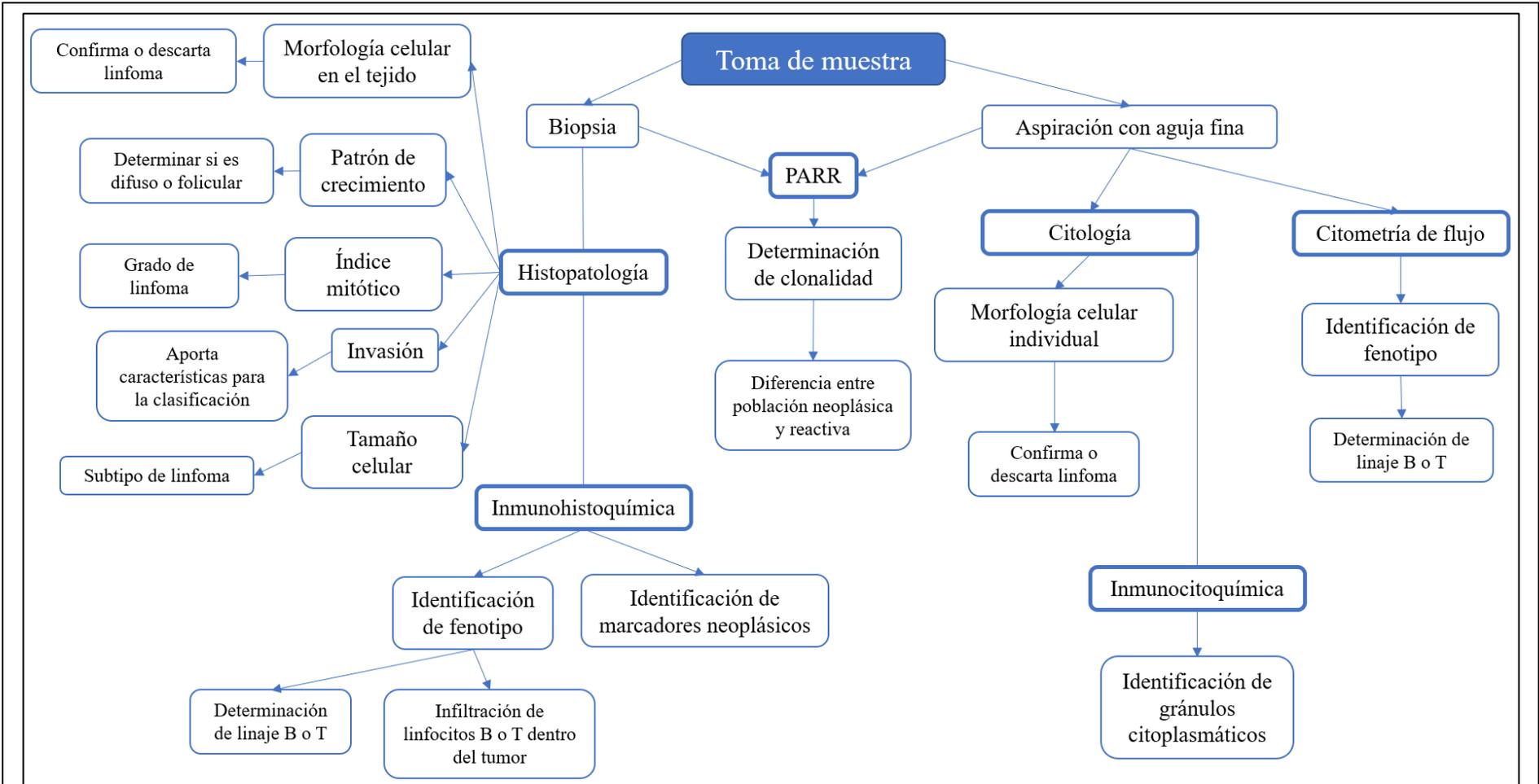
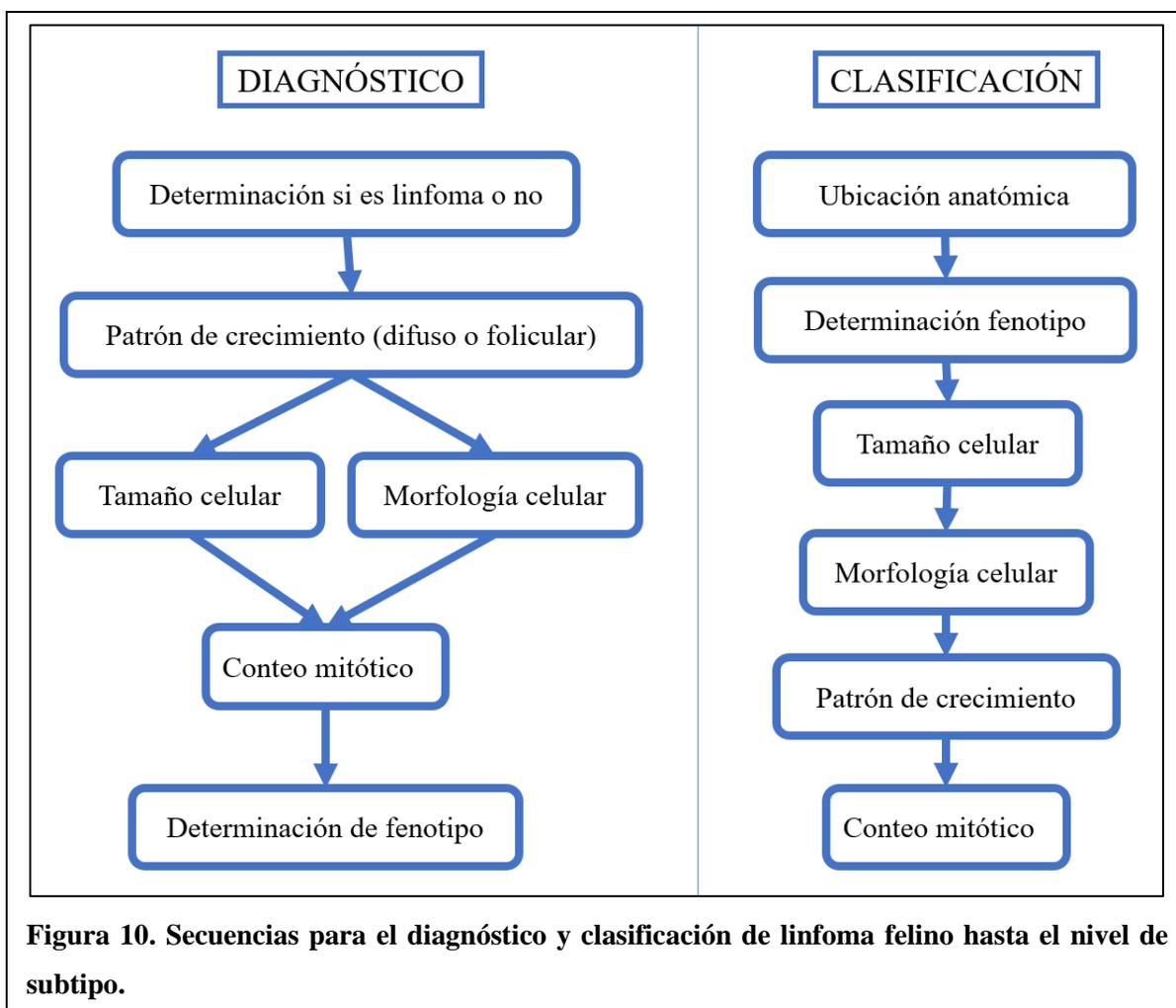


Figura 9. Diagrama para el abordaje de sospecha de linfoma felino.

En la figura 10 se observa a la izquierda, la secuencia del proceso diagnóstico basada en lo observado en el diagrama de la figura 9, considerando la información que se obtiene de las distintas técnicas diagnósticas, proceso que generalmente terminan con la inmunofenotipificación. Sin embargo, como se observa a la derecha de la figura 9, la secuencia de clasificación que se propone en esta monografía tiene un orden distinto ya que, considera la ubicación anatómica, debido a que es la primera aproximación que se tiene del linfoma, y luego la inmunofenotipificación de las células que componen el tumor, lo que constituiría la base mínima del proceso de clasificación de este tipo de neoplasia. La secuencia posterior se asocia a las características obtenidas en la histopatología que serían patrón de crecimiento, tamaño, morfología celular y finalmente el conteo mitótico, y de esta manera la identificación de un subtipo de fL entregaría información suficiente para entender



la condición clínica del paciente, posibilidad de abordaje de la neoplasia, pronóstico y tratamiento.

Considerando lo anterior es que proponemos un algoritmo de clasificación, entendiendo que este proceso es un ejercicio teórico, en el cual se utiliza la información obtenida de las distintas técnicas diagnósticas, sin que esto se ejecute en el mismo orden en que se realizaron dichas técnicas. Este algoritmo de clasificación comienza por establecer la ubicación anatómica del linfoma, mediante técnicas imagenológicas o el examen físico del paciente, aunque este último es más útil en caninos que en felinos. Luego el algoritmo procede con la información que entregan la histopatología y la IHQ, confirmando la sospecha del linfoma y la identificación del inmunofenotipo, lo que según la literatura revisada pudiera ser un buen adelanto de las características clínicas del linfoma. El resto de la información proporcionada por la histopatología permite completar la caracterización del linfoma (patrón de crecimiento, tamaño, morfología, conteo mitótico).

Finalmente, en el algoritmo se incluyeron los subtipos de linfoma mencionados en la literatura seleccionada para esta monografía, enfocándolo a lo que muestra la realidad de los hallazgos en las investigaciones recientes (Figura 11). De esta manera, el algoritmo de clasificación que se muestra a continuación es aplicable a cualquier tipo de linfoma que se pudiera encontrar, al cual se le debe aplicar la secuencia de clasificación descrita anteriormente (Figura 10 (derecha) y Figura 11), como se mostrará en la figura 12.

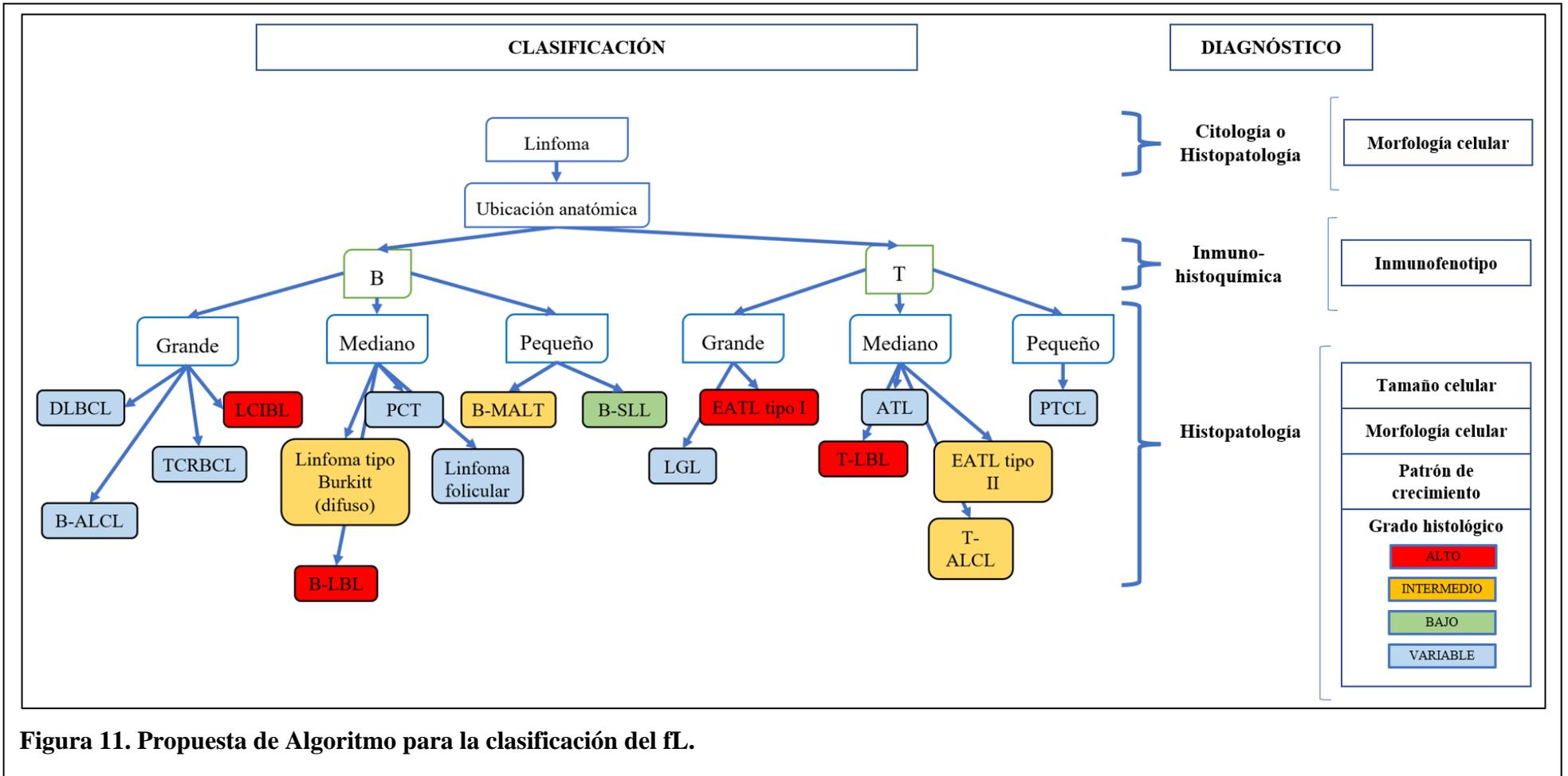


Figura 11. Propuesta de Algoritmo para la clasificación del fL.

A manera de ejemplo de la aplicación del algoritmo propuesto en la figura 11, en la siguiente figura se muestra la implementación de esta clasificación en el linfoma alimentario (LA), que es la forma anatómica más frecuente en gatos, mencionando los subtipos asociados a esta ubicación anatómica y que fueron nombrados en la literatura seleccionada (Figura 12).

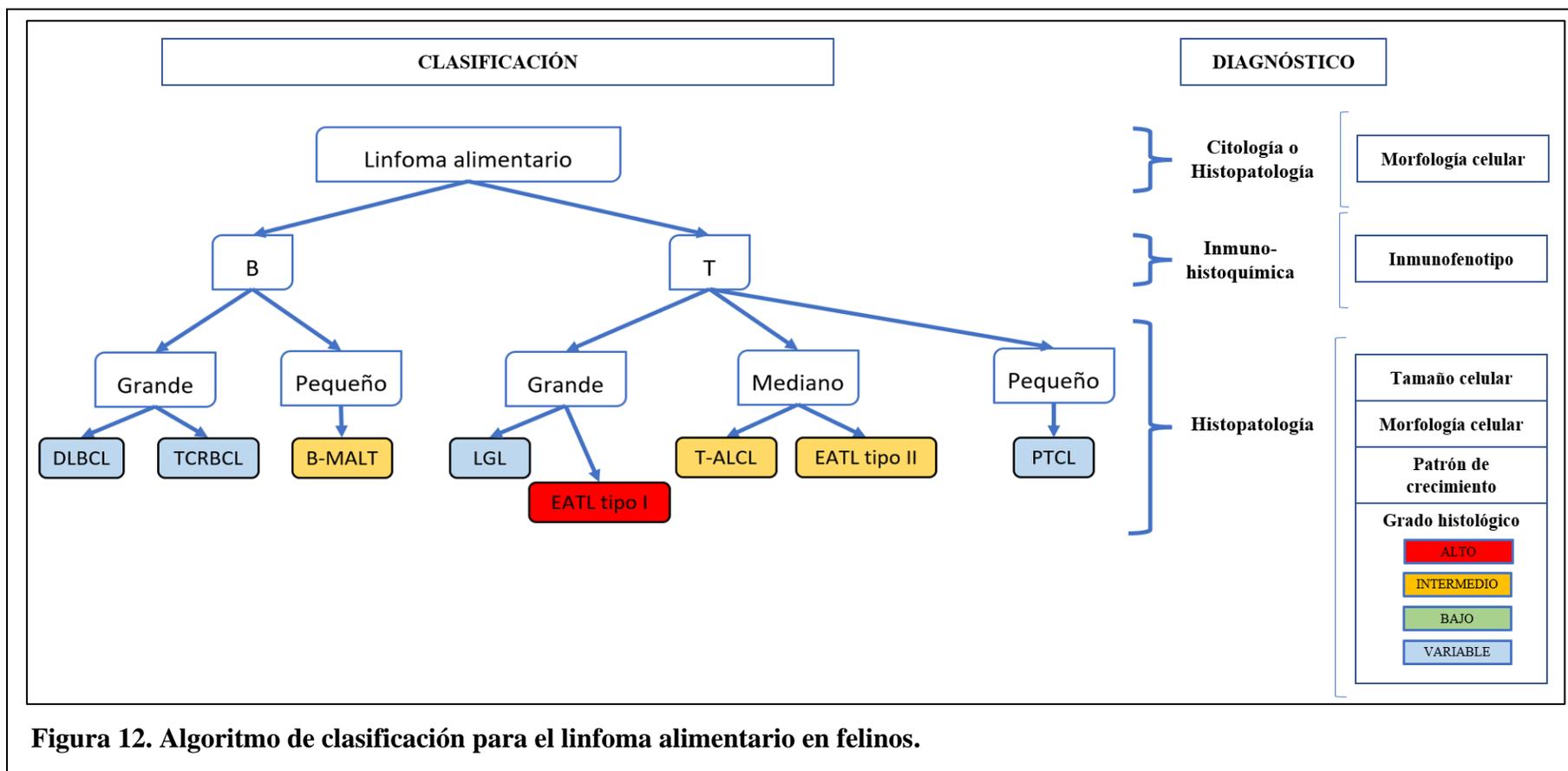


Figura 12. Algoritmo de clasificación para el linfoma alimentario en felinos.

DISCUSIÓN

El Linfoma felino (fL) es una patología que ha sido estudiada desde mediados del siglo pasado, principalmente su etiología y sus posibles tratamientos. El linfoma canino tiene muchas semejanzas con el linfoma humano, y por lo tanto, ha adoptado su forma de clasificación, sin embargo, esto no ha ocurrido de igual manera con el fL, porque presenta características específicas de la especie, como por ejemplo, la epidemiología de los distintos subtipos y la etiología. Para el fL se han propuesto tres esquemas de uso frecuente para la categorización de los subtipos de linfoma, pero ninguno de estos ha sido establecido como de consenso. En esta monografía nos propusimos plantear un esquema de clasificación del fL, basándonos en las características y resultados que pudieran obtenerse de las distintas técnicas disponibles en la actualidad en medicina veterinaria, tanto en Chile como en el mundo.

El proceso de selección de los artículos para esta monografía se realizó en base a las publicaciones encontradas en *PubMed* y *ScienceDirect*, utilizando las palabras claves y criterios de inclusión mencionadas en la sección de materiales y métodos. Estas alcanzaron un total de 3.326 artículos, que después de aplicar los criterios de exclusión, se redujeron a 28 (Figura 1). Puede llamar la atención la gran diferencia entre ambos valores, sin embargo, no es tan extraño si se considera que, al realizar la búsqueda con las palabras claves, esta incluyera publicaciones enfocadas a otras neoplasias u otras especies (humanos, canino, bovino y murino).

La búsqueda bibliográfica abarcó los últimos 20 años (2002 - 2021) (Figura 2), e incluyó como conceptos claves el diagnóstico y la clasificación del fL. Este periodo de tiempo permitió encontrar una mayor cantidad de publicaciones, sin que se concentraran en, por ejemplo, un solo tipo de técnica diagnóstica, como ocurre en los últimos años en que se estudia más frecuentemente la técnica de PCR, buscando perfeccionarla, dejando de lado las otras más tradicionales, como la histopatología e IHQ. La distribución a lo largo de los años de las publicaciones seleccionadas muestra que el fL es una patología que sigue siendo de alto interés y que se mantiene constante en el tiempo.

Para valorizar la calidad de los trabajos seleccionados, utilizamos la tabla GDE (Tabla 2), la cual se basó principalmente en si eran estudios prospectivos o retrospectivos, y en el tamaño

de la muestra, destacándose que la mayoría de los artículos seleccionados corresponden a trabajos grado III, con un n entre 20 y 100 muestras, ya sea prospectivo o retrospectivo. Pese a lo anterior, algunos de los trabajos mencionan que para que una publicación sea estadísticamente significativa, idealmente deberían contar con al menos 100 muestras y, por lo tanto, muchos de estos artículos indican también que sus resultados no son definitivos y deberían seguir estudiando el tema (Patterson-Kane *et al.*, 2014).

También es importante destacar que, este tipo de categorización está diseñada para ser utilizada principalmente en estudios terapéuticos que consideran conceptos como ciego, doble ciego, aleatorio, controlados, etc. (Urrútia y Bonfill, 2010), y que en el caso de los estudios de diagnóstico y clasificación no se utilizan y, por lo tanto, fue difícil su aplicación.

Otra forma de evaluar la calidad de las publicaciones fue a través del Factor de Impacto (FI) de su revista, el cual se asocia a la cantidad de veces que esta fue citada. El FI se utiliza como un indicador del grado de exigencia de los comités editoriales para aceptar un estudio científico. Para nuestra selección, al comparar el GDE con el FI no se observa una correlación marcada entre ellos. Esto posiblemente ocurre porque los FI de las publicaciones seleccionadas están dentro de un rango muy acotado y, por lo tanto, no existen grandes diferencias entre ellos (Tabla 3).

Ya con los artículos seleccionados, el análisis de cada uno de ellos mostró que la clasificación del fL basada en la ubicación anatómica (Figura 3), sigue siendo fundamental en el abordaje de la neoplasia, aunque esta siempre debe ser complementada, al menos con la caracterización morfofocelar, como se discute más adelante. Tanto en las publicaciones que utilizaron pacientes considerando la ubicación anatómica del linfoma, como aquellas que no lo consideraban, se observa que la presentación más frecuente es la de tipo alimentaria. Esta forma de presentación destaca desde que se comenzó con la vacunación contra el FeLV, dejando como agente etiológico más probable a los cuadros alérgicos e inflamatorios del sistema gastrointestinal. En muchos casos ocurre que, previo al diagnóstico del linfoma alimentario los gatos son diagnosticados con cuadros inflamatorios intestinales, sin embargo, se ha descrito que existiría una superposición entre inflamación y neoplasia debido a que la determinación del cuadro inflamatorio intestinal se realiza en base a biopsias endoscópicas de la mucosa superficial, no detectando el tejido maligno residente en zonas más profundas,

cuando ambas afecciones ocurren simultáneamente (Morrison, 2012). Para esto, algunos estudios han establecido que las muestras necesarias para este tipo de análisis sean preferiblemente de un espesor de pared completa, tomadas mediante laparotomía, para que en el caso del linfoma se pueda visualizar si la infiltración de linfocitos neoplásicos abarca al menos la mucosa y submucosa (Briscoe *et al.*, 2011; Kiupel *et al.*, 2011; Freiche *et al.*, 2021). Sin embargo, dado que, para la obtención de una muestra de espesor completo, es necesario realizar una laparotomía bajo anestesia general, lo cual puede ser difícil de realizar en un paciente con un estado de salud crítico, una muestra de biopsia por endoscopia sigue siendo una alternativa según algunos autores (Kiupel *et al.*, 2011; Sabattini *et al.*, 2016).

Teniendo en consideración lo anterior, no bastaría con saber la ubicación del linfoma, en este caso de tipo alimentario, sino que es de gran utilidad conocer las características inmunofenotípicas, morfológicas y distributivas del linfoma, para reconocerlo, tipificarlo y tratarlo, considerando los distintos pronósticos para el paciente. Para llegar a este nivel de caracterización, es importante conocer cada una de las técnicas diagnósticas que se han utilizado para la identificación del fL, considerando sus ventajas y desventajas, permitiendo de esta manera realizar la mejor elección en cuanto a los recursos disponibles (monetarios, factibilidad de realizar las técnicas diagnósticas, compromiso del tutor, etc.) y la información que se quiera obtener (Tabla 4).

Aunque la citología es una técnica ampliamente utilizada en clínica para el diagnóstico rápido del linfoma, a nivel de investigación no fue encontrada de forma frecuente, muy probablemente porque era una etapa realizada previamente al reclutamiento de los pacientes en los estudios revisados.

El proceso diagnóstico ha ido incorporando nuevas técnicas que intentan mejorar la caracterización celular y tumoral. Se esperaba que las técnicas más recientes, por ejemplo, de tipo moleculares o con equipamiento más moderno, pudieran ser un mayor aporte en esta tarea, sin embargo, no han logrado establecerse como alternativas que sustituyan a la histopatología, por el contrario, esta se ha consolidado como la más aplicada y la de mayor utilidad (Figura 4). De esta forma, el PARR y la citometría de flujo son menos frecuentemente utilizadas, pero son alternativas que complementan a la histopatología.

En los últimos años varios trabajos (5 de 28) han buscado diferenciar entre las afecciones inflamatorias de aquellas neoplásicas, enfocándose en la identificación de la clonalidad del tipo celular, policlonal o monoclonal, respectivamente. Este es el caso de PARR, técnica que sigue requiriendo de la IHQ ya que no distingue el fenotipo del linfoma, y que se utiliza principalmente en casos dudosos, donde todos los resultados indican que se está frente a un cuadro de inflamación, pero existe sospecha clínica de estar frente a una neoplasia, por lo que se requiere determinar la clonalidad del tipo celular. PARR presenta una sensibilidad y especificidad variables, dependiente de las características del PCR y los partidores utilizados. Por esto, algunos estudios han evaluado la posibilidad de combinar partidores dirigidos a distintas secuencias nucleotídicas (Multiplex PCR), para obtener mejores y más confiables resultados (Mochizuki, 2011; Radtanakatakanon *et al.*, 2021).

La citometría de flujo es una técnica equivalente a la IHQ, puesto que ambas utilizan anticuerpos para el reconocimiento del fenotipo, aunque el primero requiere anticuerpos con una molécula fluorescente y un citómetro de flujo para su realización. Su uso en el diagnóstico cotidiano ha sido difícil por la poca disponibilidad de anticuerpos específicos para felinos y el poco acceso a citómetros de uso clínico veterinario. Pese a lo anterior, la citometría de flujo se proyecta como una gran alternativa ya que utiliza muestras provenientes de un PAAF, técnica de baja invasividad y riesgo para el paciente, sobre todo en los felinos cuyos linfomas se ubican en mayor proporción dentro de la cavidad abdominal. A esto se suma la rápida obtención de los resultados, aunque algunos autores aún lo consideran en proceso de estudio (Guzera *et al.*, 2016; Martini *et al.*, 2018).

La fenotipificación es un mecanismo para refinar el diagnóstico del linfoma. Se ha visto que dependiendo de la especie es el tipo celular que predomina, por ejemplo, en caninos son más frecuentes los linfomas de tipo B, en cambio en felinos, actualmente se ha definido que el fenotipo más habitual es el T (Figura 5 y 7) (Vezzali *et al.*, 2010; Wolfesberger *et al.*, 2017), lo cual también se observa en esta revisión. Esto pudiera deberse a que en general el LA es el linfoma más estudiado en felinos, y fue el más encontrado en esta monografía (14 de 23 publicaciones) (Figura 6 y 7). Es importante mencionar que en algunos estudios de esta revisión, pudo haber un subdiagnóstico de algún fenotipo debido a que se enfocaban en la identificación de solo uno específicamente, por ejemplo, utilizando partidores de PCR para

linfocitos T, no considerando la presencia de células B (Moore *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2005).

En felinos se ha descrito que en algunas ubicaciones anatómicas puede predominar el fenotipo B (Musciano *et al.*, 2020). En este sentido, un estudio encontró una alta correlación entre el inmunofenotipo y la ubicación del linfoma dentro del tubo digestivo, observándose que los de células T se encuentran con mayor frecuencia en intestino delgado (predominantemente en yeyuno e íleon), a diferencia de los de tipo B que se ubican más frecuentemente en estómago y la unión íleo-ceco-cólica e intestino grueso (Moore *et al.*, 2012). Esto sigue siendo estudiado y confirmado en nuevas publicaciones (Freiche *et al.*, 2021). Así también, en esta monografía encontramos tres publicaciones que estudiaban el linfoma nasal, con un total de 208 pacientes, de los cuales 112 correspondían a fenotipo B. Todo lo anterior, sugiere que aún no está definida la prevalencia fenotípica del fL, por lo que es algo importante de seguir estudiando, ya que, eventualmente nos permitiría sospechar cuál es el fenotipo más probable de encontrar en cada especie o en una ubicación anatómica específica.

Finalmente, en el proceso de análisis de las publicaciones seleccionadas, se determinó qué, los sistemas de clasificación eran los que más se utilizaban, con el objetivo principal de entender cómo y por qué se ocupaba cada uno de estos esquemas, lo que nos daría luces de las fortalezas y debilidades de cada uno de ellos. Se encontró que en los últimos 20 años aún se utilizan los 3 sistemas de clasificación, sin embargo, los trabajos más recientes utilizan preferentemente el sistema de clasificación de REAL/WHO (Figura 8), aunque según la literatura NCI-WF y la REAL/WHO son las más utilizadas (Barrs y Beatty, 2012a).

Al analizar el esquema de la NCI-WF, originalmente no se requería de la inmunofenotipificación, sin embargo, en los estudios en que fue utilizado este esquema, los investigadores muy frecuentemente incorporan esta técnica diagnóstica para complementar la caracterización del linfoma (Little *et al.*, 2007; Pohlman *et al.*, 2009), lo que demuestra su importancia en el proceso de clasificación y, por lo tanto, que debería ser incorporada definitivamente en los protocolos. A diferencia de esta, la clasificación de REAL/WHO sí incorpora la identificación del tipo celular del linfoma, lo que le da una ventaja en el proceso de clasificación. Este sistema, además, aborda cada subtipo de linfoma como una entidad

patológica, considerando el curso clínico de ella y, por lo tanto, teóricamente se podría establecer un pronóstico y un tratamiento más certero a cada paciente (Wolfesberger *et al.*, 2017).

Considerando el esquema REAL/WHO, se registraron los subtipos de fL encontrados en esta revisión, los cuales se dividieron de acuerdo con su fenotipo B o T y, su etapa de diferenciación, cuyas únicas entidades con origen en células precursoras son las linfoblásticas de células B y T (Tabla 5). Cabe destacar que no todos los subtipos de linfoma mencionados en REAL/WHO (diseñado para humanos) se han descrito para felinos, y para los que sí han sido descritos, no existe en todos los casos una buena descripción morfo celular.

Todo este análisis permitió entender mejor la situación del proceso de clasificación del fL, así como la importancia del tipo de muestra que se debe obtener, las técnicas diagnósticas disponibles y la información que entrega cada una de ellas. Con esto, se diseñó un diagrama que facilitaría la toma de decisiones frente a la sospecha de fL, ya que es un punto crucial y de lo cual muchas veces los clínicos aun no tienen total claridad (Figura 9).

La figura 10 es el punto donde confluye el proceso de análisis de las publicaciones que abordaban el diagnóstico y clasificación del fL, donde podemos deducir que la clasificación deriva del proceso diagnóstico. Cuando se propusieron las palabras clave para la búsqueda bibliográfica, no se incluyó alguna que llevara a determinar la ubicación anatómica, ya que este es una etapa que se realiza o se determina en la clínica (por examen físico o imagenología), y por lo tanto, no se consideró como una técnica diagnóstica propiamente tal. Sin embargo, en este punto de la monografía, se consideró que la ubicación anatómica, pese a ser un antecedente obtenido previo al análisis del tejido (citológico o histológico), que fue nuestro punto de inicio, también aporta información de relevancia ya que *a priori* puede dar indicios del cuadro clínico que está cursando el paciente. Así también, la inmunofenotipificación juega un rol incluso más importante de lo que ya establecía la clasificación REAL/WHO (incorporado al final del esquema), ya que, aunque es lo último que se evalúa, al momento de la clasificación si se utilizara en la etapa inicial podría guiar de mejor manera a los posibles cuadros clínicos y la toma de decisiones sobre el paciente.

Finalmente, y como se deduce del párrafo anterior, nos basamos en el esquema de clasificación propuesto por la REAL/WHO, el más utilizado en las publicaciones estudiadas,

para diseñar un nuevo esquema que considere de forma prioritaria la fenotipificación de los linfocitos neoplásicos, así como la ubicación anatómica, lo que mejoraría la caracterización de cada subtipo de linfoma (Figura 11 y 12). De esta manera, así como los autores de la clasificación de REAL/WHO declaran la intención de considerar cada subtipo de linfoma como una entidad patológica independiente (Barrs y Beatty, 2012), las modificaciones propuestas por esta monografía buscan mejorar la caracterización de los subtipos de linfoma, fomentando el reconocimiento de ellos como enfermedades independientes.

CONCLUSIONES

- La mayoría de los estudios revisados propone un n mínimo de 100, para que sus resultados sean concluyentes y estadísticamente significativos.
- Las técnicas clásicas de histopatología e inmunohistoquímica siguen siendo las más utilizadas y las que entregan la mayor cantidad de información para el diagnóstico del fL.
- No es posible asegurar que hay una mayor proporción de linfomas T en gatos, ya que pudo ocurrir un subdiagnóstico de uno u otro fenotipo por el enfoque de los estudios.
- La ubicación anatómica del linfoma felino es una característica que debe ser considerada en el proceso de clasificación final, ya que, estudios recientes establecen características específicas del linfoma según su ubicación.
- La inmunofenotipificación en la etapa inicial de la clasificación permite realizar una mejor discriminación de los subtipos de fL, ayudando en el reconocimiento del posible curso clínico del linfoma.

BIBLIOGRAFÍA

Barrs, V.; Beatty, J. 2012a. Feline alimentary lymphoma: 1. Classification, risk factors, clinical signs and non-invasive diagnostics. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 14(3): 182-190.

Barrs, V.; Beatty, J. 2012b. Feline alimentary lymphoma: 2. Further diagnostics, therapy and prognosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 14(3): 191-201.

Beatty, J. 2014. Viral causes of feline lymphoma: Retroviruses and beyond. *Vet J*. 201(2): 174–180.

Bertone, E. R.; Snyder, L. A.; Moore, A. S. 2002. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *American Journal of Epidemiology*. 156(3): 268–273.

Briscoe, K. A.; Krockenberger, M.; Beatty, J. A.; Crowley, A.; Dennis, M. M.; Canfield, P. J.; Dhand, N.; Lingard, A. E.; Barrs, V. R. 2011. Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma. *Journal of Comparative Pathology*. 145(2-3): 187–198.

Burgess, K. E. 2020. Lymphomas. **In:** Bruyette, D. S. *Clinical Small Animal Internal Medicine*. Wiley-Blackwell. USA. pp. 1231-1239.

Chino, J.; Fujino, Y.; Kobayashi, T.; Kariya, K.; Goto-Koshino, Y.; Ohno, K.; Nakayama, H.; Tsujimoto, H. 2013. Cytomorphological and immunological classification of feline lymphomas: clinicopathological features of 76 cases. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 75(6): 701-707.

Choy, K.; Bryan, J. N. 2012. Oncology. **In:** Little, S. E. *The Cat*. Saunders. Ontario, Canada. pp 768-806.

Day, M. J.; Henderson, S. M.; Belshaw, Z.; Bacon, N. J. 2004. An immunohistochemical investigation of 18 cases of feline nasal lymphoma. *Journal of Comparative Pathology*. 130(2-3): 152–161.

Fabrizio, F.; Calam, A. E.; Dobson, J. M.; Middleton, S. A.; Murphy, S.; Taylor, S. S.; Schwartz, A.; Stell, A. J. 2013. Feline mediastinal lymphoma: a retrospective study of signalment, retroviral status, response to chemotherapy and prognostic indicators. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 16(8): 637–644.

Freiche, V.; Paulin, M. V.; Cordonnier, N.; Huet, H.; Turba, M. E.; Macintyre, E.; Molina, T. J.; Hermine, O.; Couronné, L.; Bruneau, J. 2021. Histopathologic, phenotypic, and molecular criteria to discriminate low-grade intestinal T-cell lymphoma in

cats from lymphoplasmacytic enteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 35(6): 2673–2684.

Gress, V.; Wolfesberger, B.; Fuchs-Baumgartinger, A.; Nedorost, N.; Saalmüller, A.; Schwendenwein, I.; Rütgen, B. C.; Hammer, S. E. 2016. Characterization of the T-cell receptor gamma chain gene rearrangements as an adjunct tool in the diagnosis of T-cell lymphomas in the gastrointestinal tract of cats. *Research in Veterinary Science*. 107: 261–266.

Guzera, M.; Cian, F.; Leo, C.; Winnicka, A.; Archer, J. 2016. The use of flow cytometry for immunophenotyping lymphoproliferative disorders in cats: a retrospective study of 19 cases. *Veterinary and Comparative Oncology*. 14 Suppl 1: 40–51.

Hammer, S. E.; Groiss, S.; Fuchs-Baumgartinger, A.; Nedorost, N.; Gress, V.; Luckschander-Zeller, N.; Saalmüller, A.; Schwendenwein, I.; Rütgen, B. C. 2017. Characterization of a PCR-based lymphocyte clonality assay as a complementary tool for the diagnosis of feline lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*. 15(4): 1354–1369.

Hartmann, K.; Hofman-Lehmann, R. 2020. What's New in Feline Leukemia Virus Infection. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*. 50(5): 1013–1036.

Irving, J.; Dobromylskyj, M. J.; Holmes, E. 2019. Feline alimentary lymphoma: a guide to cytological and histopathological diagnosis for the general practitioner. *Companion Animal*. 24(9): 466–471.

Isacson, P. G. 2000. The current status of lymphoma classification. *British Journal of Haematology*. 109(2): 258–266.

Kaye, S.; Wang, W.; Miller, C.; McLuckie, A.; Beatty, J. A.; Grant, C. K.; VandeWoude, S.; Bielefeldt-Ohmann, H. 2016. Role of Feline Immunodeficiency Virus in Lymphomagenesis-Going Alone or Colluding?. *ILAR Journal*. 57(1): 24–33.

Kiupel, M.; Smedley, R. C.; Pfent, C.; Xie, Y.; Xue, Y.; Wise, A. G.; DeVaul, J. M.; Maes, R. K. 2011. Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Veterinary Pathology*. 48(1): 212–222.

Krick, E. L.; Sorenmo, K. U. 2016. A Review and Update on Gastrointestinal Lymphoma in Cats. **In:** Little, S. E. *August's Consultations in Feline Internal Medicine*. Saunders. pp. 561–571.

Little, L.; Patel, R.; Goldschmidt, M. 2007. Nasal and nasopharyngeal lymphoma in cats: 50 cases (1989–2005). *Veterinary Pathology*. 44(6): 885–892.

- Louwerens, M.; London, C. A.; Pedersen, N. C.; Lyons, L. A.** 2005. Feline Lymphoma in the Post-Feline Leukemia Virus Era. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 19(3): 329-335.
- Maeda, N.; Fan, H.; Yoshikai, Y.** 2008. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Reviews in Medical Virology*. 18(6): 387–405.
- Magden, E.; Quackenbush, S. L.; VandeWoude, S.** 2011. FIV associated neoplasms--a mini-review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 143(3-4): 227–234.
- Magden, E.; Miller, C.; MacMillan, M.; Bielefeldt-Ohmann, H.; Avery, A.; Quackenbush, S. L.; VandeWoude, S.** 2013. Acute virulent infection with feline immunodeficiency virus (FIV) results in lymphomagenesis via indirect mechanism. *Virology*. 436: 284-294.
- Martini, V.; Bernardi, S.; Marelli, P.; Cozzi, M.; Comazzi, S.** 2018. Flow cytometry for feline lymphoma: a retrospective study regarding pre-analytical factors possibly affecting the quality of samples. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 20(6): 494–501.
- Mason, S.; Pittaway, C.** 2022. Feline lymphoma: diagnosis, staging and clinical presentations. *In Practice*. 44: 4-20.
- Meichner, K.; von Bomhard, W.** 2016. Patient characteristics, histopathological findings and outcome in 97 cats with extranodal subcutaneous lymphoma (2007-2011). *Veterinary and Comparative Oncology*. 14 Suppl 1: 8–20.
- Meinkoth, J. H.; Cowell, R. L.; Tyler, R. D.; Morton, R. J.** 2020. Sample Collection and Preparation. In: Valenciano, A. C. y Cowell, R. L. Cowell and Tyler's *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 5^a Ed. Mosby. USA. pp.1-17
- Mochizuki, H.; Nakamura, K.; Sato, H.; Goto-Koshino, Y.; Sato, M.; Takahashi, M.; Fujino, Y.; Ohno, K.; Uchida, K.; Nakayama, H.; Tsujimoto, H.** 2011. Multiplex PCR and Genescan analysis to detect immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in feline B-cell neoplasms. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 143(1-2): 38–45.
- Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D. G.** 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Medicine* 6(7): e1000097.
- Morrison, W. B.** 2012. Inflammation and cancer: a comparative view. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 26(1): 18–31.

Moore, P. F.; Woo, J. C.; Vernau, W.; Kosten, S.; Graham, P. S. 2005. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 106(3-4): 167–178.

Moore, P. F.; Rodriguez-Bertos, A.; Kass, P. H. 2012. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality. *Veterinary Pathology*. 49(4): 658–668.

Moore, P. F.; Vernau, W.; Leutenegger, C. M.; Cornwell, D. 2020. Molecular Methods in Lymphoid Malignancies. **In:** Valenciano, A. C., Cowell, R. L. Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. 5^a Ed. Mosby. USA. pp. 531-538.

Musciano, A. R.; Lanza, M. R.; Dubielzig, R. R.; Teixeira, L.; Durham, A. C. 2020. Clinical and histopathological classification of feline intraocular lymphoma. *Veterinary Ophthalmology*. 23(1): 77–89.

Nagata, K.; Lamb, M.; Goldschmidt, M. H.; Duda, L.; Walton, R. M. 2014. The usefulness of immunohistochemistry to differentiate between nasal carcinoma and lymphoma in cats: 140 cases (1986-2000). *Veterinary and Comparative Oncology*. 12(1): 52–57.

Ota-Kuroki, J.; Ragsdale, J. M.; Bawa, B.; Wakamatsu, N.; Kuroki, K. 2014. Intraocular and periocular lymphoma in dogs and cats: a retrospective review of 21 cases (2001-2012). *Veterinary Ophthalmology*. 17(6): 389–396.

Oxford Centre For Evidence-Based Medicine. 2011. The Oxford levels of evidence2. [en línea]. < <https://www.cebm.net/index.aspx?o=5653> > [consulta: 02-09-2021]

Paulin, M. V.; Couronné, L.; Beguin, J.; Le Poder, S.; Delverdier, M.; Semin, M-O.; Julie Bruneau, J.; Cerf-Bensusan, N.; Malamut, G.; Cellier, C.; Benchekroun, G.; Tiret, L.; German, A. J.; Hermine, O.; Freiche, V. 2018. Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease. *BMC veterinary research*. 14(1): 1-19.

Patterson-Kane, J. C.; Kugler, B. P.; Francis, K. 2004. The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. *Journal of Comparative Pathology*. 130(2-3): 220–222.

Pohlman, L. M.; Higginbotham, M. L.; Welles, E. G.; Johnson, C. M. 2009. Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. *Veterinary Pathology*. 46(2): 259–268.

- Radtanakatikanon, A.; Moore, P. F.; Keller, S. M.; Vernau, W.** 2021. Novel clonality assays for T cell lymphoma in cats targeting the T cell receptor beta, T cell receptor delta, and T cell receptor gamma loci. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 35(6): 2865–2875.
- Roccabianca, P.; Avallone, G.; Rodriguez, A.; Crippa, L.; Lepri, E.; Giudice, C.; Caniatti, M.; Moore, P. F.; Affolter, V. K.** 2016. Cutaneous Lymphoma at Injection Sites: Pathological, Immunophenotypical, and Molecular Characterization in 17 Cats. *Veterinary Pathology*. 53(4): 823–832.
- Sabattini, S.; Bottero, E.; Turba, M. E.; Vicchi, F.; Bo, S.; Bettini, G.** 2016. Differentiating feline inflammatory bowel disease from alimentary lymphoma in duodenal endoscopic biopsies. *The Journal of Small Animal Practice*. 57(8): 396–401.
- Santagostino, S. F.; Mortellaro, C. M.; Boracchi, P.; Avallone, G.; Caniatti, M.; Forlani, A.; Roccabianca, P.** 2015. Feline upper respiratory tract lymphoma: site, cyto-histology, phenotype, FeLV expression, and prognosis. *Veterinary Pathology*. 52(2): 250–259.
- Schaefer, D. M. W.; Corn, S. C.** 2020. Special Tests: Flow Cytometry. **In:** Amy C. Valenciano, Rick L. Cowell. *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 5^a Ed. Mosby. USA. pp. 521-530.
- Shankland, K. R.; Armitage, J. O.; Hancock, B. W.** 2012. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*. 380(9844): 848-857.
- Smith, V.; Knottenbelt, C.; Watson, D.; Mellor, DJ.; Guillen Martinez, A.; Philp, H.; Keegan, S.; Marrington, M.; Giannasi, C.; Cave, T.; McBrearty, AR.** 2020. Hair nicotine concentration of cats with gastrointestinal lymphoma and unaffected control cases. *Veterinary Record*. 186(13): 414.
- Uppenkamp, M.; Feller, A. C.** 2002. Classification of malignant lymphoma. *Onkologie*. 25(6): 563–570.
- Urrutia, G.; Bonfill, X.** 2010. Declaración PRISMA: una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y metaanálisis. *Medicina Clínica*. 135(11): 507-511.
- Vail, D. M.; MacEwen, E. G.** 2000. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investigation*, 18(8): 781–792.
- Vail, D. M.** 2014. Tumores hematopoyéticos y del bazo. **In:** Dobson, J.; Duncan, B.; Lascelles, X. (Eds.). *Manual de Oncología en Pequeños Animales*. 3^a Ed. Ediciones S. España. pp. 419-445f.

Vail, D. M.; Thamm, D. H.; Liptak, J. M. 2019. Hematopoietic Tumors. **In:** Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 6^a Ed. Saunders. pp. 715-729.

Vezzali, E.; Parodi, A. L.; Marcato, P. S.; Bettini, G. 2010. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Veterinary and Comparative Oncology*. 8(1): 38–49.

Waly, N. E.; Gruffydd-Jones, T. J.; Stokes, C. R.; Day, M. J. 2005. Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *Journal of Comparative Pathology*. 133(4): 253–260.

Welter, J.; Duckova, T.; Groiss, S.; Wolfesberger, B.; Fuchs-Baumgartinger, A.; Rütgen, B. C.; Hammer, S. E. 2021. Revisiting lymphocyte clonality testing in feline B-cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 242: 110350.

Werner, J. A.; Woo, J. C.; Vernau, W.; Graham, P. S.; Grahn, R. A.; Lyons, L. A.; Moore, P. F. 2005. Characterization of feline immunoglobulin heavy chain variable region genes for the molecular diagnosis of B-cell neoplasia. *Veterinary Pathology*. 42(5): 596–607.

Wolfesberger, B.; Skor, O.; Hammer, S. E.; Flickinger, I.; Kleiter, M.; Rütgen, B. C.; Schwendenwein, I.; Tichy, A.; Hittmair, K. M.; Degasperi, B.; Fuchs-Baumgartinger, A. 2017. Does categorisation of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats?. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 19(8): 897–906.

Wolfesberger, B.; Fuchs-Baumgartinger, A.; Greß, V.; Hammer, S. E.; Gradner, G.; Knödl, K.; Tichy, A.; Rütgen, B. C.; Beham-Schmid, C. 2018. World Health Organisation Classification of Lymphoid Tumours in Veterinary and Human Medicine: A Comparative Evaluation of Gastrointestinal Lymphomas in 61 Cats. *Journal of Comparative Pathology*. 159: 1–10.