



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

MONOGRAFÍA

**Actualización del Protocolo para el
Tratamiento del Linfoma Difuso de Células B Grandes,
la Forma más Recurrente del Linfoma Canino**

Camila Constanza Salfate Tapia

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

PROFESOR GUÍA: LORENA ANDREA AGUILAR GUZMÁN

Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2022



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

MONOGRAFÍA

**Actualización del Protocolo para el Tratamiento de
la Forma más Recurrente del Linfoma Canino**

Camila Constanza Salfate Tapia

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

FIRMA

PROFESOR GUÍA: LORENA AGUILAR GUZMÁN

PROFESOR CORRECTOR: FEDERICO CIFUENTES

PROFESOR CORRECTOR: CRISTIAN TORRES

SANTIAGO, CHILE
2022

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	7
Abstract.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
Generalidades	11
Epidemiología.....	11
Etiología	12
Factores ambientales	12
Factores moleculares y genéticos	12
Factores infecciosos	14
Diagnóstico.....	15
Examen físico.....	15
Hemograma (+frotis).....	16
Perfil bioquímico.....	16
Imágenes: Radiografía Torácica- Abdominal y Ecografía Abdominal.....	17
Citología.....	18
Histopatología	18
Inmunofenotipificación	19
Citometría de Flujo (CF).....	19
PCR para el reordenamiento de receptor de antígeno (PARR) – ensayo de clonalidad.....	20
Clasificación	20
Clasificación anatómica	22
Clasificación con enfoque histológico	23
Tratamiento.....	24
Quimioterapia.....	25
Inmunoterapia.....	27
Pronóstico	29

OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
MATERIALES	32
Estrategia de búsqueda	32
Selección de estudios	32
MÉTODOS	33
RESULTADOS	35
Revisión sistemática de las publicaciones disponibles.....	35
Protocolo terapéutico	69
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXO	97

Índice de Tablas

Tabla 1: Características citológicas para evaluar el grado de la neoplasia de acuerdo con la OMS (Modificada de Valli <i>et al.</i> , 2011).....	18
Tabla 2: Clasificación del grado de diseño experimental de los artículos incluidos en la revisión sistemática, para el tratamiento de cL (Modificado de Oxford Centre for Evidence-Based Medicine, 2011).....	34
Tabla 3: Valoración de los artículos científicos seleccionados en base a su grado de diseño experimental.	38
Tabla 4: Identificación de las revistas científicas y su factor de impacto, para los artículos seleccionados en este estudio, en conjunto de su clasificación del GDE.	39
Tabla 5: Resumen de los tratamientos aplicados para cL, que involucraban protocolos multimodales, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.	43
Tabla 6: Resumen de los tratamientos para cL, basados en un solo medicamento, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.....	50
Tabla 7: Frecuencia de utilización de los fármacos quimioterápicos, según el número de artículos que los uso en su estudio.	52
Tabla 8: Caracterización de los fármacos utilizados en protocolos quimioterápicos, ordenados de mayor a menor según su mención en la literatura revisada.....	56
Tabla 9: Información considerada para elaborar un protocolo terapéutico para DLBCL...	64

Índice de Figuras

Figura 1: El enfoque histológico hacia la clasificación del linfoma ganglionar canino.	24
Figura 2: Diagrama de flujo que indica las etapas de selección de los artículos científicos incluidos en el presente estudio, de acuerdo con la metodología de revisión bibliográfica sistemática PRISMA.....	36
Figura 3: Número de artículos científicos según año de publicación.	37
Figura 4: Protocolo CHOP para el tratamiento de linfoma DLBCL.....	70
Figura 5: Propuesta de tratamiento inicial: CHOP + vacuna HSPPC – HA.	71

RESUMEN

El linfoma es uno de los tumores malignos más comunes en el perro y corresponde a una proliferación de células linfoides, que afectan principalmente a los linfonodos u órganos sólidos. No es una enfermedad única, puesto que está descrita en diferentes presentaciones clínicas y subtipos histológicos. Sin embargo, la mayoría de los perros presentan linfadenopatía generalizada (forma multicéntrica), de grado intermedio a alto (caracterización histológica) y más frecuentemente de linfocitos B. El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), es de los linfomas caninos (cL) de mayor incidencia.

Del buen diagnóstico depende la selección correcta del tratamiento más idóneo para el paciente. La quimioterapia sistémica hasta ahora es el tratamiento de elección con resultados que varían según el protocolo utilizado. Una de las principales preocupaciones de este tipo de tratamiento son los efectos secundarios y la resistencia a las drogas seleccionadas. Por estas razones es importante la actualización constante de las nuevas estrategias terapéuticas, que se sigan desarrollando en esta área, las que buscan mejorar los tiempos de respuesta, la duración de la respuesta, disminución de efectos adversos.

Esta revisión destaca las opciones terapéuticas disponibles para DLBCL, donde observamos que a lo largo del tiempo se ha mantenido CHOP como protocolo de elección para terapia de inicio (primer abordaje terapéutico de la neoplasia), ya que proporciona buenos resultados de remisión completa y tiempo de supervivencia, aunque es frecuente la recidiva. La mayoría de los estudios busca mejorar la duración del protocolo, dosis, frecuencia de la administración de las drogas, así como terapias complementarias, como la inmunoterapia, o nuevas drogas, como la Rabacfosadina. Otro enfoque de investigación ha sido el estudio de nuevos protocolos de rescate (abordaje terapéutico post recidiva), que logre obtener buenos porcentajes de remisión.

Tras realizar la revisión sistemática, nuestra propuesta terapéutica inicial para abordar el DLBCL es una quimioterapia CHOP de 19 semanas, en conjunto con una vacuna autóloga de células del linfoma del mismo paciente (inmunoterapia); y como protocolo de rescate proponemos utilizar Lomustina, L-Asparaginasa y prednisona, o un esquema terapéutico que utilice Rabacfosadina, aunque está aún no está disponible en Chile.

Palabras Claves: linfoma canino DLBCL, tratamiento linfoma canino, tratamiento linfoma canino DLBCL, estudio clínico linfoma canino, ensayo clínico linfoma canino.

Abstract

Lymphoma is the most common malignant tumor in dogs and corresponds to a decrease in lymphoid cells, which descend mainly from the lymph nodes or solid organs. It is not a unique disease since it is described in different clinical presentations and histological subtypes. However, the generalized lymphadenopathy in a multicentric form is the most frequent presentation, in grades that varies from intermediate to high (histological characterization) and constituted by B lymphocytes. Diffuse lymphoma Large B-cell (DLBCL) is one of the canine lymphomas (cL) with the highest incidence.

The correct selection of the most appropriate treatment for the disease depends on a good diagnosis. Systemic chemotherapy so far is the treatment of choice with results that vary according to the protocol used. One of the main concerns of this type of treatment are the secondary effects and the resistance to the selected drugs. For these reasons it is important to constantly update therapeutic strategies, which continue to be developed in this area. They seek to improve response times, response duration and decrease adverse effects.

This review highlights the therapeutic options available for DLBCL, where we observe that over time CHOP has been maintained as a protocol for choice for initial therapy (first therapeutic approach to neoplasia), since provides good results of complete remission (CR) and survival time, although recurrence is common. Most studies seek to improve the duration of the protocol, dose, frequency of drug administration, as well as complementary therapies, such as immunotherapy, or new drugs, such as Rabacfosadine. Another research approach has been the study of new protocols for rescue (post recurrence therapeutic approach), which manage to obtain good percentages of remission.

After carrying out the systematic review, our initial therapeutic proposal to address the DLBCL is a 19-week CHOP chemotherapy, in combination with a vaccine autologous cells from the patient with the same lymphoma (immunotherapy); and as rescue protocol we propose to use Lomustine, L-Asparaginase and Prednisone, or a therapeutic scheme with Rabacfosadine, although it is not yet available in Chile.

Keywords: DLBCL canine lymphoma, canine lymphoma treatment, treatment canine lymphoma DLBCL, canine lymphoma clinical study, lymphoma clinical trial canine.

INTRODUCCIÓN

Los avances en la medicina veterinaria, así como la mayor concientización de los tutores por la salud de sus mascotas han propiciado un aumento en el diagnóstico temprano y oportuno de algunas patologías, como las neoplasias, y con ello una mayor esperanza de vida de sus animales.

El linfoma es un tumor maligno linfoide que se origina en órganos sólidos como los nódulos linfáticos, el hígado y el bazo, sin embargo, también pueden surgir de tejidos no linfoides. Se considera una enfermedad severa, progresiva y fatal.

En el caso de los caninos, se presenta con mayor frecuencia en individuos de edad media a avanzada, y se considera de tipo multifactorial, ya que no se ha establecido una causa definitiva, pero se proponen posibles factores genéticos, ambientales o infecciosos.

La clasificación del linfoma canino (cL) se basa en su localización anatómica (multicéntrico, mediastínico, alimentario y extranodal), además se ha empleado un sistema de clasificación, diseñado por la OMS, que permite tener una mejor categorización del linfoma basado en sus características histopatológicas e inmunofenotipo.

De esta manera la estadificación del cL se basa en la exploración física del animal y en los datos obtenidos en los métodos citológicos, histopatológicos o moleculares, además de los exámenes complementarios de laboratorio y por imágenes, como la radiografía y la ecografía, en donde se observarán diferentes alteraciones dependiendo de su presentación. Todo lo anterior permite finalmente la elección del tratamiento y determinar el pronóstico del paciente.

En cuanto al tratamiento, existen numerosos protocolos quimioterápicos, donde destaca CHOP, y otros métodos terapéuticos que incluyen la radioterapia, inmunoterapia, entre otros, con el fin de alcanzar la remisión del tumor, dándole un mayor tiempo de supervivencia y calidad de vida al paciente. Las recidivas son frecuentes y requieren de terapias adicionales o de rescate, ojalá con drogas diferentes a las usadas en el protocolo de inicio, lo que permitiría alcanzar la remisión nuevamente en una o más ocasiones, pero el porcentaje de pacientes que alcanzan una nueva remisión disminuye con cada ciclo.

Considerando que la población canina aumenta cada vez más y teniendo en cuenta que esta neoplasia es una enfermedad de presentación frecuente en la clínica diaria, esta monografía pretende colaborar con estudiantes y profesionales de medicina veterinaria, aportando el material reunido como un método de ayuda en el conocimiento de cL contribuyendo de esta manera a una mejor calidad de vida de los pacientes.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Generalidades

Linfoma es el término genérico que abarca varios subtipos de malignidades (Aresu *et al.*, 2015), y se define como una proliferación clonal de células linfoides malignas que primariamente surgen de nódulos linfáticos u órganos viscerales sólidos, como el hígado o bazo, sin embargo, pueden crecer en cualquier tejido corporal. Su presentación clínica, etiológica y pronóstico son similares entre el linfoma canino (cL) y el linfoma no Hodgkin (LNH) de humanos (Zandvliet, 2016; Vail *et al.*, 2019)

Epidemiología

Según la literatura, el cL representa entre el 12 al 18 % de todas las neoplasias caninas (Sayag *et al.*, 2018; Vail *et al.*, 2019) y el 83 % de todas las neoplasias hematopoyéticas caninas (Vail *et al.*, 2019), sin embargo, es difícil de determinar la incidencia anual en ausencia de un registro nacional de tumores caninos, aunque está claro que representa una de las neoplasias más comunes. La incidencia anual estimada por diferentes autores oscila entre 13 a 114 por cada 100.000 perros (Zadvliet *et al.*, 2016; Sayag *et al.*, 2018; Vail *et al.*, 2019). Además, una revisión del Programa de Base de Datos de Medicina Veterinaria, de la Universidad de Purdue (Indiana, Estados Unidos), indicó que la frecuencia de perros que presentaron linfoma en 20 instituciones veterinarias aumentó de 0,75 % a 2,0 % del total de casos, y parece que la frecuencia sigue aumentando, situación similar a lo que ocurre en oncología humana.

El cL afecta a perros de todas las razas y edades (Valli *et al.*, 2011), y se estima que la tasa de incidencia sería de 1,5 por 100.000 para perros menores de 1 año, y de 84 por cada 100.000 perros de 10 a 11 años (Vail *et al.*, 2019). Las razas con mayor incidencia incluyen Boxer, Bullmastiff, Basset Hound, Golden Retriever, San Bernardo, Terrier Escoces, Pitbull, Pastor de Brie, Setter Irlandés, Rottweiler y Bulldog Francés e Inglés. Las razas de menor riesgo incluyen Dachshund y Pomerania (Vail *et al.*, 2019).

Etiología

Factores ambientales

En humanos se ha acumulado evidencia que implica a los herbicidas en el desarrollo de LNH, en particular al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), lo que también se ha sugerido en el caso del cL (Takashima-Uebelhoer *et al.*, 2012; Ruple *et al.*, 2017). En perros se mostró que al estar expuestos al césped dentro de los 7 días posteriores a la aplicación del herbicida estos tenían 50 veces más probabilidades de presentar niveles urinarios sobre 50 µg/L de 2,4-D (Reynold *et al.*, 1994). Por su parte, se informó que el riesgo de cL aumenta al doble con cuatro o más aplicaciones anuales de 2,4-D, sin embargo, estos resultados fueron objeto de críticas, y tres investigaciones de seguimiento, entre los años 1992 y 2002, no validaron este aumento de riesgo. A la fecha no hay estudios actualizados que lo asocien al cL (Vail *et al.*, 2019). Por su parte, un estudio epidemiológico más reciente, que investigó múltiples factores ambientales, mostró un mayor riesgo de cL con el uso de productos para el cuidado del césped, en particular pesticidas aplicados profesionalmente (Takashima-Uebelhoer *et al.*, 2012).

Un estudio ambiental de casos y controles realizado en Europa señaló que la residencia en áreas industriales y el uso de productos químicos (pinturas o solventes) aumentaron levemente el riesgo de desarrollar linfoma, sin embargo, no se encontró ningún vínculo con el uso de pesticidas (Gavazza *et al.*, 2001). Otra investigación que evaluaba la proximidad a los desechos ambientales, concluyó que esta situación es un indicador de riesgo, aunque no se establece cuantitativamente como factor de riesgo, por lo tanto, se requieren más investigaciones (Marconato *et al.*, 2009). Por otra parte, la exposición al humo del tabaco también estuvo implicada en un estudio veterinario donde apuntan a que la exposición de segunda y tercera mano (fumador pasivo) puede estar relacionado con índices de proliferación más altos, independiente del subtipo o grado del linfoma, aunque falta investigación al respecto (Pinello *et al.*, 2017).

Factores moleculares y genéticos

El cáncer es en gran medida una enfermedad genética asociada con la acumulación de mutaciones y reordenamientos del ADN, lo que da como resultado la activación de oncogenes y/o la desactivación de genes supresores de tumores (Hanahan y Weinberg, 2011).

Una variedad de factores agresores del ADN puede producir mutaciones oncogénicas, incluida la radiación ionizante, sustancias químicas genotóxicas, subproductos del metabolismo celular y daño espontáneo del ADN. La tasa de acumulación de daño genético "espontánea" no es suficiente para explicar completamente el alto riesgo de cáncer a lo largo de la vida, por lo que las alteraciones genéticas adquiridas o heredadas en la reparación oportuna del daño del ADN pueden significar una predisposición a esta enfermedad (Hanahan y Weinberg, 2011; Thamm *et al.*, 2013).

En oncología humana se han identificado muchos genes que contribuyen a la linfomagénesis. Los avances recientes en citogenética molecular han permitido investigaciones de aberraciones cromosómicas en perros con linfoma, lo que, sumado a la publicación del genoma canino, han llevado a avances para una mayor comprensión de las desregulaciones de la expresión génica que ocurren en el linfoma (Aresu *et al.*, 2018; Giannuzzi *et al.*, 2019; McDonald *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2020).

La alta tasa de linfoma en razas específicas y la propensión de algunas de ellas a desarrollar ciertos tipos de linfoma (por ejemplo, linfoma de células T en Boxers) sugieren una base genética aún poco conocida de la enfermedad (Smith *et al.*, 2020). Estudios previos han demostrado la capacidad de los perfiles de expresión genética para separar a los pacientes con cL en distintas subcategorías (Frantz *et al.*, 2013; Richards *et al.*, 2013), y han identificado algunas anomalías genéticas como las aberraciones cromosómicas y las mutaciones somáticas o de la línea germinal (Elvers *et al.*, 2015; Mudaliar *et al.*, 2013;). En particular, se destaca las mutaciones en el factor 3 asociado al factor de necrosis tumoral (TRAF3) y protección de los telómeros 1 (POT1). Así también se han identificado genes homólogos que sufren mutaciones en linfoma de células B, tanto en humano como en canino (Bushell *et al.*, 2015; Elvers *et al.*, 2015).

Según lo determinado por la secuenciación del genoma canino, se han identificado mutaciones somáticas asociadas específicamente al linfoma de células B (cBCL) (mutaciones en TRAF3 y POT1), en ciertas razas y no en perros con manifestación de otro subtipo, lo que sugiere que son importantes en la patogenia de cBCL. No ocurre lo mismo con el linfoma de células T, donde se ha visto poca asociación de mutaciones somáticas entre razas (Vail *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2020).

Dentro de las mutaciones somáticas asociadas al desarrollo del cL, es frecuente encontrar alteraciones o deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN, como se ha demostrado en la raza Golden Retriever, lo que no ocurre en los caninos de la misma raza sin cL o perros mestizos (Thamm *et al.*, 2013).

Los factores ambientales pueden desempeñar un papel en la carcinogénesis y un ejemplo de esto son los genotipos defectuosos de la enzima desintoxicante glutatión-S-transferasa (GST), y la GST theta 1 (GSTT1). Estas enzimas se encuentran expresadas en los cánceres humanos, así como en el 18 % de todos los casos de cL, lo que se traduce en una alteración del empalme del ARNm (Zandvliet *et al.*, 2016).

Las aberraciones cromosómicas también se han asociado con el pronóstico del cL. Un estudio en 61 perros con linfoma demostró una ventaja pronóstica en aquellos con trisomía del cromosoma 13 (25 % de los perros estudiados), los que mostraron un aumento en la duración de la primera remisión y el tiempo de supervivencia general (Vail *et al.*, 2019).

Finalmente, las ganancias de los cromosomas caninos 13 y 31 y la pérdida del cromosoma 14 se han documentado como las aberraciones más comunes (Vail *et al.*, 2019), y aunque parece ser un hallazgo constante en el cL, también se encontró en otras neoplasias, lo que sugiere su papel en la progresión general de los tumores (Zandvliet, *et al.* 2016).

Factores infecciosos

La hipótesis de que un retrovirus pueda estar involucrado en la patogenia del cL no ha sido confirmada. Se ha estudiado al virus de Epstein-Barr, un herpesvirus, sin embargo, no hubo asociación entre la detección serológica o molecular del virus y el desarrollo de linfoma (Vail *et al.*, 2019).

En humanos se señala una asociación directa entre *Helicobacter sp.* y el desarrollo del linfoma gástrico. Aunque esto no se ha demostrado definitivamente en caninos, hay evidencia de que infecciones con *Helicobacter sp.* en perros Beagle de laboratorio da como resultado la formación de folículos linfoides gástricos, lo que en humanos se considera un precursor del linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (Vail *et al.*, 2019).

Así también, se ha implicado que las alteraciones en la microbiota intestinal desempeñan un papel en la susceptibilidad a ciertos tumores, viéndose que la microbiota fecal de los perros con linfoma es significativamente diferente a la de los perros de grupos control, aunque aun no está clara la relación causa-efecto (Vail *et al.*, 2019).

Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico utilizados tanto para la identificación del linfoma como para la evaluación de su tratamiento son heterogéneos y pueden variar dentro de los países y las instituciones (Marconato *et al.*, 2016). Si bien diagnosticar el linfoma como una entidad general puede ser relativamente sencillo, describir los diferentes subtipos puede ser un desafío, que se debe enfrentar con las herramientas diagnósticas que estén disponibles, para así lograr una caracterización adecuada, lo que permitirá realizar un plan de tratamiento y pronóstico de la enfermedad (Aresu *et al.*, 2015; Pawlak *et al.*, 2016).

La evaluación de un frotis citopatológico obtenido por aspiración con aguja fina (PAAF) suele ser suficiente para llegar a una aproximación diagnóstica. Sin embargo, para llegar a un diagnóstico específico se requiere de una historia clínica completa, un examen clínico y pruebas complementarias como imagenología, hemograma y perfil bioquímico, además de un examen citopatológico o histopatológico de los nódulos linfáticos afectados o de la médula ósea (Pawlak *et al.*, 2016).

El diagnóstico clásico para cL se enfoca en las características morfológicas identificadas por citología y/o histopatología, pero en los últimos años, se han utilizado ensayos adicionales como la inmunofenotipificación por inmunocitoquímica (ICC), inmunohistoquímica (IHC), citometría de flujo (CF) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el reordenamiento del gen del receptor de antígeno clonal (PARR), y así, ayudar en su clasificación. Las pruebas de diagnóstico no son perfectamente sensibles ni específicas, por lo tanto, a menudo se utilizan múltiples ensayos en conjunto o en secuencia para mejorar la precisión del diagnóstico y ayudar con el pronóstico (Valli *et al.*, 2011).

Examen físico

Se debe realizar una exploración minuciosa de todos los nódulos linfáticos accesibles (submandibulares, preescapulares, axilares, inguinales y poplíteos), puesto que uno de los

signos clínicos más frecuentes es una linfadenopatía generalizada (Vail *et al.*, 2019). Cuando se evalúan los nódulos, debemos medirlos y registrarlos, porque posteriormente servirá para evaluar la respuesta al tratamiento. Se deben inspeccionar las mucosas en busca de palidez, ictericia, petequias o úlceras, como signos que nos pueden hacer sospechar de una posible anemia o trombocitopenia (Gavazza *et al.*, 2008). La palpación abdominal puede revelar organomegalia, engrosamiento de la pared intestinal (si es marcado) o linfadenopatía mesentérica. Otros hallazgos de un linfoma sería la presencia de una masa mediastínica y/o derrame pleural, sospechándose de este último tras la auscultación torácica. El examen ocular, incluida la evaluación del fondo de ojo, puede revelar anomalías como uveítis, hemorragia retiniana, infiltración ocular, glaucoma, entre otros, en aproximadamente un tercio a la mitad de los perros con linfoma (Gavazza *et al.*, 2008; Vail *et al.*, 2019).

Hemograma (+frotis)

La mayoría de los perros presentan una anemia moderada no regenerativa normocítica-normocrómica asociada a la enfermedad crónica (Gavazza *et al.*, 2008), la cual determina una disminución de la vida media de los globulos rojos, así como una menor disponibilidad de hierro para la renovación de estas células y una menor respuesta de la médula ósea a la eritropoyetina (Chikazawa y Dunning, 2016). Además, se pueden observar anomalías morfológicas en los eritrocitos, los que incluyen esquistocitos y acantocitos (Warry *et al.*, 2013).

Los recuentos de leucocitos son típicamente normales, aunque se ha descrito tanto leucocitosis como leucopenia. En la mayoría de los casos se registra un leucograma de tipo inflamatorio, el cual se caracteriza principalmente por la presencia de desviación a la izquierda en diferentes magnitudes (Gavazza *et al.*, 2008; Chikazawa y Dunning, 2016).

En relación con las plaquetas, se observa trombocitopenia en el 30 a 50 % de los casos, pero el sangrado rara vez es un problema clínico (Vail *et al.*, 2019).

Perfil bioquímico

Las anomalías bioquímicas séricas a menudo reflejan el sitio anatómico afectado, así como síndromes paraneoplásicos, como la hipercalcemia. Cuando se presenta esta alteración en los niveles del calcio con origen desconocido, el linfoma siempre debe considerarse prioritario en la lista de enfermedades diferenciales y deben realizarse pruebas diagnósticas dirigidas a esta posibilidad. Para esto, se deben obtener las concentraciones de calcio ionizado, ya que pueden aumentar incluso si la concentración de calcio total se encuentra dentro del intervalo de referencia. Además, la presencia de hipercalcemia puede servir como biomarcador de respuesta al tratamiento y recaída. Por otra parte, el aumento de las concentraciones de nitrógeno ureico y creatinina puede ocurrir como consecuencia de la infiltración tumoral del riñón, nefrosis hipercalcémica o azotemia prerrenal por deshidratación. De igual manera, los aumentos en las actividades enzimáticas específicas del hígado o en las concentraciones de bilirrubina pueden resultar de la infiltración del parénquima hepático. Finalmente, el aumento de las concentraciones de globulina sérica, generalmente monoclonal, ocurre con poca frecuencia, producto del linfoma de células B (Vail *et al.*, 2019).

Imágenes: Radiografía Torácica- Abdominal y Ecografía Abdominal

La evaluación de las radiografías torácicas y abdominales puede ser importante para determinar la extensión de la afección. Aproximadamente el 60 al 75 % de los perros con linfoma multicéntrico tienen anomalías en las radiografías torácicas, un tercio tiene evidencia de infiltrados pulmonares y dos tercios tienen linfadenopatía torácica (esternal y traqueobronquial) junto a ensanchamiento del mediastino craneal (Geyer *et al.*, 2010). Las radiografías abdominales evidencian el compromiso de los linfonodos ilíacos mediales (sublumbares) y/o mesentéricos, el bazo o el hígado en aproximadamente el 50 % de los casos. Pese a lo anterior, en la práctica clínica, para los casos típicos de linfoma multicéntrico canino, las imágenes se limitan a las radiografías torácicas ya que no hay diferencia en el pronóstico entre los perros con enfermedad en estadio III y IV (es decir, compromiso del hígado/bazo); sin embargo, la linfadenopatía mediastínica craneal sí tiene importancia pronóstica. Si hay signos clínicos atribuibles a la enfermedad abdominal, será necesaria una estadificación completa (ej., para la inclusión en un ensayo clínico), pero si la linfadenopatía

periférica no es parte de la presentación, no se justifican más estudios abdominales (Vail *et al.*, 2019).

La ecografía es una herramienta que permite la visualización de estructuras internas, pero además permite obtener muestras guiadas por ella, ayudando así en el diagnóstico de, por ejemplo, linfoma gastrointestinal o hepatoesplénico, o cuando se requiere una estadificación clínica completa (Vail *et al.*, 2019).

Citología

Actualmente, la citología por aspiración con aguja fina (FNA) de linfonodo se considera el principal método de diagnóstico para cL, ya que es de bajo costo y mínimamente invasivo (Marconato *et al.*, 2013a). Además, de ella se puede obtener información que permita caracterizar las células del linfoma (Tabla 1) (Valli *et al.*, 2011), sin embargo, tiene limitaciones como muestreo insuficiente o no representativo, mala preparación del frotis o interpretación errónea de la muestra (Kastl *et al.*, 2020). La información proporcionada por la citología en asociación con otras técnicas auxiliares sienta las bases para las decisiones terapéuticas en la mayoría de los casos (Regan *et al.*, 2013).

Tabla 1. Características citológicas para evaluar el grado de la neoplasia de acuerdo con la OMS (Modificada de Valli <i>et al.</i>, 2011)		
TAMAÑO CELULAR	ÍNDICE MITÓTICO	GRADO DE LINFOMA
Células pequeñas (1-1,5 veces el diámetro de un eritrocito)	Células pequeñas (1-1,5 veces el diámetro de un eritrocito)	Bajo grado
Células medianas (2-2,25 veces el diámetro de un eritrocito)	Células medianas (2-2,25 veces el diámetro de un eritrocito)	Alto grado
Células grandes (3 veces el diámetro de un eritrocito)	Células grandes (3 veces el diámetro de un eritrocito)	Alto grado

Histopatología

A pesar del uso generalizado de la citología, la evaluación histológica de la arquitectura nodular es un método que permite complementar la información y, por ejemplo, diferenciar

entre poblaciones linfoides reactivas y las neoplásicas, aunque no en todos los casos. La evaluación histopatológica tiene la ventaja de determinar el subtipo histológico exacto del linfoma (Kastl *et al.*, 2020).

Histológicamente, el cL se caracteriza en función de una serie de criterios morfológicos que incluyen el patrón de crecimiento, el tamaño nuclear, la morfología nuclear (patrón de cromatina, el número y la ubicación de los nucléolos), el índice mitótico y el inmunofenotipo (Vail *et al.*, 2019). El análisis de las muestras tisulares teñidas con hematoxilina y eosina por sí sola, no determina si el cL es de origen de células B o T, lo que es de gran importancia pronóstica para los pacientes. Estas limitaciones se abordan con inmunofenotipificación y PARR (Burkhard y Bienzle, 2015; Kastl *et al.*, 2020).

Inmunofenotipificación

La inmunofenotipificación se refiere al uso de anticuerpos para detectar proteínas expresadas por linfocitos neoplásicos. Es importante destacar que la inmunofenotipificación no se utiliza actualmente como reemplazo de la evaluación histológica y / o citológica, sino que se reserva como una herramienta de diagnóstico adjunta después de un diagnóstico histológico o citológico, en el mismo tipo de muestra. La inmunofenotipificación determina si un linfoma es de origen de células B o T o si están presentes expresiones de proteínas aberrantes (Vail *et al.*, 2019; Kastl *et al.*, 2020).

Los marcadores más usados para células B son CD20, CD21 o CD79a, mientras que los marcadores de células T son CD5, CD3, CD4 y CD8 (Kastl *et al.*, 2020).

Citometría de Flujo (CF)

La CF es una herramienta muy útil para la inmunofenotipificación de diferentes tipos de leucocitos y para refinar el diagnóstico de los subtipos específicos de linfoma (Martini *et al.*, 2015; Pawlak *et al.*, 2016; Seelig *et al.*, 2014), así como para evaluar la enfermedad residual después del tratamiento, usado principalmente en estudios clínicos (Aresu *et al.*, 2014). Es un método muy preciso, limitado solo por la diversidad de anticuerpos y su disponibilidad.

Además de determinar el fenotipo de las células cancerosas, también facilita el diagnóstico de metástasis (Pawlak *et al.*, 2016; Comazzi *et al.*, 2018).

Lamentablemente, las instalaciones para CF veterinaria se limitan actualmente a unos pocos laboratorios de referencia, principalmente por razones económicas. La mayoría de estos laboratorios son parte de instituciones académicas y brindan servicios para hospitales veterinarios internos, laboratorios veterinarios externos y consultorios privados. Los requisitos específicos para la preparación y envío de muestras, también es un factor limitante para la utilización de esta técnica (Comazzi *et al.*, 2018).

PCR para el reordenamiento de receptor de antígeno (PARR) – ensayo de clonalidad

PARR permite diferenciar las poblaciones de linfocitos reactivos y neoplásicos, identificando la presencia de grupos de linfocitos clonales. En las poblaciones de linfocitos reactivos, cada linfocito tendrá un código genético único para su receptor de antígeno, ya sea un receptor de células T o B. Sin embargo, debido a que las poblaciones linfoides neoplásicas se derivan de clones de un solo tipo celular, la presencia de una sola secuencia de ADN del receptor de antígeno respaldará un diagnóstico de linfoma (Aresu *et al.*, 2014; Kastl *et al.*, 2020).

PARR tiene algunas limitaciones importantes. En primer lugar, debe disponerse de una cantidad suficiente de ADN, que sea representativo de toda la población linfoide a fin de evitar resultados falsos positivos o falsos negativos. También se han reportado falsos positivos en casos de erliquiosis canina y tumores de origen no linfoide (Waugh *et al.*, 2016; Kastl *et al.*, 2020).

Clasificación

La clasificación de las neoplasias linfoides no es una tarea sencilla, por lo que especialmente en los últimos años, los criterios de clasificación han ido evolucionando. Se requiere una correcta clasificación de una lesión para determinar su correcto abordaje terapéutico y pronóstico. Gran parte de la información disponible actualmente sobre cL ha tenido su origen en la patología y la clasificación de los linfomas humanos, demostrando una alta correlación

entre ellos, tanto para los tipos de linfoma como para su comportamiento. Esta correlación no está tan clara en otras especies (Ponce *et al.*, 2010).

En el pasado, para clasificar el cL los patólogos veterinarios han utilizado las clasificaciones que se desarrollaron para el LNH en humanos. Mientras que los primeros sistemas de clasificación se basaban enteramente en las características morfológicas de los linfocitos malignos, la capacidad de diferenciar las células inmunofenotípicamente llevó a una revisión de los sistemas de clasificación históricos. La clasificación Rappaport de 1966, revisado por Valli y cols. en el 2011, representa uno de los primeros sistemas de clasificación aplicados al cL (Valli *et al.*, 2011; De Leval y Jaffe, 2020).

Con el conocimiento cada vez mayor de los aspectos inmunológicos, una mejor comprensión de la maduración y diferenciación de las células linfoides y el avance de la quimioterapia, se han desarrollado nuevos sistemas de clasificación. Así fue como se publicaron casi simultáneamente el sistema de Lukes-Collins en América del Norte y el de Kiel en Europa. Ambos sistemas se basaron en conceptos inmunológicos y solo difieren en la posición de los centriolos dentro de la línea de maduración en cada clasificación. Dada esta pequeña diferencia, la traducción de una a otra clasificación es posible, prevaleciendo en el tiempo la clasificación de Kiel, la que se adaptó fácilmente al cL (Valli *et al.*, 2011; Vail *et al.*, 2019).

Para evitar una mayor confusión y en un intento por unificar las clasificaciones europea y norteamericana, el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU inició un estudio multiinstitucional de 1.400 casos publicado como *Working Formulation* (WF), que representó un sistema de traducción para las clasificaciones existentes del LNH humano. La WF se orientó principalmente al resultado clínico y menos a los criterios celulares. Con el paso de los años y a medida que se describían nuevas entidades se hicieron más evidentes las deficiencias sobre este método. La WF se volvió ampliamente utilizada en América del Norte, mientras que lo mismo ocurrió con el sistema de Kiel en Europa, tanto para humanos como para animales (Valli *et al.*, 2011; De Leval y Jaffe, 2020).

La clasificación original de Kiel fue revisada y una versión "actualizada" demostró ser aplicable al cL. Esta clasificación se limitó a la patología ganglionar y los avances en inmunología e histoquímica indicaron la necesidad de actualizar todos los sistemas anteriores (Sayag *et al.*, 2018). Esto motivó la formación del Grupo de Estudio Internacional de

Linfomas (ILSG), el que propuso una clasificación Revisada Europeo-Americana de neoplasias Linfoides (REAL) (Valli *et al.*, 2011).

Las particularidades de la propuesta del ILSG fueron que las neoplasias fueron identificadas como enfermedades y no como tipos de células, con los criterios diagnósticos que incluían toda la información relevante: morfología y linaje celular, así como la topografía y biología general de cada neoplasia que la definía como una entidad de enfermedad específica. El sistema REAL se adoptó prácticamente intacto como sistema de clasificación revisado de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ponce *et al.*, 2010; Valli *et al.*, 2011).

Esta clasificación proporcionó un sistema de categorización de las neoplasias linfoides según el nivel de maduración celular, lo que también proporcionó un indicador pronóstico. Este sistema fue probado por un grupo de médicos patólogos que revisaron un gran grupo de casos, discutiendo cualquier disparidad en la interpretación, logrando un alto grado de consenso (Valli *et al.*, 2013). Posteriormente, un grupo de 19 veterinarios patólogos generales altamente calificados clasificaron 300 casos de cL, asesorados por 3 hematopatólogos veterinarios, utilizando los criterios de la OMS. Este grupo de patólogos logró una alta tasa de precisión (83 %) de clasificación en los 300 casos individuales, sin ninguna discusión grupal de seguimiento. Este estudio concluyó que la clasificación de la OMS de 2001 puede ser aplicada con precisión a los cL por patólogos con experiencia, no necesariamente especialistas en hematopatología (Valli *et al.*, 2013).

La clasificación de la OMS de 2001 de tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides fue actualizada en 2008, y revisada en 2017, con un enfoque en humanos, lo que resulta en un número creciente de entidades y cantidad de información (Leval y Jaffe, 2020).

Clasificación anatómica

Anatómicamente, el linfoma se define como multicéntrico, alimentario, mediastínico o extraganglionar (Burkhard y Bienzle, 2015; Valli *et al.*, 2011), siendo el linfoma multicéntrico entre el 80 al 85 % de los casos notificados (Vail *et al.*, 2019).

La presentación *multicéntrica* se caracteriza por linfadenopatía generalizada y afectación hepática, esplénica y/o de médula ósea; la *mediastínica* aparece linfadenopatía mediastínica,

con o sin afectación de la médula ósea; en la *digestiva* se produce infiltración gastrointestinal aislada, difusa o multifocal, con o sin linfadenopatía intraabdominal; y la *extranodal* que afecta cualquier órgano o tejido, por ejemplo: cutáneo, renal, ocular, etc. (Zandvliet, 2016).

Como ya se mencionó, el 80 % de los pacientes caninos con linfoma desarrollan la forma multicéntrica, y las localizaciones digestivas (aproximadamente 7 %), mediastínica (3 %), y extranodal se describen con menor frecuencia (Childress *et al.*, 2016; Zandvliet, 2016)

La mayoría de los linfomas multicéntricos están causados por linfocitos B, los cuales al aumentar de tamaño obstruyen el drenaje linfático que ocasiona edema y dificultad respiratoria. El 20 % de casos de los caninos presentan hipercalcemia y una menor cantidad muestra alteraciones hemodinámicas, tromboembolismo, lesiones oculares (desprendimiento de retina, vasos sanguíneos tortuosos), signos neurológicos e infecciones (Zandvliet, 2016).

Clasificación con enfoque histológico

La validación y el uso del esquema de la OMS para clasificar el cL contribuyó a una comparación precisa entre diferentes subtipos de linfoma en estudios clínicos, eliminando el sesgo previo asociado con la inclusión de histotipos generalistas.

La variante histomorfológica más común de cL es el DLBCL (Burkhard y Bienzle, 2015; Ponce *et al.*, 2010), que afecta a los perros y representa hasta el 47,8 % de todos los linfomas de células B (Henriques *et al.*, 2021), por lo que será nuestro enfoque para el desarrollo de este trabajo.

La figura 1, representa un enfoque histológico general para la clasificación de varios subtipos de cL. En teoría, esto debería ayudar a adaptar mejor los protocolos de tratamiento, una mejor correlación del pronóstico con el subtipo y mejores capacidades comparativas de conjuntos de datos con resultados correlacionados.

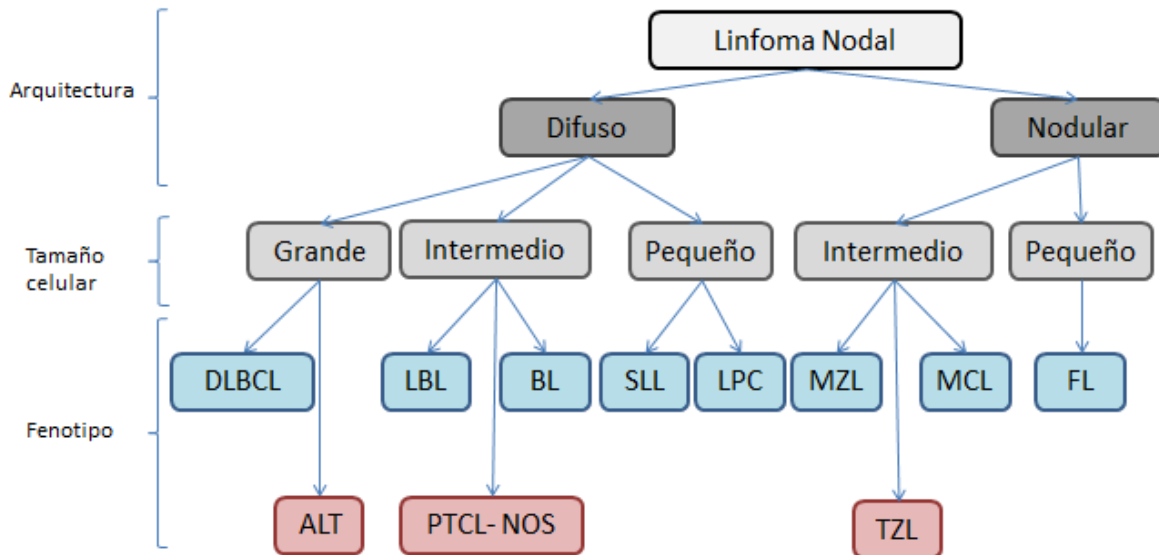


Figura 1: El enfoque histológico hacia la clasificación del linfoma ganglionar canino. Usando secciones de nódulos linfáticos obtenidos por escisión, el linfoma se divide inicialmente en formas difusas o nodulares de la enfermedad. A continuación, utilizando un glóbulo rojo o un linfocito pequeño como guía comparativa, la población neoplásica se divide en formas grandes, pequeñas e intermedias de la enfermedad. Finalmente, utilizando el conocimiento de características celulares y nucleares adicionales, incluida la tasa mitótica y el inmunofenotipo (células B, recuadros azules; células T, recuadros rojos), se establece un diagnóstico final. ALT, linfoma anaplásico de células T de células grandes; BL, linfoma de Burkitt; DLBCL, linfoma difuso de células B grandes; LF, linfoma folicular; LBL, linfoma linfoblástico; LPC, linfoma linfoplasmacitoide; LCM, linfoma de células del manto; LZM, linfoma de la zona marginal; PTCL, NOS, linfoma periférico de células T, no especificado de otra manera; SLL, linfoma de linfocitos pequeños; TZL, linfoma de la zona T (Adaptado de Vail et al., 2019).

Tratamiento

El enfoque terapéutico para un paciente con linfoma está determinado por el estadio (I a V), tipo celular (T o B), y subestadio de la enfermedad como sistémico o no sistémico (a o b), la presencia o ausencia de enfermedad paraneoplásica, el estado fisiológico general del paciente, el compromiso del tutor y su nivel de aceptación con respecto a la probabilidad de éxito relacionado con el tratamiento y/o efectos secundarios. Sin tratamiento, la mayoría de los perros con linfoma de grado intermedio o alto morirán a causa de su enfermedad dentro de las 4 a 6 semanas posteriores al diagnóstico, aunque existe una variabilidad significativa (Vail et al., 2019).

Con pocas excepciones, el cL se considera una enfermedad sistémica y, por lo tanto, requiere una terapia sistémica para lograr remisión y prolongar la supervivencia. La mayoría de los

linfomas multicéntricos caninos son de grado intermedio a alto y, actualmente, la caracterización histológica e inmunofenotípica no juega un papel tan importante en la determinación del protocolo de tratamiento inicial, a menos que se confirme un diagnóstico de linfoma indolente o de bajo grado. Se espera que, en un futuro próximo, a medida que se adquiera más información clínica sobre la importancia de las diversas subclasificaciones del cL, puedan estar disponibles enfoques terapéuticos más específicos (Zandvliet, 2016; Vail *et al.*, 2019).

La quimioterapia sistémica multiagente sigue siendo la terapia de elección para el cL. En general, los protocolos de quimioterapia combinada son superiores en eficacia a los protocolos de agente único. En casos raros en los que el linfoma se limita a un sitio (especialmente extraganglionar), el animal puede ser tratado con una modalidad local, como cirugía o radioterapia, siempre y cuando el tutor se comprometa a una reevaluación diligente (vigilancia activa), que permita detectar y documentar la progresión posterior de un cuadro sistémico, en caso de que ocurriera (Marconato *et al.*, 2014; Vail *et al.*, 2019).

Quimioterapia

Durante muchos años, la quimioterapia ha sido el estándar de oro para el tratamiento del DLBCL, y aunque la adición de nuevas drogas al panorama terapéutico ha mejorado el pronóstico en algunos casos, aproximadamente un tercio de los pacientes experimenta una recaída. El pronóstico para este subgrupo es pésimo, con una mediana de supervivencia de 6 meses o menos, lo que indica que existe un espectro clínico sensible al tratamiento estándar, dejando un porcentaje de los pacientes insensibles a este. Por lo tanto, queda un margen considerable para mejorar los resultados, buscando nuevas alternativas terapéuticas (Marconato *et al.*, 2014).

Los protocolos de tratamiento consisten principalmente en una quimioterapia de dosis alta (fase de inducción) y una quimioterapia prolongada en dosis bajas (fase de mantenimiento). En particular, una inducción de 6-8 semanas que podría ser ciclofosfamida (CTX), vincristina y prednisolona (COP) o CTX, vincristina, doxorubicina (DOX) y prednisona (CHOP) (Gavazza *et al.*, 2013).

El tratamiento CHOP induce una remisión temporal en aproximadamente el 85 % de los pacientes, pero rara vez es curable porque la tasa de supervivencia a dos años sigue siendo inferior al 20 % (Gavazza *et al.*, 2013). Esto se debe a que las terapias de rescate solo logran resultados en el 43 % de los pacientes (Cawley *et al.*, 2019).

Si bien los protocolos terapéuticos se han evaluado en varias investigaciones durante mucho tiempo, pocos estudios informan la tasa de respuesta y la toxicidad de los medicamentos individuales dentro de este protocolo (Harding *et al.*, 2018). Por ejemplo, según un informe, la vincristina es el fármaco con efecto gastrointestinal (GI) más tóxico, incluido en el protocolo CHOP. A una dosis estándar de 0,7 mg / m², puede inducir anorexia, vómitos y diarrea en hasta el 43 % de los perros (Harding *et al.*, 2018). Por su parte, la RAB puede utilizarse en el protocolo de quimioterapia tradicional o en el protocolo de quimioterapia metronómica; este último régimen implica la administración frecuente de agentes quimioterapéuticos en dosis muy bajas, cuyas ventajas incluyen EA mínimos y una rara posibilidad de desarrollar resistencia adquirida a los medicamentos. En este caso el metabolito de la CTX, la acroleína, puede irritar la vejiga urinaria y causar cistitis hemorrágica estéril (SHC) (Lee *et al.*, 2013).

Dado que los protocolos que contienen DOX producen resultados terapéuticos favorables, esta se utiliza en casi todos los protocolos. Sin embargo, es sabido que puede causar EA graves, que incluyen supresión de la médula ósea, gastroenteritis y, en particular, toxicidad cardíaca (Wang *et al.*, 2016).

Aunque se ha informado que el tratamiento previo con prednisona puede estar relacionado con un resultado desfavorable, el efecto de omitirla en el protocolo CHOP aun es un tema en investigación. Se sugiere que la omisión de este medicamento, que induce resistencia a múltiples fármacos, podría ser ventajoso y mejoraría la supervivencia de los pacientes tratados de esa manera. Sin embargo, Zandvliet y cols. 2013, informaron que la omisión de este corticosteroide en el protocolo CHOP, no tuvo un efecto significativo sobre la tasa de remisión o el tiempo de supervivencia libre de progresión en perros con linfomas. Pese a lo anterior, este estudio no señala su tamaño de muestra objetivo, por lo cual es posible que el ensayo no tuviera el poder estadístico suficiente para detectar diferencias entre los grupos. Además, hasta donde sabemos, este es el único informe que hasta la fecha describe el efecto

de la omisión de prednisona de la quimioterapia CHOP, y los resultados no han sido reproducidos por otros (Childress *et al.*, 2016).

Como ya hemos mencionado, los estudios apuntan a que los regímenes quimioterapéuticos son eficaces para el linfoma, pero la toxicidad es un gran inconveniente en estos protocolos. Con el objetivo de disminuir este efecto secundario, se han desarrollado estrategias alternativas para administrar medicamentos como liposomas. En este sentido, se describió el comportamiento de nanoemulsiones lipídicas no proteicas (LDE) fabricadas artificialmente con una composición similar a las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La asociación de agentes quimioterapéuticos con LDE disminuyó su toxicidad y aumentó su acción farmacológica (Lucas *et al.*, 2015).

Finalmente, los linfomas recidivantes son refractarios a tratamientos posteriores con el mismo régimen de quimioterapia inicial y pueden presentar resistencia cruzada a una amplia variedad de medicamentos contra el cáncer, lo que limita las alternativas para protocolos de rescate (Marconato *et al.*, 2014).

Inmunoterapia

Dentro de los efectos de la quimioterapia observados después de décadas de utilizarla, encontramos el debilitamiento y supresión del sistema inmunológico, por lo que el enfoque actual de las investigaciones apunta a protegerlo y estimularlo. Con este objetivo surge la inmunoterapia como una forma terapéutica oncológica más reciente y aún en desarrollo (Dias *et al.*, 2019).

La inmunoterapia intenta dirigir la capacidad protectora del sistema inmunológico hacia la eliminación de células malignas. Se definen dos formas de inmunoterapia, la pasiva que consiste, por ejemplo, en la transferencia de anticuerpos preformados (Baxter, 2014), y la activa que induce la inmunidad propia del paciente, por ejemplo, después de la exposición a un antígeno (Baxter, 2014; Park *et al.*, 2016). La inmunoterapia activa ofrece dos ventajas principales: primero, provoca una respuesta inmunitaria específica contra el tumor; segundo, establece potencialmente una inmunidad tumoral duradera a través de la capacidad de generar memoria, lo que disminuye la probabilidad de recaída. Sin embargo, una posible desventaja de la inmunoterapia activa es su dependencia del sistema inmunológico del paciente, que

puede estar comprometido o desregulado por el propio tumor. Es importante identificar la línea de biomarcadores que se pueden utilizar para inducir la respuesta al tratamiento (Marconato *et al*, 2015b).

La creciente evidencia sugiere que el sistema inmunológico puede manipularse de diferentes formas para reconocer y combatir las células cancerosas, para lo cual se están probando varias estrategias. La experiencia clínica de la inmunoterapia en el cL aún se encuentra en una etapa embrionaria (Marconato *et al.*, 2014). Una de las razones de esto es la limitada caracterización de su sistema inmunológico, lo cual juega un papel clave para seguir avanzando en estas herramientas terapéuticas (Dias *et al*, 2019).

El desarrollo de inmunoterapias contra el cL, como el uso de vacunas genética y/o autóloga, apuntan a combinaciones de diferentes modalidades de inmunización (boost/ refuerzo heterólogo), como un enfoque poderoso para inducir respuestas inmunes superiores y lograr una mayor eficacia clínica (Gavazza *et al*, 2013; Marconato *et al.*, 2015b).

El primer estudio data de hace dos décadas, donde Jeglum y cols., 1988, con una vacuna autóloga intralinfática administrada en combinación con quimioterapia prolongó significativamente la primera remisión en comparación con los perros que recibieron solo quimioterapia. Más tarde, Turek y cols., 2007, prueban una vacuna autóloga administrada a perros con linfoma de células B después de la quimioterapia, no mejorando el resultado en comparación con los perros tratados con placebo. Más recientemente, Peruzzi y cols. en 2010, realizaron un estudio clínico en 14 perros con linfoma de células B, usando en este caso una vacuna genética dirigida a la transcriptasa de la telomerasa en combinación con quimioterapia, lo que aumentó significativamente el tiempo de supervivencia en comparación con los 8 controles tratados solo con quimioterapia (Marconato *et al.*, 2014).

Un estudio más reciente, también dirigido a la transcriptasa inversa de la telomerasa canina (dTERT) y basada en la transferencia de genes utilizando un adenovirus, en conjunto con la quimioterapia (COP), fue capaz de inducir una fuerte respuesta inmune en perros con cL de células B. Más importante aún, el régimen de quimioterapia estándar no interfirió con los efectos de la inmunoterapia y la supervivencia de los perros aumentó significativamente (Gavazza *et al*, 2013).

Pronóstico

El pronóstico de los perros con linfoma es muy variable y depende de una amplia variedad de factores, ya sea específico de la condición clínica del paciente o su respuesta a la terapia. Aunque rara vez es curable (<10 % de los casos), ocurren las remisiones completas con una buena calidad de vida durante periodos variable libres de enfermedad y con una mayor supervivencia (Vail *et al.*, 2019). El pronóstico de las variantes del cL depende no solo del tipo de linfocito neoplásico, sino también de las características de las células, la ubicación y el estadio de la enfermedad (Valli *et al.*, 2011). Los factores que se identifican con mayor consistencia para establecer el pronóstico en el linfoma de nodulos periféricos son el inmunofenotipo y el estadio de la OMS (Vail *et al.*, 2019).

Los perros con linfoma en etapa I y II (un linfonodo o varios regionales afectados, respetivamente), tienen un mejor pronóstico que aquellos perros en etapas más avanzadas como etapa III, IV y V (afectación de linfonodos generalizados; hígado/ bazo; médula ósea, respetivamente) (Vail *et al.*, 2019). Por otro lado, aquellos perros que presentan un linfoma asociado con signología sistémica (subetapa b, OMS) tienen un pronóstico desfavorable en comparación con aquellos pacientes que presentan un linfoma sin signos sistémicos (subetapa a, OMS) (Valli *et al.*, 2011).

En el caso del DLBCL se han propuesto varios factores que se evalúan al momento del diagnóstico como posibles predictores pronósticos, entre los que se incluye el estadio y la etapa del linfoma (Marconato *et al.*, 2013), a los que se suman más recientemente, el perfil de expresión génica (Richards *et al.*, 2013) y las aberraciones del número de copias de genes (Aricò *et al.*, 2014). Aunque estos tipos de análisis actualmente no están ampliamente disponibles en el entorno clínico veterinario, se utilizan de forma rutinaria para el pronóstico y la toma de decisiones terapéuticas en los humanos, por lo que es probable que estén más disponibles para los veterinarios en la próxima década (Vail *et al.*, 2019).

Finalmente, hasta ahora la estadificación clínica y el pronóstico del linfoma, incluyendo el LNH humano y el DLBCL canino, no tienen en cuenta la importancia de la inmunovigilancia, la que incluye el rol de la inmunidad del hésped y el microambiente tumoral. Esto nos lleva a pensar que puede ser necesario desarrollar parámetros de laboratorio fáciles de medir que reflejen esta inmunovigilancia, para tener una nueva medida de pronóstico sólida (Marconato *et al.*, 2015b). Por esta razón, existe un interés creciente en el papel de los linfocitos y

monocitos en la patogenia del cáncer, especialmente en humanos. En particular, se considera que los linfocitos reflejan la homeostasis inmune del huésped, mientras que los monocitos se consideran marcadores del microambiente tumoral (Marconato *et al*, 2015a).

En humanos se ha informado que la relación entre el recuento absoluto de linfocitos (ALC) y el recuento absoluto de monocitos (AMC) ($ALC/AMC = LMR$) en el momento del diagnóstico puede ser un factor pronóstico para el resultado clínico (Sottnik *et al.*, 2010; Rambaldi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Presumimos que esta relación también se puede utilizar para predecir el pronóstico en perros con DLBCL recién diagnosticado, como se utilizó en un estudio mediante análisis de CF en pacientes que recibieron quimioterapia, aunque aún se requieren más estudios (Marconato *et al*, 2015a). Otro parámetro de laboratorio podría incluir el recuento de neutrófilos, como se realizó en un estudio retrospectivo de 26 perros con linfoma, donde se determinó que el aumento de AMC y el recuento de neutrófilos en el momento del diagnóstico se asocian con una disminución del intervalo libre de enfermedad (Perry *et al.*, 2011).

OBJETIVO GENERAL

Recopilar información actualizada sobre cL, principalmente en el DLBCL, enfocándonos en los métodos de tratamiento, para proponer un protocolo terapéutico renovado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Revisar las estrategias terapéuticas disponibles para cL, basado en la revisión sistemática de la información, priorizando el DLBCL.
2. Proponer un protocolo terapéutico actualizado para cL, considerando las opciones disponibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Estrategia de búsqueda

Este estudio retrospectivo se realizó mediante una revisión exhaustiva de la literatura, utilizando las bases de datos PubMed y ScienceDirect. Para esta búsqueda se utilizaron las siguientes palabras claves:

- linfoma canino DLBCL
- tratamiento linfoma canino
- tratamiento linfoma canino DLBCL
- estudio clínico linfoma canino
- ensayo clínico linfoma canino.

Los registros agregados adicionales fueron identificados por análisis de literatura y buscados manualmente desde las referencias de los artículos previamente seleccionados.

Selección de estudios

Como principales criterios de inclusión se consideraron

- Estudio original publicados en inglés en revista científica, con comité editorial.
- Tratamiento aplicado en perros (*Canis lupus familiaris*) con linfoma.
- Estudios clínicos de fase 3 y 4 para evaluar protocolos terapéuticos.
- Linfoma canino DLBCL diagnosticado a través de histopatológicos y/o exámenes complementarios (hemograma, perfil bioquímico, imágenes, etc.) que descartaran otros tipos de neoplasias.

Los principales criterios de exclusión consideraron que los estudios no contaran con suficiente información sobre los estudios clínicos, y que hayan sido desarrollados en otras especies. No se excluyeron los estudios que involucraban tanto a perros como a gatos, pero solo se consideraron los datos caninos. Se excluyeron publicaciones de antigüedad mayor a

10 años, a excepción de publicaciones con información de base y relevante para el desarrollo de esta monografía y que no se encontrara en otras publicaciones más recientes.

MÉTODOS

La elaboración de la monografía se realizó en base al cumplimiento de los objetivos específicos, para lo cual se recopiló, organizó, analizó y concluyó en torno a la información de los tratamientos reportados.

El proceso de selección de los artículos incluidos en este estudio se organizó en base al diagrama de flujo (Figura 2) del método PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* o reportes preferidos para revisiones sistemáticas o metaanálisis) (Moher *et al.*, 2009).

Una vez realizada la selección, se evaluaron los textos completos y para todos los estudios se extrajo el título, año de publicación, autores y los datos del ensayo clínico: n muestral, pruebas diagnósticas utilizadas, tratamientos aplicados (dosis/ duración tratamiento), tiempo de seguimiento, medición de resultados y conclusiones (Anexo 1).

Posteriormente, los artículos seleccionados se organizaron de acuerdo con su calificación según el grado de diseño experimental (GDE) (Tabla 2) (Moher *et al.*, 2009), para graduar la calidad de los manuscritos y posterior utilización para el diseño de los protocolos propuestos.

Tabla 2.- Clasificación del grado de diseño experimental de los artículos incluidos en la revisión sistemática, para el tratamiento de cL (Modificado de Oxford Centre for Evidence-Based Medicine, 2011).	
Grado de Diseño Experimental (GDE)	Categoría de estudios terapéuticos para el cL
I	Ensayos clínicos aleatorios, controlados, ciego o doble ciego, prospectivos
II	Ensayos clínicos aleatorios, controlados y prospectivos
III	Ensayos clínicos prospectivos
IV	Estudios retrospectivos
V	Reporte de caso individual, opinión de expertos

Este método de clasificación se basa en una publicación de la Universidad de Oxford, y corresponde a la graduación de la calidad de las publicaciones científicas, según el diseño experimental del estudio. Esta graduación luego fue comparada con el índice de impacto de las revistas que publicaron los artículos seleccionados, para ver si había una correlación entre ambos datos. Posteriormente, los estudios fueron agrupados según los diferentes protocolos terapéuticos utilizados, se registraron sus resultados para compararlos y tomar una decisión sobre la información relevante para generar y proponer un protocolo terapéutico para DLBCL, que incluyera la información proporcionada por aquellos artículos con graduaciones más altas.

RESULTADOS

Objetivo 1: Revisar las estrategias terapéuticas disponibles para cL, basado en la revisión sistemática de la información, priorizando el DLBCL.

Revisión sistemática de las publicaciones disponibles

La búsqueda de documentos en las bases de datos ScienceDirect y Pubmed, utilizando las palabras claves antes mencionadas, arrojó un total de 159 artículos, donde se aplicaron los filtros antes. Se aplicó un tamizaje o *screening* para eliminar aquellos títulos duplicados, quedando 117 artículos, de los cuales se eliminaron 44 por no estar relacionados directamente con el tema a abordar. Esto nos dio un total de 73 artículos que podían ser elegibles; sin embargo, al revisar más en profundidad se excluyeron 59 que no cumplían con los criterios. Algunos de estos artículos se desarrollaban en líneas celulares, estudios de fase 1 y 2, abordaban linfoma de células T o específicamente linfomas cutáneos/ gastrointestinales, o estaban enfocados en el pronóstico de la enfermedad. Quedando finalmente 14 artículos que estaban adecuadamente relacionados con el eje de este estudio, es decir, se incluyeron solo aquellos que evaluaban tratamientos para cL, principalmente enfocados en DLBCL.

Todo el proceso de selección de las publicaciones se encuentra resumido en el diagrama de flujo PRISMA que se presenta a continuación (Figura 2):

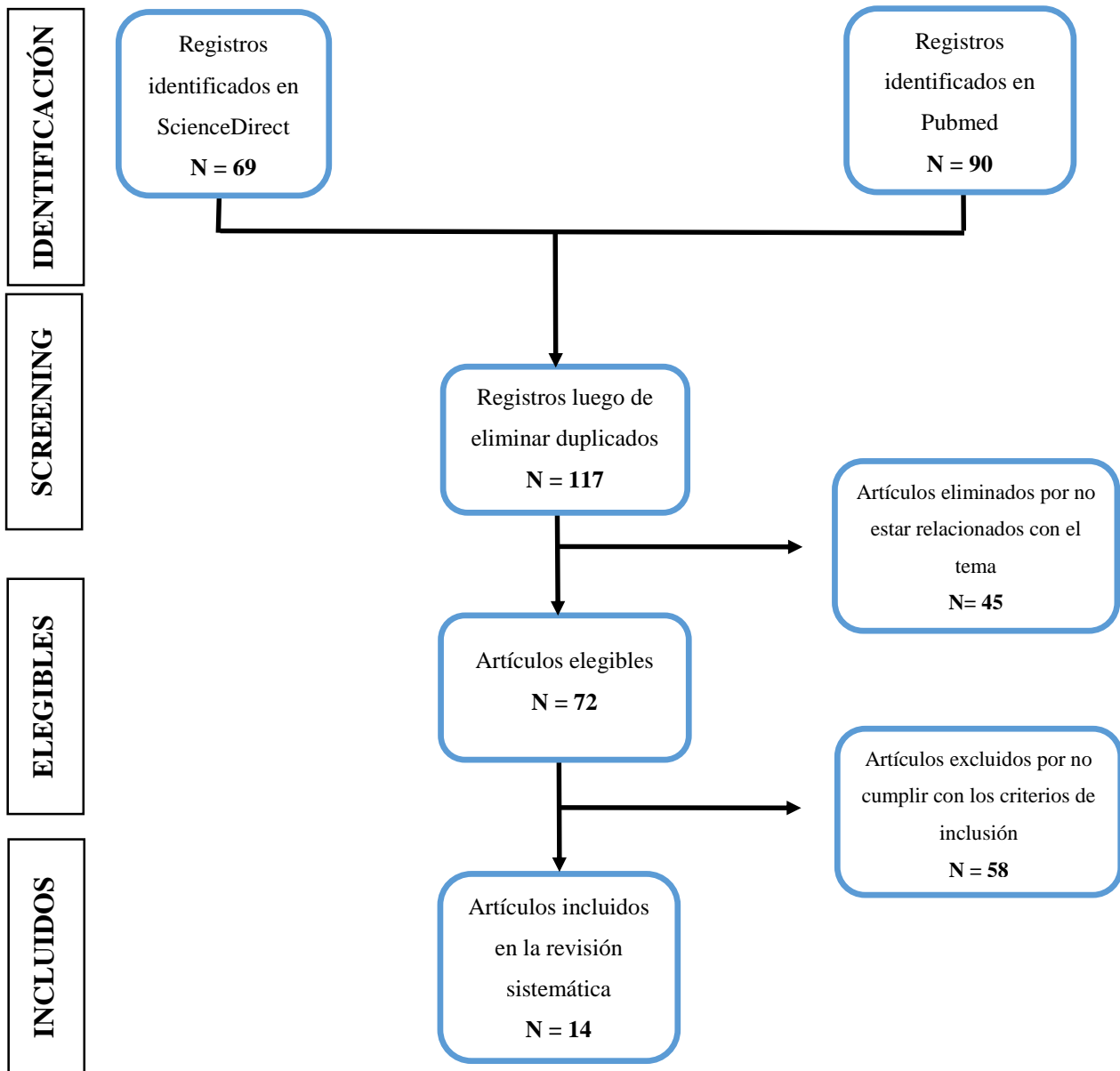


Figura 2: Diagrama de flujo que indica las etapas de selección de los artículos científicos incluidos en el presente estudio, de acuerdo con la metodología de revisión bibliográfica sistemática PRISMA.

En la Figura 3 se puede ver la distribución de los artículos seleccionados en función de los años de publicación, donde se observa que los estudios clínicos enfocados en la búsqueda de un tratamiento para el cL se extienden de forma relativamente homogénea en los últimos 10 años.

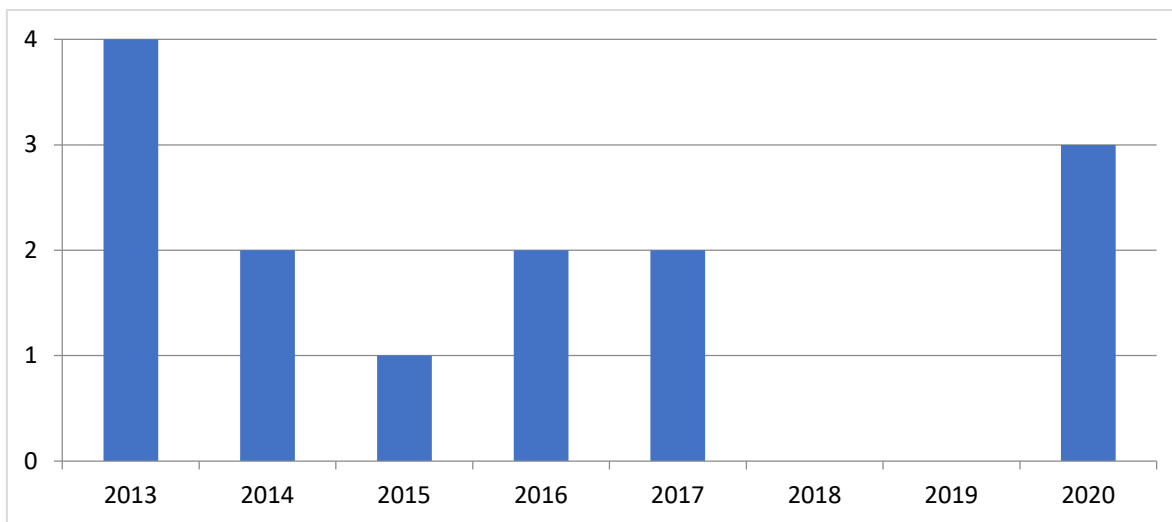


Figura 3: Número de artículos científicos según año de publicación.

En la Tabla 3, podemos observar la agrupación de los artículos según el GDE, donde encontramos que solo 1 artículo cumple con las máximas exigencias establecidas para nuestra revisión sistemática, es decir, presentan una alta calidad en cuanto a su diseño experimental. Por otro lado, la mayoría de los artículos restantes fueron calificados como grado II, lo que sigue siendo un muy buen diseño, ya que se diferencian del grado I solo en que no son estudios ciegos, esto al mismo tiempo nos dificulta el proceso de discriminación de la calidad de la información que ellos proporcionan.

Tabla 3.- Valoración de los artículos científicos seleccionados en base a su grado de diseño experimental.

Grado de Diseño Experimental (GDE)	Categoría de estudios terapéuticos para la cL	Número de artículos de cada categoría
I	Ensayos clínicos aleatorios, controlados, ciego o doble ciego, prospectivos.	1
II	Ensayos clínicos aleatorios, controlados, prospectivos.	9
III	Ensayos clínicos prospectivos.	2
IV	Estudios retrospectivos	2
V	Reporte de caso individual, opinión de expertos	0

Junto con el GDE evaluamos el índice de impacto de las revistas que publicaron los artículos seleccionados (Tabla 4). Acá podemos ver que la mayoría de las revistas tiene un impacto >1 (excepto una de 0,99), lo que en el caso de Marconato *et al.*, 2014 se correlaciona con el GDE, que fue calificado en grado I y sus índices de impacto es 12,531, y similar ocurre con Gavazza *et al.*, 2013 que tiene un GDE II y un impacto de 5,69. El resto de las publicaciones se mueve en rango amplio de índices de impacto, entre 1 y 3,6, siendo sus GDE entre II y IV.

Tabla 4.- Identificación de las revistas científicas y su factor de impacto, para los artículos seleccionados en este estudio, en conjunto de su clasificación del GDE.

Artículo Científico (autor, año)	Revista científica	Impacto	GDE
Gavazza et al., 2013	<i>Human Gene Therapy</i>	5,695	II
Higginbotham et al., 2013	<i>Journal of the American Animal Hospital Association</i>	0,99	III
Zandvliet et al., 2013	<i>The Veterinary Journal</i>	2,688	II
Lucas et al., 2013	<i>Veterinary and Comparative Oncology</i>	2,613	II
Marconato et al., 2014	<i>Clinical Cancer Reserch</i>	12,531	I
Parsons- Doherty et al., 2014	<i>The Canadian Veterinary Journal</i>	1,008	IV
Marconato et al., 2015	<i>Vaccine</i>	3,641	III
Childress et al., 2016	<i>Journal of the American Veterinary Medical Association</i>	1,160	II
Wang et al., 2016	<i>The Canadian Veterinary Journal</i>	1,008	II
Thamm et al., 2017	<i>Journal of veterinary internal medicine</i>	3,333	II
Saba et al., 2017	<i>Veterinary and Comparative Oncology</i>	2,613	II
Cawley et al., 2020	<i>Journal of veterinary internal medicine</i>	3,333	II
Lee et al., 2020	<i>Topics in Companion Animal Medicine</i>	1,631	IV
Saba et al., 2020	<i>Veterinary and Comparative Oncology</i>	2,613	II

Una vez seleccionados los artículos se procedió a su lectura en forma íntegra, se realizó un análisis exhaustivo de su información, comparándola entre ellos. Para esto se realizaron diferentes tablas que nos permitieron interpretar y seleccionar la información más idónea para proponer un protocolo terapéutico.

Para iniciar el análisis de los artículos seleccionados realizamos una tabla que resume y ordena la información de manera que fuera más accesible y permitiera su comparación. Esta tabla contiene las publicaciones ordenadas cronológicamente según su año de publicación, incluyendo además el título, autores y los datos del ensayo clínico: n muestral, pruebas diagnósticas utilizadas, tratamientos aplicados (dosis/ duración tratamiento), tiempo de seguimiento, medición de resultados y conclusiones. Finalmente, la tabla consideró la clasificación de la publicación según su GDE para graduar la calidad de los manuscritos. Dada la gran extensión de esta tabla, fue dejada como Anexo 1, ya que creemos importante tenerla disponible en caso de requerir su información.

A continuación, se confeccionaron dos tablas que resumen los tratamientos estudiados en dichos artículos, separados en terapias multimodales (Tabla 5) y monomodales (Tabla 6). Estas tablas resumen las conclusiones y las respuestas a los tratamientos estudiados, basándose principalmente en los criterios de evaluación de respuesta al tratamiento, según las sugerencias del *Veterinary Cooperative Oncology Group* (VCOG) (Vail *et al.*, 2010). Estos criterios incluyen la evaluación de los nódulos linfáticos periféricos para determinar la evolución de la enfermedad (tipo de respuesta) definiendo así si existe remisión completa (RC) o remisión parcial (RP), así como si existe enfermedad progresiva (EP) o estabilización de la enfermedad (SD, sigla en inglés). Además, incluye la evaluación de la duración de la respuesta al tratamiento a través de diferentes parámetros como, por ejemplo, tiempo de progresión (TTP, sigla en inglés) y supervivencia libre de enfermedad (LSS, sigla en inglés), entre otros. De esta manera la respuesta a los tratamientos estudiados fue evaluada con parámetros establecidos por el VCOG, los que se describen a continuación, según las definiciones encontradas en los trabajos seleccionados para nuestra revisión:

- **Remisión completa (RC):** reducción del 100 % en el tamaño de los nódulos linfáticos, evaluado mediante palpación (Higginbotham *et al.*, 2013); desaparición de todos los nódulos linfáticos periféricos medibles (es decir, volvieron a un tamaño considerado no patológico a juicio del evaluador) (Thamm *et al.*, 2017); o ausencia de una carga tumoral medible (Childress *et al.*, 2016).

- **Remisión Parcial (RP):** reducción de al menos un 30 % en la suma de los diámetros más amplios de los nódulos linfáticos periféricos medidos al comienzo (Childress *et al.*, 2016; Thamm *et al.*, 2017).
- **Enfermedad Progresiva (EP):** aumento > 20 % en la suma de los diámetros más amplios de los nódulos linfáticos periféricos medibles o la aparición de nuevas lesiones (Childress *et al.*, 2016; Thamm *et al.*, 2017). Para Higginbotham y cols. se estableció como el 50 % de aumento del tamaño de los nódulos linfáticos.
- **Enfermedad Estable (SD):** reducción < 30 % o un aumento < 20 % en la suma de los diámetros más amplios de los nódulos linfáticos periféricos medidos al comienzo del estudio (Thamm *et al.*, 2017). Por su parte, Childress y cols. la definen como la carga tumoral medible que no era ni remisión parcial ni enfermedad progresiva (Childress *et al.*, 2016).
- **Supervivencia General/Global (SG):** se calculó desde la fecha del primer tratamiento hasta que el perro murió espontáneamente o fue eutanasiado (Lucas *et al.*, 2013).
- **Supervivencia Específica del Linfoma (LSS):** intervalo entre el inicio del tratamiento y la muerte relacionada con el linfoma (es decir, todas las muertes por linfoma, incluida la eutanasia) (Aresu *et al.*, 2015).
- **Tiempo de Progresión (TTP):** intervalo entre el inicio del tratamiento y la EP (Aresu *et al.*, 2015).
- **Tasa de Respuesta Objetiva (ORR):** porcentaje de pacientes evaluables que experimentaron RC o RP como su mejor respuesta (Thamm *et al.*, 2017; Cawley *et al.*, 2020).
- **Intervalo Libre de Progresión (PFI):** este parametro presenta discrepancias en la definición según el autor. En algunas publicaciones se calculó desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la fecha de la EP (Thamm *et al.*, 2017; Cawley *et al.*, 2020), siendo esta la definición que en otros trabajos se le da a TTP. Por otro lado, Lucas *et al.* (2013) lo calculó desde el primer día en que se identificó la remisión hasta la recaída de los signos clínicos.

En la Tabla 5 podemos observar que la mayoría de los estudios buscan complementar las características terapéuticas de diferentes fármacos al combinar sus distintos mecanismos de acción, alcanzando en general mayor porcentaje de RC del linfoma al compararlas con los tratamientos monomodales. Es así como estos últimos (Tabla 6) no superan el 67 % de RC, en cambio los tratamientos combinados tienen RC entre 70 – 100 %. Si analizamos en más detalle la Tabla 5, podemos destacar que, por ejemplo, Zandvliet y cols. usan un protocolo CHOP de 18 a 21 semanas, cuyo tratamiento inicial registra RC del 75 % promedio, siendo mayor para los linfomas de células B (84 % frente a 43 %). En Marconato y cols. 2014, usaron un tratamiento CHOP de 20 semanas en combinación con una vacuna autóloga, logrando RC del 100 %; en comparación con el grupo control (CHOP + vacuna placebo), que alcanzó RC de un 71,4 %. Por otro lado, cuando se trata de tratamientos monomodales (Tabla 6) se destaca el protocolo realizado con DOX o RAB, donde Higginbotha en el 2013, prueba la DOX como agente único, administrada de forma intermitente como tratamiento para el cL de células B, alcanzando RC del 67 %. Por su parte, la RAB fue probada como agente único en 2 dosis diferentes, lográndose a 0,82 mg/kg una RC del 50 % vs. RC del 42% a una dosis de 1 mg/kg.

Tabla 5: Resumen de los tratamientos aplicados para cL, que involucraban protocolos multimodales, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.

Artículo	Tratamiento	GDE	Evaluación de la Respuesta	Tipo de Respuesta	Duración de la Respuesta	Conclusiones
Marconato <i>et al.</i> , 2014	Protocolo Inicial: L-ASP Vincristina CTX DOX Lomustina Prednisona + Vacuna HSPPC-HA o placebo	I	-Evaluación sistemática Oncológica: medición de NL (*) -Examen físico -Perfil bioquímico -Citología + CF (y de ser necesario PARR)	<u>G1: CHOP + vacuna:</u> -RC en el 100 % (12/12) <u>G2: CHOP + placebo:</u> -RC en el 71,4 % (5/7)	Mediana para los 19 perros, el TTP fue de 192 ds (media, 231 ds; rango, 19-648 ds). * TTP fue más largo en el grupo 1 vs. el grupo 2. -TTP del G1= 304 ds (media: 332 ds; rango: 154-648 ds) vs. 41 ds (media: 59 ds; rango: 19-140 ds) para G2. - 7/12 (58,3 %) del G1 recayeron, fueron tratados con quimioterapia de rescate y todos lograron una segunda remisión duradera (mediana: 128 ds; media: 135 ds; rango: 47-333 ds). - 3/7 (42,8 %) del G2 recayeron después del tratamiento inicial, recibiendo quimioterapia de rescate; sin embargo, ninguno logró una 2 ^{da} remisión duradera, ya que todos progresaron después de 28, 29 y 43 ds, respectivamente. La mediana de LSS para los 19 perros, fue de 342 ds (media 346 ds; rango, 20-663 ds). * La mediana de LSS fue más larga en el G1 vs. el G2 = G1 tiene mayor	-La viabilidad, buena tolerabilidad y potente actividad inmunológica de la vacunación autóloga probada, conduce a una mejora del TTP y LSS en perros con DLBCL. -Dado la semejanza del DLBCL espontáneo en perros con el DLBCL humano, la información adquirida podría aplicarse en pacientes humanos con cáncer.

Tabla 5: Resumen de los tratamientos aplicados para cL, que involucraban protocolos multimodales, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.

Artículo	Tratamiento	GDE	Evaluación de la Respuesta	Tipo de Respuesta	Duración de la Respuesta	Conclusiones
					probabilidad de vivir más tiempo vs. G2 que recibieron el placebo. - LSS del G1 fue de 505 ds (media: 468 ds) vs. 159 ds (media: 136 ds) para el G2.	
Parsons-Doherty <i>et al.</i> , 2014	Protocolo de Rescate: Dexametasona Actinomicina D Arabinósido de citosina Melfalán (Protocolo DMAC)	IV	-Evaluación sistemática de tumores medible. -EA: criterios de terminología común para eventos adversos del VCOG (VCOG - EA)	-RC = 16 % (13/82) -RP = 27 % (22/82) -Sin respuesta = 57 % (47/82)	- La mediana de la PFI global fue de 24 ds (rango: 2 a 303 ds).	-El protocolo DMAC usado aquí no se puede recomendar sobre otros protocolos de rescate para el tratamiento del linfoma recidivante en el perro, debido a los efectos adversos, el costo y la intensidad del tiempo del protocolo.
Childress <i>et al.</i> , 2016	Protocolo Inicial: L-ASP Vincristina CTX DOX con (L-CHOP) y sin (LCHO) Prednisona	II	-Medición nódulos linfáticos periféricos en base a los criterios VCOG	<u>Respuesta general:</u> -RC = 70 % (28/40) -RP = 30 % (12/40) <u>Grupo L-CHOP:</u> -RC = 72 % (13/18) -RP = 28 % (5/18) <u>Grupo L-CHO:</u> -RC = 68 % (15/22) -RP = 32 % (7/22)	-La mediana del PFI fue de 142,5 ds para los perros que recibieron L-CHO y de 292 ds para los perros que recibieron L-CHOP. -La MST para L-CHO fue de 255 ds, y L-CHOP fue de 387 ds; L-CHO se asoció con un mayor riesgo de muerte, en comparación con LCHOP	La exclusión de prednisona del protocolo L-CHOP no mejoró el tiempo de supervivencia y tiempo libre de progresión.
Gavazza <i>et al.</i> , 2013	Protocolo Inicial: Vincristina,	II	-Respuesta inmune por ELISPOT. -Expresión de dTERT se	<u>Protocolo Inicial:</u> Grupo VAC (vacuna + COP):	La SG fue de 76,1 sem para el grupo VAC, frente a 29,3 sem para el grupo CTR.	La vacuna Ad/DNA-EGT contra dTERT en combinación con quimioterapia COP es segura y prolonga

Tabla 5: Resumen de los tratamientos aplicados para cL, que involucraban protocolos multimodales, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.

Artículo	Tratamiento	GDE	Evaluación de la Respuesta	Tipo de Respuesta	Duración de la Respuesta	Conclusiones
	CTX, Prednisona Protocolo de Mantención: Clorambucil Melfalán Vincristina *Vacuna dTERT *DOX		cuantificó mediante PCR.	RC = 100 % (21/21) Grupo COP: RC = 100 % (21/21) <u>Protocolo Mantención:</u> * En grupo VAC; 90,5 % (19/21) mostraron una fuerte respuesta inmune, contra el componente proteico de la telomerasa canina.		significativamente la supervivencia de los pacientes caninos.
Lee <i>et al.</i> , 2020	Protocolo Inicial: CTX (en bolo o dosis divididas) DOX Vincristina Prednisolona	IV	-Citología o Histopatología -Medición nódulos periférico en base a los criterios VCOG	<u>Grupo dosis única:</u> -RC = 85,19 % (23/27) -RP = 3,79 % (1/27) -SD = 11,11 % (3/27) <u>Grupo dosis dividida:</u> -RC = 86,67 % (39/45) -RP = 11,11 % (5/45) -SD = 2,22 % (1/27)	<u>Grupo dosis única:</u> La mediana de PFI y SG fue de 268 y 475 ds, respectivamente. <u>Grupo dosis dividida:</u> La mediana de PFI y SG fue de 188 y 283 ds, respectivamente.	-No hubo diferencia significativa en la incidencia de SHC entre el grupo de dosis única y el grupo de dosis divididas de CTX. -La respuesta al tratamiento y el resultado clínico entre los 2 grupos de tratamiento con CTX no fueron significativamente diferentes.
Marconato <i>et al.</i> , 2015	Protocolo Inicial: L-ASP Vincristina CTX	III	-Medición de tumores sólidos. -Histopatológico	<u>G1: CHOP + placebo:</u> RC = 45 % (9/20) RP = 35 % (7/20) EP = 20 % (4/20)	-Para todos los perros, la mediana de TTP fue de 179 ds (rango, 1-533 ds). TTP fue significativamente más largo en el Grupo 2 que en el Grupo 1.	HSPPC-HA puede producir beneficios clínicos sin aumento de la toxicidad, mejorando la quimioterapia en perros con linfoma indolente avanzado.

Tabla 5: Resumen de los tratamientos aplicados para cL, que involucraban protocolos multimodales, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.

Artículo	Tratamiento	GDE	Evaluación de la Respuesta	Tipo de Respuesta	Duración de la Respuesta	Conclusiones
	DOX Lomustina Prednisona + Vacuna autologa			-La mediana del tiempo para obtener RC y PR fue de 12 ds (rango, 1-19 ds) y 9 ds (rango: 2-9 ds), respectivamente. <u>G2: CHOP + vacuna:</u> RC = 88 % (22/25) RP = 12 % (3/25) -La mediana del tiempo para obtener RC y PR fue de 3 ds (rango, 1 a 21 ds) y 2 ds (rango, 2 a 3 ds), respectivamente.	-La mediana de TTP para G2 (quimioinmunoterapia) fue de 209 ds (rango, 29 a 533 ds) v/s 85 ds (rango, 1 a 300 ds) para G1 (quimioterapia). -La mediana de la LSS general fue de 337 ds (rango, 5-1042 ds). -G1 tuvo una mediana de LSS de 200 ds (rango, 5-1042 ds). -G2 tuvo una mediana de LSS de 349 ds (rango, 81-816 ds). No hubo diferencia en LSS entre los grupos.	
Wang <i>et al.</i> , 2016	Protocolo Inicial: Grupo 1: CTX, DOX, Vincristina y Prednisolona (CHOP) Grupo 2: CTX, Mitoxantrona, Vincristina y Prednisolona (CMOP)	II	-Examen físico. -Medición nódulos periférico en base a los criterios VCOG -Hemograma -Ecocardiografía	<u>G1: CHOP:</u> RC = 81,8 % (18/22) RP = 9,1 % (2/22) <u>G2 CMOP:</u> RC = 77,3 % (17/22) RP = 13,6 % (3/22)	-No hubo diferencia entre los 2 grupos con respecto a la PFI y SG. <u>G1. grupo CHOP:</u> -PFI fue de 222 ds (rango, 185- 259 ds) -SG fue de 318 ds (rango, 215 a 421 ds) <u>G2. grupo CMOP:</u> -PFI fue de 162 ds (rango, 44 a 280 ds) -SG fue de 241 ds (rango, 121 a 363 ds)	El protocolo CMOP proporciona SLP, MST similares y causa menos efectos secundarios en comparación con el protocolo CHOP. Por lo tanto, el protocolo CMOP puede ser otra opción de tratamiento cL multicéntrico.

Tabla 5: Resumen de los tratamientos aplicados para cL, que involucraban protocolos multimodales, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.

Artículo	Tratamiento	GDE	Evaluación de la Respuesta	Tipo de Respuesta	Duración de la Respuesta	Conclusiones
Thamm <i>et al.</i> , 2017	Protocolo Inicial: RAB DOX	III	- Criterios de evaluación de respuesta del VCOG para linfoma de ganglio periférico en perros. -EA se identificaron a través del historial médico proporcionado por el propietario en cada visita.	La tasa de ORR fue del 84 % -RC = 68 % (34/50) -RP = 16 % (8/50) -SD = 10 % (5/50) -EP = 6 % (3/50)	-La mediana de PFI para todos los perros fue de 194 ds (rango, 7-435 + ds). -La mediana de PFI para aquellos perros que experimentaron RC fue de 216 ds (rango, 105-435 + ds) -La mediana de PFI para aquellos que experimentaron RP fue de 63 ds (rango, 42-124 ds). -La mediana de PFI para perros que experimentaron SD fue de 78 ds (rango 42-93 ds).	-El régimen alterno de RAB / DOX fue bien tolerado y resultó en PFI comparables a los observados después de los protocolos estándar basados en CHOP, con menos visitas de tratamiento (6 vs. 12-16). -La mayoría de los eventos adversos fueron leves o moderados y autolimitados. -Se justifican estudios adicionales para explorar el resultado a largo plazo en perros tratados con esta combinación, así como con otras combinaciones de quimioterapia RAB.
Zandvliet <i>et al.</i> , 2013	Protocolo Inicial: <u>Primer Protocolo:</u> L-ASP DOX Clorambucilo Vincristina CTX Clorambucil <u>Segundo Protocolo:</u>	II	-Palpación/ medición de nódulos linfáticos periféricos, usando criterios de respuesta VCOG. -Hemograma -Perfil bioqco -Electrolitos.	<u>Tratamiento inicial:</u> Grupo sin prednisolona: -RC = 78 % (32/41) -RP = 15 % (6/41) -SD = 5 % (2/41) -EP = 2 % (1/41) Grupo con Prednisolona: -RC = 73 % (29/40) -RP = 8 % (3/40) -SD = 13 % (5/40) -EP = 8 % (3/40)	Duración de la respuesta (mediana; número de perros) <u>Tratamiento inicial:</u> Grupo sin prednisolona: -PFI 177 ds; 32 -TTP 153 ds; 41 Grupo con Prednisolona: -PFI 176 ds; 29 -TTP 137 ds; 40 <u>Tratamiento rescate:</u> Grupo sin prednisolona: -PFI 105 ds; 11	-Los resultados no respaldan el uso de prednisolona en un protocolo de múltiples fármacos de primera línea. -No proporcionaron ninguna indicación de que el uso de prednisolona dentro de un protocolo de quimioterapia contribuya al desarrollo de resistencia a múltiples fármacos.

Tabla 5: Resumen de los tratamientos aplicados para cL, que involucraban protocolos multimodales, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.

Artículo	Tratamiento	GDE	Evaluación de la Respuesta	Tipo de Respuesta	Duración de la Respuesta	Conclusiones
	Igual al anterior + Prednisolona			<p><u>Tratamiento rescate:</u></p> <p>Grupo sin prednisolona: -RC = 42 % (11/26) -RP = 35 % (9/26) -SD = 12 % (3/26) -EP = 12 % (3/26)</p> <p>Grupo con Prednisolona: -RC = 48 % (11/23) -RP = 17 % (4/26) -SD = 17 % (4/26) -EP = 17 % (4/26)</p>	-TTP 72 ds; 26 Grupo con Prednisolona: -PFI 175 ds; 11 -TTP 75 ds; 23	
Lucas <i>et al.</i> , 2013	<p>Protocolo Inicial:</p> <p><u>Inducción:</u></p> <p>G1: Carmustina comercial Vincristina Prednisona</p> <p>G2: LDE-carmustina Vincristina Prednisona</p> <p><u>Mantención:</u> Vincristina</p>	II	-Medición tumores sólidos, usando criterios de respuesta VCOG. -Hemograma completo, 1 sem después de cada tratamiento. -Mensualmente un Perfil bioquímico. -Urianálisis cada 6 sem o cuando los perros mostraban alguna alteración.	<p>Grupo 1: -RC = 75 % (6/8) -RP = 25 % (2/8)</p> <p>Grupo 2: -RC = 71 % (5/7) -RP = 28 % (2/7)</p>	<p>G1: -PFI de 199 ds (rango de 40- 1130 ds) -SG de 247 ds (rango de 108- 1142 ds)</p> <p>G2: -PFI de 119 ds (rango 40-632 ds) -SG de 207 ds (rango 85-654 ds)</p>	-Se demostró que la LDE-carmustina es segura y eficaz en un protocolo de combinación de fármacos, lo que alienta a realizar estudios más amplios para investigar el uso de LDE como vehículo de fármacos en oncología veterinaria.

Tabla 5: Resumen de los tratamientos aplicados para cL, que involucraban protocolos multimodales, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.

Artículo	Tratamiento	GDE	Evaluación de la Respuesta	Tipo de Respuesta	Duración de la Respuesta	Conclusiones
	Prednisona Carmustina					
Cawley <i>et al.</i> , 2020	Protocolo de Rescate: - RAB a una dosis de 1,0 mg / kg cada 3 sem hasta un total de 5 dosis. - L-ASP SC a una dosis de 400 UI / kg, al mismo tiempo que los 2 primeros tratamientos de RAB.	II	-Medición tumores sólidos, usando criterios de respuesta VCOG.	La ORR fue del 69 % -RC = 41 % (19/46) -RP = 28 % (19/46) -SD = 13 % (6/46)	-La mediana de PFI para todos los perros fue de 63 ds (rango 5-428 ds). -Los perros que experimentaron: <u>RC</u> : tuvieron una PFI de 144 ds (rango 44-428 ds) <u>RP</u> : tuvieron una PFI de 59 ds (rango 14-126 ds). <u>SD</u> : tuvieron una PFI de 41 ds (rango 31-51 ds). *La PFI fue de 63 ds (rango 14-428 ds) para el linfoma de células B y de 43 ds (5-86 ds) para los perros con linfoma de células T.	-RAB / L-ASP parece ser seguro y eficaz para perros con linfoma multicéntrico recidivante. - Se necesitan más estudios para evaluar si RAB / L-ASP ofrece algún beneficio clínico sobre el RAB solo como protocolo de rescate.

(*): Este estudio no especifica que utiliza los Criterios de evaluación de respuesta del VCOG, pero si está citado.

RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EP: enfermedad progresiva; SD: enfermedad estable; ORR: tasa de respuesta general; PFI: Intervalo libre de progresión; TDR: remisión total de Doxorubicina; LSS: Supervivencia específica del linfoma; TTP: tiempo de progresión; SLP: supervivencia libre de progresión; MST: Mediana de tiempo de supervivencia; SG: supervivencia general; ds: días; sem: semana.

Tabla 6: Resumen de los tratamientos para cL, basados en un solo medicamento, según los artículos recopilados en la revisión sistemática.

Artículo científico	Tratamiento	GDE	Evaluación de la Respuesta	Tipo de Respuesta	Duración de la Respuesta	Conclusiones
Higginbotham <i>et al.</i> , 2013	Protocolo Inicial: DOX	II	-Sistema de medición: VCOG -Citología (comparada con la anterior). -Ecocardiograma antes del tratamiento tres, seis y ocho.	-RC= 67 % (12/18)	-La mediana de la primera ORR fue de 68,5 ds (rango, 0 a 335 ds). -La mediana de TDR fue de 80,5 ds (rango, 0 a 335 ds). -La mediana de SG fue de 169,5 ds (rango, 0 a 865 ds).	- La DOX administrada intermitentemente y como agente único es bien tolerado para el linfoma de células B canino. - Si bien la DOX, como agente único no sustituye a los protocolos de quimioterapia de agentes múltiples en el tratamiento del cL, es una alternativa razonable si los compromisos de costo y tiempo son factores limitantes para el propietario.
Saba <i>et al.</i> , 2017	Protocolo de Rescate: RAB	II	-Sistema de medición: VCOG	-La ORR para todos los perros tratados fue del 74 %. <u>Grupo A (RAB a 0,82 mg/kg):</u> ORR para el Grupo A fue del 69 %. -RC = 50 % (8/16) -RP = 19 % (3/16) -SD = 13 % (2/16) -EP = 19 % (3/16) <u>Grupo B (RAB a 1 mg/kg):</u> ORR para el Grupo B fue 77 %.	-PFI para el total de perros 108 ds (rango: 7-332 ds) Grupo A: 72 ds Grupo B: 108 ds -RD para el total de perros es de 172 ds (rango: 42-332 ds) Grupo A: 172 ds Grupo B: 148 ds	- RAB a una dosis de 1,0 mg / kg cada 21 ds es una opción viable y generalmente bien tolerada para perros con linfoma de células B recidivante. - Una reducción de la dosis 0,82 mg / kg, en caso de EA, no parece afectar negativamente a la eficacia del RAB. - Se justifica una monitorización cuidadosa de las toxicidades dermatológicas y pulmonares únicas en los perros que reciben este tratamiento.

				<p>-RC = 42 % (13/34) -RP = 35 % (11/34) -SD = 16 % (5/34) -EP = 6 % (2/34)</p> <p>*1 perro fue sacrificado y 2 fueron retirados del estudio por EA.</p>		
Saba <i>et al.</i> , 2020	<p>Protocolo Inicial:</p> <p>RAB</p>	II	<p>-Criterios de evaluación de respuesta del Grupo de oncología cooperativa veterinaria (VCOG).</p> <p>-Criterios de terminología común para eventos adversos del Grupo de oncología cooperativa veterinaria (VCOG-EA).</p>	<p>-ORR para todos los perros evaluables (n = 60) fue del 87 %.</p> <p>-RC = 52 % (31/60) -PR = 35 % (21/60) -SD = 5 % (3/60) -EP = 8 % (5/60)</p> <p>* Los perros con linfoma de células B tenían una probabilidad significativamente mayor de responder, en comparación con los perros con linfoma de células T.</p>	<p>-La mediana general de PFI fue de 122 ds (rango: 5-365 ds).</p> <p>-Los perros que experimentaron RC tuvieron un PFI significativamente más largo en comparación con los perros que experimentaron PR (199 ds; rango: 67-365 ds frente a 89 ds; rango: 6-179 ds).</p>	<p>- RAB parece ser un tratamiento eficaz para perros con linfoma de células intermedias a grandes, multicéntrico, sin tratamiento previo, con una tasa de respuesta general del 87 % y una PFI mediana de 122 ds.</p> <p>- La tasa de respuesta y el PFI fueron más prolongados en perros con linfoma de células B.</p>
<p>RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EP: enfermedad progresiva; SD: enfermedad estable; ORR: tasa de respuesta general; PFI: Intervalo libre de progresión; TDR: remisión total de Doxorubicina; LSS: Supervivencia específica del linfoma; TTP: tiempo de progresión; SG: supervivencia general; ds: días; sem: semana.</p>						

Una vez analizados los distintos protocolos terapéuticos pudimos determinar cuáles eran los fármacos más probados en los artículos seleccionados en nuestra búsqueda sistemática (Tabla 7). Acá podemos comprobar que los fármacos más utilizados en los protocolos estudiados coinciden con la terapia CHOP, por lo que se puede inferir que es una buena base para elaborar un nuevo protocolo modificando, por ejemplo, su duración total, frecuencia de descansos, el orden de entrega de los medicamentos, el número de ciclos de tratamiento o las dosis de ellos.

Tabla 7. Frecuencia de utilización de los fármacos quimioterápicos, según el número de artículos que los uso en su estudio.		
Medicamentos	Número de artículos en que se usó el medicamento	Artículos que lo utilizan
Vincristina	10	Gavazza <i>et al.</i> , 2013 Zandvliet <i>et al.</i> , 2013 Lucas <i>et al.</i> , 2013 Lucas <i>et al.</i> , 2013 Marconato <i>et al.</i> , 2014 Mason <i>et al.</i> , 2014 Marconato <i>et al.</i> , 2015 Childress <i>et al.</i> , 2016 Wang <i>et al.</i> , 2016 Lee <i>et al.</i> , 2020
Doxorubicina (DOX)	9	Gavazza <i>et al.</i> , 2013 Higginbotham <i>et al.</i> , 2013 Zandvliet <i>et al.</i> , 2013 Marconato <i>et al.</i> , 2014 Marconato <i>et al.</i> , 2015 Childress <i>et al.</i> , 2016 Wang <i>et al.</i> , 2016 Thamm <i>et al.</i> , 2017 Lee <i>et al.</i> , 2020
Ciclofosfamida (CTX)	8	Gavazza <i>et al.</i> , 2013 Zandvliet <i>et al.</i> , 2013

Tabla 7. Frecuencia de utilización de los fármacos quimioterápicos, según el número de artículos que los uso en su estudio.

Medicamentos	Número de artículos en que se usó el medicamento	Artículos que lo utilizan
		Marconato <i>et al.</i> , 2014 Mason <i>et al.</i> , 2014 Marconato <i>et al.</i> , 2015 Childress <i>et al.</i> , 2016 Wang <i>et al.</i> , 2016 Lee <i>et al.</i> , 2020
Prednisona/ Prednisolona	8	Gavazza <i>et al.</i> , 2013 Zandvliet <i>et al.</i> , 2013 Lucas <i>et al.</i> , 2013 Marconato <i>et al.</i> , 2014 Marconato <i>et al.</i> , 2015 Childress <i>et al.</i> , 2016 Wang <i>et al.</i> , 2016 Lee <i>et al.</i> , 2020
L-asparaginasa (L-ASP)	5	Zandvliet <i>et al.</i> , 2013 Marconato <i>et al.</i> , 2014 Marconato <i>et al.</i> , 2015 Childress <i>et al.</i> , 2016 Cawley <i>et al.</i> , 2019
Rabacfosadina (RAB)	3	Thamm <i>et al.</i> , 2017 Saba <i>et al.</i> , 2017 Cawley <i>et al.</i> , 2020
Vacuna autóloga (HSPPC-HA)	2	Marconato <i>et al.</i> , 2014 Marconato <i>et al.</i> , 2015
Lomustina	2	Marconato <i>et al.</i> , 2014 Marconato <i>et al.</i> , 2015
Clorambucil	2	Gavazza <i>et al.</i> , 2013 Zandvliet <i>et al.</i> , 2013
Melfalán	2	Gavazza <i>et al.</i> , 2013

Tabla 7. Frecuencia de utilización de los fármacos quimioterápicos, según el número de artículos que los uso en su estudio.

Medicamentos	Número de artículos en que se usó el medicamento	Artículos que lo utilizan
		Parsons- Doherty <i>et al.</i> , 2014
Mitoxantrona	1	Wang <i>et al.</i> , 2016
Carmustina	1	Lucas <i>et al.</i> , 2013
Vacuna dTERT	1	Gavazza <i>et al.</i> , 2013
Dexametasona	1	Parsons- Doherty <i>et al.</i> , 2014
Actinomicina D	1	Parsons- Doherty <i>et al.</i> , 2014
Citarabina	1	Parsons- Doherty <i>et al.</i> , 2014

A continuación, en la Tabla 8, describimos la función, ventajas/desventajas y comentarios de uso de los medicamentos descritos en la tabla anterior, con el objetivo de conocerlos de mejor manera para saber cómo utilizarlos en un nuevo protocolo. Para la realización de esta tabla se utilizó la misma bibliografía de la revisión sistemática, la cual fue complementada con otros artículos cuando fue necesario.

Como observamos en esta tabla, los fármacos mencionados tienen diferentes mecanismos de acción, los que en general se enfocan en interferir distintos procesos de la replicación celular (inhibición de síntesis de proteína, polimerización de la tubulina, síntesis del DNA, entre otros) de tal manera que su combinación determina una complementación de efectos. Estas cualidades, junto con sus características de administración o eventual bajo costo, son las razones o ventajas por las que estos quimioterápicos son considerados y utilizados en el tratamiento del linfoma. Por otro lado, es importante considerar sus desventajas, que en este caso son los EA de su utilización y que se convierten en un factor limitante, ya que determinan si un paciente es capaz de soportar dicha terapia. Se destaca el desarrollo de hipersensibilidad, afecciones secundarias (gastrointestinal, cardíaca, hepática), entre otros.

Los comentarios del uso de cada medicamento muestran algunas experiencias de su utilización, lo que permite saber qué esperar al incorporarlos en un protocolo. En algunos

casos, los fármacos han sido evaluados en forma independiente para determinar de qué forma intervienen en el proceso terapéutico del paciente, tras lo cual se sigue afirmando que la combinación de fármacos determina un resultado más exitoso. Un buen ejemplo de esto es lo que ocurre con la DOX, para la cual se recomienda su uso individual solo en casos en que haya restricciones económicas o poco compromiso de los tutores, ya que implicaría menos asistencias a la clínica y menor costo, obteniéndose un resultado moderado y de corta duración.

Como la terapia CHOP es una combinación de medicamentos extrapolados de los protocolos utilizados en humanos, en general no hay estudios en caninos que evalúen cada uno de estos fármacos en forma individual, lo que se ve reflejado en la falta de información para algunos de ellos.

Tabla 8: Caracterización de los fármacos utilizados en protocolos quimioterápicos, ordenados de mayor a menor según su mención en la literatura revisada

Medicamentos	Función	Ventajas/ Desventajas	Comentarios sobre su uso
Doxorrubicina (DOX)	Antraciclina derivada de la levadura <i>Streptomyces</i> . Tiene múltiples mecanismos de acción, que incluyen la intercalación de ADN, que conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas y la formación de radicales libres, y la inhibición de las enzimas topoisomerasas (Lori <i>et al.</i> , 2010).	<u>Ventajas:</u> bajo costo (Higginbotham <i>et al.</i> , 2013). <u>Desventajas:</u> toxicidad gastrointestinal y hematológica (Higginbotham <i>et al.</i> , 2013). Aumenta el riesgo de desarrollar afecciones cardíacas, como arritmia ventricular, miocardiopatía o insuficiencia cardíaca congestiva (Childress <i>et al.</i> , 2016).	La DOX intermitente como agente único es un protocolo menos intenso y bien tolerado para el linfoma de células B canino. Sin embargo, no sustituye a los protocolos de quimioterapia de agentes múltiples en el tratamiento del cL, es una alternativa razonable si los compromisos de costo y tiempo son factores limitantes para el tutor (Higginbotham <i>et al.</i> , 2013).
Vincristina	Es un alcaloide que inhibe la división celular. Se une a la tubulina durante la mitosis activa y, al hacerlo, interrumpe la polimerización de la tubulina y, por lo tanto, la estructura y función de los microtúbulos. Se desencadena la detención de la metafase y se inhibe la división celular (Harrison y Lyseng-Williamson, 2013).	<u>Ventajas:</u> A bajas concentraciones, estabiliza la función del huso que previene la segregación cromosómica y da como resultado la detención de la metafase y la inhibición de la mitosis. A concentraciones más altas, se ha observado rotura y despolimerización total de los microtúbulos (Silverman y Deitcher, 2013). <u>Desventaja:</u> un perro experimentó fleo de grado 2 después de recibir su primer tratamiento con vincristina (Childress <i>et al.</i> , 2016).	El potencial antitumoral de la vincristina depende de la concentración, duración de la exposición y del número de células que transitan por la mitosis durante el período de exposición al fármaco. Tiene un límite de dosis de 2 mg para pacientes con un área de superficie corporal reducida (Harrison y Lyseng-Williamson, 2013).
Ciclofosfamida (CTX)	Agente alquilante, actúa como un profármaco que se convierte mediante enzimas microsomales hepáticas en 4-hidroxíciclofosfamida. La descomposición espontánea de la 4-hidroxíciclofosfamida dentro de las células da como resultado la producción de mostaza fosforamida, el metabolito citotóxico final de CTX. El sitio más común de alquilación del ADN es la posición N-7 de la guanina lo que da como resultado entrecruzamiento, replicación alterada del ADN y muerte celular. Se usa para tratar numerosas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas en perros, incluidos linfomas y tumores de mastocitos (Rassnick <i>et al.</i> , 2014).	<u>Ventajas:</u> se puede administrar por vía oral en perros (Lori <i>et al.</i> , 2010). <u>Desventajas:</u> reacciones adversas del tracto urinario (hematuria, estranguria y polaquiuria) atribuidos a cistitis hemorrágica estéril (Childress <i>et al.</i> , 2016). Puede causar edema submucoso de la vejiga urinaria, hemorragia, necrosis y fibrosis (es decir, cistitis hemorrágica estéril) debido a la acroleína, un subproducto metabólico. En un informe, se produjo cistitis hemorrágica estéril en el 9 % de 133 perros tratados con CTX intravenoso a 200 mg / m ² (Rassnick <i>et al.</i> , 2014).	La adición de CTX no dio como resultado una respuesta significativamente mejor (Lori <i>et al.</i> , 2010).

Tabla 8: Caracterización de los fármacos utilizados en protocolos quimioterápicos, ordenados de mayor a menor según su mención en la literatura revisada

Medicamentos	Función	Ventajas/ Desventajas	Comentarios sobre su uso
Prednisona/ Prednisolona	Glucocorticoides (GC) inducen apoptosis de las células linfoides (Zandvliet <i>et al.</i> , 2013).	<p><u>Ventaja:</u> acción linfolitica (Childress <i>et al.</i>, 2016).</p> <p><u>Desventajas:</u> efectos secundarios por ej. Polidipsia, polifagia y poliuria. Limitan el uso de fármacos AINE. Predisponen a infecciones subclínicas (del tracto urinario) (Marconato <i>et al.</i>, 2014). Los GC pueden inducir la expresión de glicoproteína P (Pgp) en linfoblastos neoplásicos, lo que se asocia al desarrollo de resistencia a los fármacos de la terapia (Zandvliet <i>et al.</i>, 2013).</p>	No tiene ningún efecto adicional sobre los resultados del tratamiento y puede omitirse de los protocolos de primera línea con múltiples fármacos utilizados para el tratamiento (Marconato <i>et al.</i> , 2014). Su exclusión del protocolo L-CHOP no resultó en un mejor tiempo de supervivencia libre de progresión para perros con linfomas. Sin embargo, el ensayo probablemente no tuvo el poder estadístico suficiente para detectar una diferencia clínicamente significativa entre grupos (Childress <i>et al.</i> , 2016).
L-asparaginasa (L-ASP)	Es una enzima comúnmente utilizada en el tratamiento del cL. Actúa agotando la asparagina / glutamina sistémica, lo que conduce a una disminución de la capacidad para la síntesis de proteínas y la apoptosis de las células que carecen de asparagina sintetasa, como los linfocitos (Cawly <i>et al.</i> , 2020).	<p><u>Ventajas:</u> en perros se utiliza tanto en situaciones de linfoma sin tratamiento como en casos de rescate (Cawly <i>et al.</i>, 2020).</p> <p><u>Desventajas:</u> en perros incluyen reacciones de hipersensibilidad, pruebas de funcionalidad hepática anormales, pruebas de coagulación alteradas y pancreatitis (Cawly <i>et al.</i>, 2020). Reacciones de hipersensibilidad, pruebas de función hepática anormales, medidas de coagulación alteradas y pancreatitis (Cawly <i>et al.</i>, 2020).</p>	En cL se utiliza tanto en protocolos de inicio como de rescate (Blake <i>et al.</i> , 2016). A pesar de su uso común para cL, no se han realizado estudios prospectivos que demuestren un beneficio clínico específico al agregar L-ASP a los protocolos de quimioterapia combinada (Cawly <i>et al.</i> , 2020).
Rabacfosadina (RAB; Tanovea-CA1; VDC-1101 o GS-9219)	Es un profármaco del nucleótido fosfonato acíclico 9-(2-fosfonilmetoxietil) guanina (PMEG), que se dirige preferentemente a las células del linfoma con una toxicidad sistémica reducida en comparación con PMEG. Fue aprobado condicionalmente por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. para el tratamiento del cL en 2016. Según su etiqueta, se puede administrar cada 21 días, hasta cinco tratamientos a perros con linfoma de cualquier tipo (Saba <i>et al.</i> , 2020).	<p><u>Ventajas:</u> Los estudios que evaluaron RAB en perros con linfoma sin tratamiento previo y con recaída o refractarios al tratamiento informaron tasas de respuesta generales de aproximadamente 50 a 100 %, con tasas de respuesta más altas y duraciones de respuesta más largas observadas en cL de células B (Saba <i>et al.</i>, 2020).</p> <p><u>Desventajas:</u> asociado con efectos adversos (EA) de bajo grado o leves, que incluyen neutropenia y signos gastrointestinales (Saba <i>et al.</i>, 2020). El EA dermatológico asociado con RAB a menudo se manifiesta como otitis externa pruriginosa y / o</p>	-El RAB parece ser un tratamiento eficaz para perros con linfoma de células intermedias a grandes, multicéntrico, sin tratamiento previo, con una tasa de respuesta general del 87 % y una PFI mediana de 122 días. La tasa de respuesta y el PFI fueron más prolongados en perros con linfoma de células B; sin embargo, la mitad de los perros con linfoma de células T también respondieron al tratamiento. En los perros que reciben RAB se justifica una monitorización cuidadosa y continua de los EA dermatológicos y pulmonares únicos. Estos resultados proporcionan una guía para los oncólogos que utilizan RAB en el contexto de linfoma canino de

Tabla 8: Caracterización de los fármacos utilizados en protocolos quimioterápicos, ordenados de mayor a menor según su mención en la literatura revisada

Medicamentos	Función	Ventajas/ Desventajas	Comentarios sobre su uso
		<p>lesiones cutáneas eritematosas en el dorso y en las áreas inguinales. Estos EA dermatológicos generalmente se resuelven con terapia de apoyo y / o reducciones y / o retrasos de la dosis. Además, la fibrosis pulmonar es una toxicidad reportada asociada con la administración de RAB. Aunque se informó en aproximadamente el 4 % de los perros tratados con RAB, es potencialmente mortal. No se comprende el mecanismo de este EA, pero parece ser idiosincrásico. Se recomienda una monitorización cuidadosa con radiografías torácicas en busca de evidencia de patología pulmonar (Saba <i>et al.</i>, 2020).</p>	<p>células grandes intermedias y sin tratamiento previo, y pueden justificar la inclusión de RAB en los protocolos basados en CHOP de agentes múltiples más agresivos y / o en combinación con otros linfomas de agentes únicos (Saba <i>et al.</i>, 2020). -Tiene una actividad sustancial como agente único en perros con linfoma (Thamm <i>et al.</i>, 2017). - La alternancia de RAB / DOX en general fue bien tolerada y dio como resultado PFI comparables a los protocolos estándar de múltiples agentes basados en DOX, con menos visitas de tratamiento. La mayoría de los eventos adversos fueron leves o moderados y autolimitados. Se necesitan más estudios para explorar los resultados a largo plazo y otras combinaciones de quimioterapia con RAB (Thamm <i>et al.</i>, 2017). -RAB tiene eficacia para el tratamiento del linfoma en perros tanto en casos sin tratamiento previo como en casos de recaída (Cawley <i>et al.</i>, 2020).</p>
Lomustina	<p>1- (2-cloroetil) -3-ciclohexil-1-nitrosourea o CCNU, es un agente alquilante que pertenece al grupo nitrosourea (Heading <i>et al.</i>, 2011). El paso inicial en el proceso de alquilación es la transferencia de un grupo cloroetilo de la cloroetilnitrosourea al grupo metilo O-6 de la guanina en el ADN. Siguen enlaces cruzados intra e interestatales en el ADN, lo que resulta en la inactivación de la plantilla de ADN, el cese de la síntesis de ADN y, en última instancia, la muerte celular. CCNU se utiliza en el tratamiento de perros con linfoma, tumores de mastocitos, sarcoma histiocítico, tumores cerebrales y encefalitis no infecciosas (Rassnick <i>et al.</i>, 2014).</p>	<p><u>Ventajas:</u> Alta solubilidad en lípidos y sus metabolitos, da como resultado una amplia distribución a los tejidos y la penetración a través de la barrera hematoencefálica (Heading <i>et al.</i>, 2011). <u>Desventajas:</u> en dosis altas, conduce a hipoplasia severa de la médula ósea, anemia y neutropenia. Toxicidad renal en perros (Heading <i>et al.</i>, 2011). La toxicidad limitante de la dosis de lomustina es la neutropenia, y la hepatopatía también es motivo de gran preocupación, especialmente con dosis múltiples (Cannon <i>et al.</i>, 2015).</p>	<p>La toxicidad asociada a CCNU en perros es común, pero generalmente no pone en peligro la vida (Heading <i>et al.</i>, 2011).</p>

Tabla 8: Caracterización de los fármacos utilizados en protocolos quimioterápicos, ordenados de mayor a menor según su mención en la literatura revisada

Medicamentos	Función	Ventajas/ Desventajas	Comentarios sobre su uso
Clorambucil	Es una mostaza nitrogenada soluble en agua y un agente alquilante que se utiliza principalmente para las neoplasias malignas hematológicas (Bentley <i>et al.</i> , 2018).	<p><u>Ventajas:</u> se puede usar en terapias metronómicas (Bentley <i>et al.</i>, 2018).</p> <p><u>Desventajas:</u> Hay informes esporádicos de convulsiones y mioclonías en humanos y perros que reciben clorambucil (Bentley <i>et al.</i>, 2018). Desarrollo de trombocitopenia asintomática durante terapia a largo plazo (Bentley <i>et al.</i>, 2018).</p>	El régimen de quimioterapia metronómica fue bien tolerado en perros (Bentley <i>et al.</i> , 2018).
Carmustina	Agente quimioterapéutico de bajo peso molecular, altamente soluble en lípidos; actúa como un agente alquilante no específico y muestra una mielotoxicidad bien definida (Lucas <i>et al.</i> , 2015).	<p><u>Ventajas:</u></p> <p><u>Desventajas:</u> supresión de la médula ósea, neutropenia y trombocitopenia. Además, el riesgo de alveolitis fibrosante y neumonía es alto con dosis acumulativas (Lucas <i>et al.</i>, 2015). En perros, la carmustina se usa para el tratamiento de tumores neurológicos y linfomas a una dosis de 50 mgm – 2 intravenosa (IV) cada 6 semanas (Lucas <i>et al.</i>, 2015).</p>	Este estudio piloto realizado en perros con linfoma mostró que el uso de carmustina es seguro y mejor si se usa en conjunto con LDE como vehículo del fármaco. Se debería seguir fomentando futuros estudios de oncología veterinaria en esta área (Lucas <i>et al.</i> , 2015).
Melfalán	El melfalán es un agente alquilante antineoplásico que provoca la formación de enlaces cruzados de ADN entre cadenas (Bijelic <i>et al.</i> , 2012).	<p><u>Ventajas:</u> Se ha demostrado en un modelo animal que la administración intraperitoneal de melfalán combinada con calor es eficaz para retrasar el crecimiento tumoral y que el efecto de la hipertermia sobre la farmacocinética y la distribución tisular del melfalán administrado por vía intraperitoneal indicó un aumento de las concentraciones de tejido intraabdominal (Bijelic <i>et al.</i>, 2012).</p> <p><u>Desventajas:</u> Toxicidad sistémica en altas dosis (Bijelic <i>et al.</i>, 2012).</p>	-Durante más de 30 años, el melfalán ha sido el pilar del tratamiento del mieloma múltiple. Actualmente, su valor terapéutico se encuentra en pacientes más jóvenes que se someten a altas dosis de melfalán antes del autotrasplante de células madre (Gullà <i>et al.</i> , 2016).
Mitoxantrona	Es un antibiótico antitumoral sintético con acción similar a la DOX, pero induce menos cardiotoxicidad en humanos y animales. Se puede usar para tratar múltiples tipos de tumores, incluido el linfoma. La mitoxantrona se ha utilizado como alternativa en el	<p><u>Ventajas:</u> En pacientes con linfoma canino, la mitoxantrona exhibe actividad terapéutica y baja toxicidad cuando se usa como terapia de agente único (Wang <i>et al.</i>, 2016).</p> <p><u>Desventaja:</u> las terapias que incluyen mitoxantrona</p>	Dado que los antibióticos antitumorales deben considerarse el fármaco principal en los protocolos de quimioterapia de agentes múltiples para el linfoma canino, creemos que el protocolo de quimioterapia de combinación que contiene mitoxantrona es una opción terapéutica alternativa para el linfoma canino

Tabla 8: Caracterización de los fármacos utilizados en protocolos quimioterápicos, ordenados de mayor a menor según su mención en la literatura revisada

Medicamentos	Función	Ventajas/ Desventajas	Comentarios sobre su uso
	tratamiento de pacientes con cáncer que no pueden tolerar los EA de la DOX. La mitoxantrona también se usa para reemplazar la DOX después de que se haya alcanzado la dosis de por vida de la DOX (Wang <i>et al.</i> , 2016).	no se ha evaluado ampliamente (Wang <i>et al.</i> , 2016).	(Wang <i>et al.</i> , 2016).
Vacuna autóloga (HSPPC-HA)	<p>La vacuna se preparó a partir de nódulos linfáticos resecados de perros y se administró como inyección intradérmica (Marconato <i>et al.</i>, 2015b).</p> <p>Las proteínas de choque térmico (HSP) se unen a los pequeños péptidos que acompañan (HSPPC), lo que permite la inmunización del huésped contra un gran repertorio de antígenos asociados a tumores. La hidroxiapatita transporta HSPPC y actúa como adyuvante inmunológico (Marconato <i>et al.</i>, 2014).</p> <p>HSPPC-HA: Consiste en polvo cerámico de hidroxiapatita y proteínas de choque térmico purificadas de tumores de perros (Marconato <i>et al.</i>, 2015b)</p>	<p><u>Ventajas:</u> los perros vacunados tuvieron una tasa de respuesta significativamente más alta (RC o PR) que los perros no vacunados. Estos resultados sugieren que al menos algunos perros pueden beneficiarse de la inmunoterapia que ofrece esta vacuna (Marconato <i>et al.</i>, 2015b).</p> <p><u>Desventajas:</u> Muchos de los perros de este estudio murieron antes de obtener todos los resultados que se buscaban, esto por el avanzado estado de su enfermedad (Marconato <i>et al.</i>, 2015b).</p>	<p>Los resultados de este ensayo demuestran que la vacuna autóloga probada aquí es segura y eficaz para prolongar TTP y LSS en perros con DLBCL cuando se usa en combinación con quimioterapia de dosis intensa. Sobre la base de estos resultados, se justifica una evaluación adicional de esta nueva estrategia terapéutica en el LDCBG humano (Marconato <i>et al.</i>, 2014).</p> <p>Los resultados demuestran que los perros vacunados con HSPPC-HA que desarrollaron una respuesta inmune tuvieron un TTP y LSS significativamente más largos que aquellos sin respuesta detectable. Otorgando beneficios clínicos, sin aumento de la toxicidad, proporcionando así una estrategia para mejorar la quimioterapia en perros con linfoma (Marconato <i>et al.</i>, 2015b).</p>
Dexametasona	La dexametasona es un glucocorticoide sintético con acciones que se asemejan a las de las hormonas esteroides. Actúa como antiinflamatorio e inmunosupresor (Hossain <i>et al.</i> , 2008).	<p><u>Ventajas:</u> Los glucocorticoides son agentes antiinflamatorios efectivos y provocan una respuesta clínica rápida (Hossain <i>et al.</i>, 2008).</p> <p><u>Desventajas:</u> a menudo se asocia con la ruptura del tendón y la cicatrización deteriorada del tendón y el cartílago (Hossain <i>et al.</i>, 2008).</p>	-La dexametasona bloquea la proliferación y diferenciación de células T vírgenes al atenuar la coestimulación de CD28 (Giles <i>et al.</i> , 2018).

Tabla 8: Caracterización de los fármacos utilizados en protocolos quimioterápicos, ordenados de mayor a menor según su mención en la literatura revisada

Medicamentos	Función	Ventajas/ Desventajas	Comentarios sobre su uso
Vacuna dTERT	Vacuna genética dirigida a la telomerasa de perro (dTERT), se basa en la tecnología Ad / DNA-EGT, capaz de inducir respuesta inmunitaria, mediada por células contra este antígeno tumoral (Gavazza <i>et al.</i> , 2013).	<u>Ventajas:</u> La vacuna dTERT no ha mostrado efectos secundarios en los perros que se le administro. Y cuando se combina con la terapia COP, se demuestra que hay eficacia clínica en el tratamiento probado (Gavazza <i>et al.</i> , 2013).	La vacuna dTERT podría complementar diferentes regímenes quimioterápicos (COP), pero se necesitan más estudios al respecto (Gavazza <i>et al.</i> , 2013).
Actinomicina D	Es un conocido antibiótico que exhibe una alta actividad antibacteriana y antitumoral. Se ha utilizado ampliamente en la práctica clínica desde 1954 como fármaco anticancerígeno para el tratamiento de muchos tumores y también es una herramienta útil en bioquímica y biología molecular (Cortes <i>et al.</i> , 2016). A bajas concentraciones inhiben preferentemente la transcripción del ARNr dependiente de la ARN polimerasa I y, por lo tanto, la biogénesis de los ribosomas (Cortes <i>et al.</i> , 2016). Se administra por vía intravenosa y se utiliza en el tratamiento de la enfermedad trofoblástica gestacional, el tumor de Wilms, el rabdomiosarcoma y el sarcoma de Ewing, entre otros (Avendaño y Menéndez, 2008).	<u>Ventajas:</u> inhibe la proliferación de las células mediante la formación de un complejo estable con el ADN e interfiriendo en la síntesis de ARN dependiente del ADN, ejerciendo un efecto antineoplásico (Cortes <i>et al.</i> , 2016). <u>Desventajas:</u> aumenta el riesgo de toxicidad gastrointestinal, mielosupresión, mucositis, toxicidad dermatológica (Cortes <i>et al.</i> , 2016).	La actinomicina D fue el primer antibiótico que demostró tener actividad anticancerígena y ahora se usa más comúnmente como tratamiento para una variedad de tumores pediátricos, como el tumor de Wilms, el rabdomiosarcoma y el sarcoma de Ewing (Cortes <i>et al.</i> , 2016). La actinomicina D disminuye la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis y el tiempo (Cortes <i>et al.</i> , 2016).
Citarabina	Tiene efecto sobre las células en alta tasa de replicación celular y se usa comúnmente como quimioterápico en el linfoma y como agente inmunosupresor (Lowrie <i>et al.</i> , 2016). Inhibe la síntesis de ácido desoxirribonucleico. Sus acciones son específicas para la etapa S del ciclo celular. También tiene propiedades antivirales e inmunosupresoras (El-Subbagh y Al-Badr, 2009).	<u>Ventajas:</u> reduce la capacidad de replicación celular, bloqueando la fase S (Salehi <i>et al.</i> , 2019). <u>Desventajas:</u> en dosis altas puede generar toxicidad neurológica y mielosupresión (Momparler, 2013)	-Mediante infusión a velocidad continua tiene ventajas farmacocinéticas y farmacodinámicas sobre la dosificación intermitente tradicional. Aún se desconoce si estas ventajas se traducen en eficacia clínica (Lowrie <i>et al.</i> , 2016).

Finalmente, nuestro proceso de análisis de la bibliografía seleccionada en la búsqueda sistemática nos permitió discriminar la información relevante para la elaboración de una propuesta de protocolo para DLBCL, la cual se resume en la Tabla 9. En esta encontramos seis estudios que fueron calificados con GDE I o II, y que la mayoría fueron publicados en revistas con índice de impacto superior a 2,6 (salvo dos que son de 1), e incluso uno de ellos presenta índice de impacto de 12,5, lo cual refleja el alcance que logra la información publicada y la validación de sus pares.

En la Tabla 8 detallamos la respuesta al tratamiento observada en estos estudios, las cuales fueron evaluadas a través del VCOG, utilizando parámetros consensuados que a la vez permiten compararlos. Estos trabajos tienen como una de sus principales características el haber sido exitosos en los resultados a sus propuestas terapéuticas.

El trabajo mejor evaluado corresponde a Marconato y cols. 2014, con un GDE I y un índice de impacto de 12,5, el cual corresponde al estudio del tratamiento del DLBCL mediante un protocolo CHOP más una vacuna tumoral autóloga, es decir, que utiliza un gran repertorio de antígenos asociados a tumores acompañado de hidroxapatita como vehículo adyuvante. En este artículo se observa una RC del 100 % de los pacientes tratados con inmunoquimioterapia (CHOP + vacuna autóloga), y TTP de 304 días (TTP y PFI corresponden al tiempo entre el inicio del tratamiento hasta la progresión de la enfermedad). El trabajo de Wang y cols. 2016, también evaluó el uso de protocolo CHOP comparándolo con una combinación similar, pero que reemplaza la DOX por mitoxantrona (CMOP). Este protocolo CMOP resultó en un RC del 77,3 % versus un 81,8 % de CHOP. En cuanto al tiempo libre de progresión se estableció en 162 y 222 días, respectivamente.

De los seis artículos incluidos en la Tabla 9, cuatro prueban la Rabacfosadina (RAB) que corresponde a un fármaco recientemente aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en medicina veterinaria en EE.UU., sin embargo, en tres de ellos se propone su administración como fármaco de rescate para pacientes tratados previamente con otros protocolos terapéuticos y que recaen en la enfermedad. Un estudio realizado por Saba y cols. en 2017, evaluó su utilización de forma individual en linfoma de células B recidivante, logrando un RC de 45 % y un PFI de 203 días, y aunque es un buen resultado se ha seguido evaluando en combinación con otros fármacos, como L-Asparginasa (L-ASP) (Cawley *et al.*, 2020) o DOX (Thamm *et al.*, 2020), buscando obtener tasas de respuestas más altas. Solo uno

de estos trabajos utiliza pacientes sin tratamiento previo, mostrando que RAB es eficaz en el tratamiento inicial del linfoma de células intermedias a grandes, con una RC de 52 % y un PFI de 122 días (Saba *et al.*, 2020), pero no supera el protocolo de elección actual que es CHOP (Marconato *et al.*, 2014).

Por otro lado, Childress y cols. 2016, buscaron determinar el rol que cumple la prednisona en el protocolo CHOP. Para esto utilizaron un esquema de tratamiento que incluye L-ASP y CHOP, que es una combinación frecuente en linfoma, evaluado con y sin la prednisona (L-CHOP o L-CHO). En este caso se determinó que no existe diferencia estadística entre los protocolos con y sin prednisona, tanto en la RC del linfoma (72 % y 68 %, respectivamente), como en el tiempo de supervivencia libre de enfermedad (142 y 292 días, respectivamente).

De los artículos calificados como GDE II, solo 3 no fueron incluidos en la Tabla 9, y las razones para excluirlos fueron que: el estudio de la vacuna contra la telomerasa mostró buenos resultados, pero no continuó en el tiempo (Gavazza *et al.*, 2013); la comparación del tratamiento con y sin prednisona en un protocolo multimodal alternativo (no CHOP), no mostró diferencias estadísticas (Zandvliet *et al.*, 2013); la investigación se enfocó en el desarrollo de un vehículo para el transporte de carmustina, para disminuir sus EA y potenciar su acción farmacológica (Lucas *et al.*, 2013).

Tabla 9: Información considerada para elaborar un protocolo terapéutico para DLBCL

Autor y año	GDE	Índice de Impacto	Respuesta al tratamiento	Información Seleccionada
Marconato <i>et al.</i> , 2014	I	12,531	<p><u>G1, grupo vacuna:</u></p> <p>-RC en el 100 % (12/12)</p> <p><u>G2, grupo placebo:</u></p> <p>-RC en el 71,4 % (5/7)</p> <p><u>-Duración de la respuesta:</u> TTP del G1 fue de 304 ds (media, 332 ds; rango, 154-648 ds) vs. 41 ds (media, 59 ds; rango, 19-140 ds) para G2.</p> <p>La mediana de LSS fue más larga en el G1 v/s el G2 = G1 tiene mayor probabilidad de vivir más tiempo v/s G2 que recibieron el placebo.</p> <p>-LSS del G1 fue de 505 ds (media, 468 ds) v/s 159 ds (media, 136 ds) para el G2</p>	<p>-Se eligió la quimioterapia basada en CHOP para la reducción de volumen del tumor porque es el tratamiento preferido para perros con linfoma agresivo de células B.</p> <p>-Ambos grupos recibieron la misma quimioterapia combinada de 20 sem, que consistía en L- ASP, vincristina, CTX, DOX, lomustina y prednisona</p> <p>-Hubo un aumento significativo de TTP en el grupo de perros que recibieron quimioterapia en comparación con los perros que recibieron quimioterapia y el placebo.</p> <p>-La duración media de la segunda remisión inducida por quimioterapia entre los perros vacunados fue significativamente mayor que la duración media de la segunda remisión inducida por la quimioterapia en los perros no vacunados.</p> <p>-En base a los resultados, la inmunoterapia activa utilizada en este estudio tiene el potencial de combatir las células de DLBCL residuales, lo que lleva a una segunda remisión prolongada y, en última instancia, a una LSS prolongada.</p> <p>-Este ensayo indica la viabilidad, buena tolerabilidad y potente actividad inmunológica de la estrategia de vacunación autóloga probada, lo que conduce a una mejor TTP y LSS en perros con DLBCL.</p>
Childress <i>et al.</i> , 2016	II	1,160	<p>Respuesta general:</p> <p>-RC en 28/40 (70 %)</p> <p>-RP en 12/40 (30 %)</p> <p>Grupo L-CHOP:</p> <p>-RC en 13/18 (72 %)</p> <p>-RP en 5/18 (28 %)</p> <p>Grupo L-CHO:</p> <p>-RC en 15/22 (68 %)</p>	<p>-Quimioterapia combinada con CHOP, con o sin L-asparaginasa (es decir, L-CHOP), representa el estándar actual de atención para perros con linfomas ganglionares, lo que proporciona tasas de remisión completa del cáncer de aproximadamente 70 a 90 % y una mediana de supervivencia general de aprox. 9 a 14 meses.</p> <p>- La exclusión de prednisona del protocolo L-CHOP no dio como resultado un mejor tiempo de supervivencia, libre de progresión.</p>

			<p>-RP 7/22 (32 %)</p> <p>-La mediana del SLP fue de 142,5 ds para los perros que recibieron L-CHO y de 292 ds para los perros que recibieron L-CHOP.</p> <p>-La MST para L-CHO fue de 255 ds, y L-CHOP fue de 387 ds; L-CHO se asoció con un mayor riesgo de muerte, en comparación con LCHOP</p>	
Wang <i>et al.</i> , 2016	II	1,008	<p>G1: CHOP: RC=81,8 % (18/22) RP= 9,1 % (2/22)</p> <p>G2: CMOP: RC=77,3 % (17/22) RP=13,6 % (3/22)</p> <p>-No hubo diferencia entre los 2 grupos con respecto a la SLP y ST.</p> <p>G1, CHOP: -SLP fue de 222 ds (rango, 185- 259 ds) -ST fue de 318 ds (rango, 215 a 421 ds)</p> <p>G2, CMOP: -SLP fue de 162 ds (rango, 44 a 280 ds) -ST fue de 241 ds (rango, 121 a 363 ds)</p>	<p>- Los protocolos de quimioterapia combinada incluyen fármacos con varios mecanismos de acción, lo que potencialmente retrasa la aparición de la resistencia a múltiples fármacos.</p> <p>- Se indican que las respuestas a ambos fármacos, DOX y mitoxantrona en protocolos de combinación para la terapia de inducción fueron similares.</p> <p>- La incidencia de toxicidad hematológica después de la administración de DOX o mitoxantrona fue baja en ambos grupos.</p> <p>-Se indicó que el protocolo CMOP fue efectivo para tratar el linfoma canino. No hubo diferencias significativas en la tasa de respuesta, PFI y MST entre los 2 protocolos.</p>
Thamm <i>et al.</i> , 2017	II	3.333	<p>La tasa de ORR fue del 84%</p> <p>-RC en 34 (68 %) -RP en 8 (16 %) -SD en 5 -EP en 3</p> <p><u>Duración de la respuesta:</u></p>	<p>-La alternancia de RAB / DOX en general fue bien tolerada y dio como resultado PFI comparables a los protocolos estándar de múltiples agentes basados en DOX, con menos visitas de tratamiento. La mayoría de los eventos adversos fueron leves o moderados y autolimitados.</p> <p>-Las toxicidades gastrointestinales (hiporexia autolimitante, diarrea) fueron los EA agudos más comunes observados en nuestro estudio y, con la excepción de la diarrea, se informaron con una frecuencia relativamente igual después de los tratamientos iniciales con DOX y RAB. Esto se refleja en una probabilidad de reducir dosis entre los 2 medicamentos.</p>

			<p>-La mediana de PFI para todos los perros fue de 194 ds (rango, 7-435 + ds).</p> <p>-La mediana de PFI para aquellos con RC: 216 ds (rango, 105-435 + ds)</p> <p>-La mediana de PFI para con RP: 63 ds (rango, 42-124 ds).</p> <p>-La mediana de PFI para aquellos con SD: 78 ds (rango 42-93 ds).</p>	<p>-Perros con linfoma multicéntrico naïve que recibieron alternando Tanovea® (RAB) (1 mg/kg iv en las sem 0, 6, 12) y DOX (30 mg/m² iv en las sem 3, 9, 15) mostró una tasa total de respuesta del 84 % y una mediana general del intervalo libre de progresión (PFI) de 194 ds.</p> <p>En general, la alternancia de RAB/DOX fue bien tolerada, con un PFI comparable a regímenes de tratamiento estándar basados en DOX (CHOP) y menos visitas de tratamiento.</p>
Saba <i>et al.</i> , 2017	II	2,613	<p>La ORR para todos los perros tratados fue del 74 %.</p> <p><u>Grupo A (RAB a 0,82 mg/kg):</u></p> <p>ORR para el Grupo A fue del 69 %.</p> <p>-RC en 8/16 (50 %)</p> <p>-RP en 3/16 (19 %)</p> <p>-SD en 2/16 (13 %)</p> <p>-EP en 3/16 (19 %)</p> <p><u>Grupo B (RAB a 1 mg/kg):</u></p> <p>ORR para el Grupo B fue 77 %.</p> <p>-RC en 13/34 (42 %)</p> <p>-RP en 11/34 (35 %)</p> <p>-SD en 5/34 (16 %)</p> <p>-EP en 2/34 (6 %)</p> <p>*1 perro fue sacrificado y 2 fueron retirados del estudio por EA.</p> <p><u>Duración de la respuesta:</u></p> <p>-PFI para el total de perros 108 días (rango: 7-332 ds)</p> <p>Grupo A: 72 ds</p>	<p>En perros con linfoma canino de células B recidivante, se probó RAB, en dosis de 0,82 mg/kg o 1,0 mg/kg como una infusión iv de 30 minutos cada 21 ds durante un máximo de 5 tratamientos, logrando una respuesta general del 74 %. En el 45 % de los perros se alcanzó una respuesta completa, con PFI de hasta 203 días.</p> <p>RAB es un tratamiento eficaz para perros con linfoma de células B que manifestaron una recaída, luego de un régimen de quimioterapia inicial basado en DOX, como el protocolo CHOP.</p>

			<p>Grupo B: 108 ds</p> <p>-RD para el total de perros es de 172 ds (rango: 42-332 ds)</p> <p>Grupo A: 172 ds</p> <p>Grupo B: 148 ds</p>	
Cawley <i>et al.</i> , 2020	II	3,333	<p>La ORR fue del 69 %</p> <p>-RC en 19 perros (41 %)</p> <p>-RP en 13 perros (28 %)</p> <p>-SD en 6 perros (13 %)</p> <p>-La mediana de PFD para todos los perros fue de 63 ds (rango 5-428 ds).</p> <p>-Los perros que experimentaron:</p> <p>RC: tuvieron una PFS de 144 ds (rango 44-428 ds)</p> <p>RP: tuvieron una PFS de 59 ds (rango 14-126 ds).</p> <p>SD: tuvieron una PFS de 41 ds (rango 31-51 ds).</p> <p>*La PFD fue de 63 ds (rango 14-428 ds) para el linfoma de células B y de 43 ds (5-86 ds) para los cL de células T.</p>	<p>-Los resultados de este estudio sugieren que la combinación de RAB y L-ASP es segura y eficaz para perros con linfoma multicéntrico recidivante, ya que la ORR para todos los perros tratados en este estudio fue del 70 %, y el 41 % experimentó una RC. La MPFS (supervivencia media libre de progresión) para todos los perros fue de 63 ds y de 144 ds para los perros que lograron una RC.</p> <p>-Los perros que recibieron L-ASP en tratamiento anterior tuvieron una PFS peor cuando fueron tratados con RAB / L-ASP, versus los perros que no habían recibido L-ASP antes.</p> <p>-No lograr una RC y haber recibido previamente L-ASP fueron factores de pronóstico negativos en el análisis.</p> <p>-En este estudio, como es consistente con estudios previos de RAB, los perros con linfoma de células T tenían una mediana del intervalo libre de progresión (MPFI) más corto que los perros con linfoma de células B (63 ds para las células B, 43 ds para las células T).</p>
Saba <i>et al.</i> , 2020	II	2,613	<p>-ORR para todos los perros evaluables (n = 60) fue del 87 %.</p> <p>-RC en 31/60 (52 %)</p> <p>-PR en 21/60 (35 %)</p> <p>-SD en 3/60 (5 %)</p> <p>-EP en 5/60 (8 %)</p> <p>-La mediana general de PFI fue de 122 ds (rango: 5-365 ds).</p> <p>-Los perros que experimentaron RC tuvieron un PFI significativamente más</p>	<p>-Los resultados de este estudio proporcionan evidencia de que RAB es un tratamiento eficaz para perros con linfoma de células intermedias a grandes, multicéntrico, sin tratamiento previo, con una tasa de respuesta general del 87 % y una PFI mediana de 122 ds. Los perros con linfoma de células B tenían más probabilidades de responder y tenían un PFI más prolongado que los perros con linfoma de células T.</p> <p>-Los perros con linfoma de células B tenían una ORR más alta del 97 %. Es imposible comparar los resultados del estudio actual con los de otros estudios independientes; sin embargo, es digno de mención que nuestros resultados parecen estar dentro del rango de los reportados para el tratamiento con DOX.</p>

			<p>largo en comparación con los perros que experimentaron PR (199 ds; rango: 67-365 ds frente a 89 ds; rango: 6-179 ds).</p>	<p>-El mecanismo de acción único de RAB lo convierte en un agente atractivo y novedoso que puede combinarse con otros agentes de quimioterapia y / o incorporarse en protocolos basados en CHOP en un intento de extender el tiempo para recaída del linfoma y prolongar la resistencia final a los medicamentos.</p>
--	--	--	--	---

Objetivo 2: Proponer un protocolo terapéutico actualizado para cL, considerando las opciones disponibles.

Protocolo terapéutico

Luego de analizar las publicaciones seleccionadas mediante la revisión sistemática, se observó que no existe un tratamiento específico para esta patología. La terapia debe ser determinada según el estado de la enfermedad, presencia o ausencia de síndrome paraneoplásico y estatus fisiológico general del paciente. Hay otros factores que podrían influir al momento de elegir la terapia, que no tienen que ver con asuntos médicos propiamente tal, sino que con el tutor, como es la capacidad financiera, tiempo disponible y disposición para aceptar todo lo que involucra seguir un tratamiento quimioterápico, como la duración y efectos secundarios. Además, es importante que el tutor esté al tanto del pronóstico, probabilidad de remisión y supervivencia. Ya que son varios los puntos a considerar, es difícil establecer una estrategia de tratamiento única y efectiva. Considerando lo anterior, es que se debe elegir el protocolo más adecuado para el individuo.

Si bien el cL es una enfermedad que no tiene cura, hasta ahora, el objetivo de un buen tratamiento es darle al paciente una buena calidad de vida, llevando al linfoma a remisión por el mayor tiempo posible y disminuir los signos clínicos que se presenten. Por lo tanto, el éxito de un tratamiento dependerá de la resolución o mejoría de los signos clínicos presentes en un inicio y también evitar la recurrencia en los casos más severos.

El esquema terapéutico que se propone a continuación (Figura 4) se diseñó tomando en consideración la forma de presentación DLBCL. Este protocolo se basa en la combinación de CTX, DOX, vincristina y prednisolona (CHOP), por un periodo de 19 semanas, ya que en general se propone que esta combinación de fármacos debe usarse por un periodo de entre 15 a 25 semanas. Comprende cuatro ciclos con un intervalo de una semana sin tratamiento entre ciclos, sin terapia de mantenimiento. La posología de fármacos sería la siguiente: vincristina (0,7 mg / m² IV, semanas: 1, 3, 6, 8, 11, 13, 16 y 18); CTX (250 mg / m² por PO, en la semana: 2, 7, 12 y 17); DOX (30 mg / m² IV o 1 mg / kg IV, según el peso corporal del perro ≥ 15 kg o < 15 kg, respectivamente; en las semanas: 4, 9 y 14); y prednisona (2 mg / kg SID, durante 7 días y disminuyendo gradualmente durante cuatro semanas).

Figura 4: Protocolo CHOP para el tratamiento de linfoma DLBCL																			
Tratamiento/ Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Vincristina (0,7 mg/m ² , IV)	X		X		D	X		X		D	X		X		D	X		X	
Ciclofosfamida (250 mg/m ² , PO)		X			D		X			D		X			D		X		
Doxorrubicina (30 mg/m ² , IV, o 1 mg/kg, IV)				X	D				X	D				X	D				X
Prednisona*																			

*2 mg / kg, PO, SID durante 7 días; 1,5 mg / kg, PO, SID durante 7 días; 1 mg / kg, PO, SID durante 7 días; y 0,5 mg / kg, PO, SID durante 7 días, después de lo cual se interrumpiría la administración de prednisona.

Como se mencionó, este protocolo se diseñó considerando los resultados de nuestra revisión sistemática, y en este sentido elegimos la combinación de los fármacos más utilizados y que es considerado el tratamiento estándar. Para realizar un buen seguimiento del paciente se recomienda la medición del calibre de los nódulos linfáticos periféricos, de acuerdo con los criterios VCOG (Vail *et al.*, 2010), y realizar un hemograma y perfil bioquímico en cada semana de descanso para evaluar la condición general del paciente. Además, se recomienda la utilización de imagenología en el tercer periodo de descanso para determinar el efecto de los 3 ciclos de tratamiento.

Creemos que es importante mencionar y considerar que se pudieran obtener aún mejores resultados, en un futuro cercano, utilizando una estrategia novedosa que sigue en estudio y que actuaría en conjunto con el protocolo propuesto, CHOP, esperando proporcionar una mayor especificidad tumoral y menos toxicidad inespecífica. Se trata de una vacuna autóloga de DLBCL canino, que consiste en proteínas de choque térmico purificadas de tumores de perros (HSPPC) y polvo cerámico de hidroxapatita, como adyuvante. La vacuna HSPPC - HA se prepara a partir de nódulos linfáticos caninos, obtenidos mediante linfadenectomía (detalles de la preparación en Anexo 3), y se administra 0,5 ml vía intradérmica, en las semanas 4, 5, 6, 7, 12 y 16, como se ve en la Figura 5 (Marconato *et al.*, 2014; Marconato *et al.*, 2015).

Tratamiento/ Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Vincristina (0,7 mg/m ² , IV)	X		X	D	X		X		D	X		X		D	X		X		
Ciclofosfamida (250 mg/m ² , PO)		X		D		X			D	X			D	X			X		
Doxorrubicina (30 mg/m ² , IV, o 1 mg/kg, IV)			X	D				X	D				X	D					X
Prednisona*																			

*2 mg / kg, PO, SID durante 7 días; 1,5 mg / kg, PO, SID durante 7 días; 1 mg / kg, PO, SID durante 7 días; y 0,5 mg / kg, PO, SID durante 7 días, después de lo cual se interrumpiría la administración de prednisona.

Figura 5: Propuesta de tratamiento inicial: CHOP + vacuna HSPPC – HA.

La respuesta a la vacuna HSPPC - HA fue evaluada positivamente mediante la detección de la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH), lo que demostró que induce inmunidad contra el linfoma, traduciéndose en una eficacia clínica, es decir, en un aumento significativo de la RC, TTP y LSS en los perros que la recibieron en conjunto con quimioterapia (CHOP + vacuna), comparado con los perros que recibieron quimioterapia y un placebo (Marconato *et al.*, 2014). La combinación CHOP + vacuna mostró una RC del 100 %, lo que es un excelente resultado en comparación con los pacientes tratados con CHOP + placebo, que mostraron RC del 71,4 %. Así también, la LSS del estudio fue de 505 días (media: 468 días), comparado con el grupo control que fue de 159 días (media: 136 días) (Marconato *et al.*, 2014). Estos resultados son excepcionales para los estudios seleccionados en esta revisión.

Hay aristas de esta propuesta que aun requieren mayor investigación como, por ejemplo, cuántas dosis de la vacuna deben administrarse para optimizar el resultado del tratamiento, o si se requiere vacunación a largo plazo (refuerzo) para mantener la respuesta inmune, que controle la carga tumoral por debajo de un nivel clínicamente detectable.

El último escenario terapéutico que queda por cubrir de esta enfermedad son las recaídas, que se define como la reaparición clínica y/o la evidencia citológica de linfoma en cualquier sitio anatómico en perros que habían experimentado RC o RP. El pronóstico para estos pacientes es desfavorable. Los linfomas recidivantes son refractarios a tratamientos posteriores con el régimen de quimioterapia inicial, pudiendo mostrar resistencia cruzada a

una amplia variedad de medicamentos contra el cáncer, lo cual hace a la enfermedad más difícil de controlar. Es por esto que creemos conveniente proponer un protocolo de rescate con fármacos diferentes al protocolo terapéutico inicial. Nuestra propuesta para diseñar el protocolo de rescate se basa en los mismos estudios, considerando 2 aspectos principales: no repetir los fármacos ya utilizados, y que estos no usen el mismo mecanismo de acción que los medicamentos iniciales.

Se proponen dos esquemas terapéuticos para linfomas refractarios. El primero involucra: 1) un agente alquilante, Lomustina, administrado por vía oral a una dosis de 70 mg / m² para perros sobre 15 kg y, de 60 mg / m² en perros menores a 15 kg, cada 3 semanas hasta un total de 5 dosis o hasta la progresión de la enfermedad; 2) una enzima, L-ASP, administrada por vía IM a una dosis de 400 UI/kg al mismo tiempo que los 2 primeros tratamientos con Lomustina, luego se suspendería; 3) la prednisona se administraría en conjunto con los otros dos fármacos, en dosis decrecientes a lo largo del protocolo, con una dosis inicial de 2 mg / kg PO una vez al día, y que finalmente se reduciría a 1 mg / kg PO cada 48 h. Esta información fue revisada por Marconato y cols. en 2011, y fue considerada la mejor propuesta como tratamiento a linfomas refractarios en una encuesta realizada a Médicos Veterinarios (Regan *et al.*, 2013). La neutropenia puede ser el principal efecto tóxico de este protocolo, por lo que se propone realizar hemogramas semanales y un análisis bioquímico completo cada 2 semanas (Rassnick *et al.*, 2014).

El segundo esquema terapéutico que proponemos para perros con linfoma recidivante involucra dos medicamentos, uno de ellos recientemente aprobado por la FDA; este es RAB, que se utilizaría en dosis de 0,82 mg/kg, como una infusión IV de 30 minutos cada 21 días, durante un máximo de 5 tratamientos (Saba *et al.*, 2017); L-ASP se administraría a 400 UI / kg por vía SC, al mismo tiempo que los 2 primeros tratamientos de RAB. La combinación RAB / L-ASP fue probada por Cawley y cols. en el 2020, donde concluyeron que es eficaz y segura para el tratamiento del linfoma multicéntrico recidivante en perros. La otra asociación sugerida es RAB / DOX, combinación que fue bien tolerada en los pacientes que la recibieron, alternando RAB (1,0 mg / kg IV, semanas: 0, 6, 12) y DOX (30 mg / m² IV, semanas: 3, 9, 15), logrando RC del 68 % en cL recidivantes.

DISCUSIÓN

El linfoma es uno de los tumores malignos más comunes en el perro y corresponde a una proliferación de células linfoides, que afectan principalmente a los linfonodos u órganos sólidos. El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), es de los cL de mayor incidencia. Del buen diagnóstico depende la selección correcta del tratamiento más idóneo para el paciente. La quimioterapia es la herramienta de elección en búsqueda de una remisión completa del linfoma, a largo plazo, con resolución de los signos clínicos y mejoría de la calidad de vida del paciente, generando la mínima toxicidad posible.

Para el desarrollo de esta monografía realizamos una búsqueda bibliográfica utilizando una lista predefinida de palabras claves, para realizar una selección objetiva de artículos que nos permitieran proponer un protocolo terapéutico para el DLBCL canino. La utilización del método PRISMA (Figura 2) nos permitió compilar publicaciones sobre este tema, las que fueron discriminadas según criterios de inclusión y exclusión, filtrando los estudios más avanzados que se enfocaban estrictamente en probar fármacos o combinación de ellos, para luego ser caracterizados según las exigencias del estudio (GDE) (Tabla 2). Esta forma de clasificación de las publicaciones permitió soslayar limitaciones significativas que surgen cuando se comparan estudios con distintos protocolos experimentales, abarcando conceptos como: prospectivo/ retrospectivos, aleatorio o no, ciego o no, entre otros. De esta manera, se eliminaron todos aquellos trabajos realizados en líneas celulares, estudios de fase 1 y 2, cL de células T, otras presentaciones del cL o que estaban enfocados solo en el pronóstico de la enfermedad. Con todo esto, nuestra monografía quedó sustentada en 14 estudios que fueron analizados íntegramente, cuya información fue resumida, caracterizada y comparada en diferentes tablas (Tablas 3- 9, Anexo 1).

Los artículos seleccionados pasaron por una etapa de caracterización temprana en que observamos su año de publicación (Figura 3), encontrado dos grupos marcados, uno a principios de la década y otro al final de esta, mostrando que la investigación que aborda la terapéutica del cL no es constante, y solo en algunos casos persevera en el tiempo.

Como se mencionó anteriormente, el método PRISMA permitió realizar una clasificación de los artículos seleccionados, considerando el GDE de cada estudio (Tabla 3). De esta manera,

podimos conocer el nivel de exigencia en la elaboración y desarrollo de la investigación y así saber si la forma de abordar los objetivos del trabajo reflejaba la correcta aplicación del método científico. Esto también podría ser un indicador de la calidad de los resultados. Entonces, en la Tabla 3 observamos que solo uno de los trabajos cumple con los requisitos para ser clasificado como GDE I, y la gran mayoría entra en la clasificación II, solo por el hecho de no ser estudios ciegos, lo que no implica un desmedro importante en su calidad, siendo igualmente considerados para el desarrollo de nuestra propuesta. Otra cosa ocurre con los dos trabajos calificados como GDE III, que no presentan grupo control, y por lo tanto, son estudios que no permiten comparar los efectos de su tratamiento, sino que solo describirlos, lo que claramente es una desventaja y no fueron considerados directamente para nuestra propuesta. Finalmente, dos artículos fueron calificados como GDE IV por el solo hecho de ser de tipo retrospectivo, lo que los hace ser trabajos con posibles debilidades al momento del registro y recopilación de la información utilizada (quién hizo los registros, cómo se hicieron los registros, detalles de cómo se realizaron los tratamientos, entre otros), por lo tanto, se consideran de menor calidad que uno de tipo prospectivo, por lo que nuevamente no fueron incluidos explícitamente en el desarrollo de la propuesta terapéutica.

Siguiendo con el análisis de los estudios elegidos, quisimos relacionar el GDE con el índice de impacto de las revistas donde fueron publicados dichos artículos (Tabla 4). El índice de impacto es un instrumento para comparar revistas científicas y evaluar la importancia relativa de cada una, según las citas recibidas por los artículos que publica (Universidad de Chile, 2022). Es así como en algunos casos pudimos encontrar una correlación entre el GDE y el índice de impacto de la revista. El artículo calificado con el mejor GDE también fue publicado en una revista de alto índice de impacto (12,5) (Marconato *et al.*, 2014). Lo mismo ocurre cuando vemos que un trabajo calificado como GDE II fue publicado en una revista con 5,69 de índice de impacto (Gavazza *et al.*, 2013) y, por último, siguiendo esta correlación, tenemos que la continuación del trabajo de Marconato y cols. (2015b), fue clasificado como GDE III y publicado en una revista de con impacto 3,6, por lo que podríamos afirmar que existe algún grado de correlación entre ambos parámetros, considerándolo un patrón de calidad y confianza en un estudio. Cabe destacar que, las investigaciones lideradas por Gavazza y Marconato (3 artículos), fueron publicadas en revistas fuera del área específica de la medicina veterinaria, lo que se debe a que el cL es un modelo para el linfoma humano y

por lo tanto, sus avances pudieran ser utilizados en medicina humana, y más aún, son trabajos que abordan mecanismos de inmunoterapia, por lo que podrían ser potenciales herramientas terapéuticas en ambas especies.

Por otro lado, el resto de los estudios seleccionados, calificados entre GDE II- IV fueron publicados en forma indistinta en revistas del área de la medicina veterinaria con índices de impacto entre 0,99 y 3,3, sin que se vea una correlación clara entre ambos indicadores. Esto podría deberse a que al momento de decidir dónde publicar un artículo hay otros factores que influyen en la decisión del autor o del comité editorial, como son el n del trabajo, la estadística utilizada, el enfoque u objetivo final de la investigación, entre otros.

En el proceso de evaluación de la eficacia terapéutica en la literatura revisada, hubo una gran discrepancia en la evaluación clínica de los enfermos como, por ejemplo, no todos los estudios realizaban seguimiento del paciente a través de imagenología, que es la herramienta de elección para este propósito (incluso en los estudios con buen GDE). Por esta razón fue que, para comparar el éxito de los protocolos terapéuticos se utilizó la propuesta del “*Veterinary Cooperative Oncology Group*” (VCOG), publicada el 2010, que sugiere la utilización de la medición de los nódulos linfáticos periféricos como criterio de evaluación. Para esto se consideraron los siguientes parámetros: Remisión Completa, Parcial, Enfermedad Estable o Progresiva (RC, RP, SD o EP, respectivamente) (Vail *et al.*, 2010). Así también, se consideró como parámetro de comparación la medición de la duración de la respuesta, aunque luego de nuestra revisión sistemática podemos decir que este no es un criterio tan unificado entre los autores, ya que algunos la definen desde el inicio del tratamiento, otros desde el término del protocolo y otros desde el inicio de la remisión (Lucas *et al.*, 2013; Thamm *et al.*, 2017; Cawley *et al.*, 2020). Esto último determina un desafío al momento de comparar las respuestas y determinar cuál es mejor, por lo que, finalmente nos enfocamos en el tipo de respuesta alcanzado (Tabla 9), más que en el tiempo de duración.

Al analizar en profundidad cada trabajo de nuestra revisión sistemática pudimos destacar que la mayoría utiliza una combinación de fármacos (Tabla 5), que abordan distintos mecanismos de acción contra diferentes propiedades de las células tumorales, para obtener mejores respuestas al tratamiento y retrasando el desarrollo de la resistencia a drogas, que es una manifestación bastante frecuente (Vos *et al.*, 2019). En general, los protocolos

quimioterápicos combinados (multimodales) son más complejos, tienen mayor costo, requieren de más tiempo, además de presentar mayor toxicidad (efectos secundarios), en comparación con protocolos simples (monomodales), pero al mismo tiempo tienen mejores resultados al evaluar el tiempo libre de enfermedad (Rassnick *et al.*, 2014). Los estudios veterinarios que evalúan los efectos de los fármacos de forma individual no son muchos, ya que la mayoría de los protocolos utilizados en medicina veterinaria se han extrapolado de los utilizados en humanos. Por lo anterior, un tema recurrente en estos estudios es la declaración final que apunta a que "*se requerirán ensayos aleatorios prospectivos para confirmar estos hallazgos sugerentes*", es decir, falta evidencia prospectiva aleatorizada en perros para recomendar claramente un protocolo por sobre el otro, y por lo tanto, la elección de un protocolo sigue siendo un asunto asociado a la experiencia de cada clínico.

De todos los trabajos incluidos en nuestra revisión, 11 corresponden a terapias de tipo multimodales (Tabla 5) y solo 3 se enfocan en un medicamento específico, aunque en realidad solo abordan el uso de DOX y RAB (Tabla 6). La DOX es el fármaco de uso más frecuente (Tabla 7) y que al ser utilizado como terapia monomodal muestra un éxito relativo, ya que, no alcanza ni el tipo ni los tiempos de respuesta similares a lo que entrega la terapia clásica, en la cual se usa en combinación con otros medicamentos (ejemplo, CHOP), sin embargo, demuestra ser una alternativa para pacientes con tutores con recursos y tiempo limitado (Higginbotham *et al.*, 2013). Por otro lado, la RAB es un fármaco desarrollado desde hace un poco más de una década cuyo enfoque principal fue su utilización en terapias de rescate (tratamiento posterior a la reincidencia del linfoma) y fue recientemente aprobado por la FDA de EE.UU. Solo 2 artículos de nuestra revisión lo utilizan como terapia monomodal, aunque en el primero se utiliza en un protocolo de rescate con una RC solo del 50 % (Saba *et al.*, 2017), por lo que posteriormente, se evaluó también en combinación con otros fármacos y se obtuvo mejores resultados al usarla junto con DOX (Thamm *et al.*, 2017) y L-ASP (Cawley *et al.*, 2020). Más recientemente se evaluó la utilización de RAB como terapia de inicio, obteniéndose una RC de hasta el 52 %, por lo que se ha sugerido la realización de futuros estudios que prueben su efecto junto a la terapia CHOP (Saba *et al.*, 2020). Todo esto nos hace presumir que la RAB podría ser una buena alternativa para el tratamiento de rescate del cL, cuando esté disponible en Chile, sin embargo, su uso como terapia de inicio aún está en estudio.

En la actualidad está bastante establecido que los protocolos quimioterápicos utilizados en cL de grado intermedio y alto son esencialmente variaciones del protocolo CHOP, es decir, estamos hablando de un grupo de 3 a 5 fármacos en distintas combinaciones, como por ejemplo COP, L-COP, CHOP, L-CHOP, entre otros. Además, los perros con linfoma de células B tendrían una probabilidad significativamente mayor de responder, en comparación con aquellos con linfoma de células T (Saba *et al.*, 2020), con un PFI de 63 días (rango 14-428 días) para el linfoma de células B y de 43 días (5-86 días) para los perros con linfoma de células T (Cawley *et al.*, 2020).

La preferencia por los protocolos CHOP se confirma en nuestra revisión (los 14 artículos seleccionados), y se ve reflejado en el resumen de frecuencia de uso de medicamentos quimioterápicos (Tabla 7), ya que de una u otra forma la mayoría de los artículos usa una variante de CHOP. Esto nos indica, además, que a pesar de que a lo largo de los años persiste la búsqueda de nuevos tratamientos, la terapia CHOP sigue siendo la de elección para abordar el linfoma o como punto de comparación en el estudio de nuevos protocolos que adicionan otros tipos de terapia, como por ejemplo la inmunoterapia en los trabajos de Marconato y cols. que utilizan una vacuna autóloga (2014, 2015 y 2017), o Gavazza y cols. (2013) con su vacuna dirigidas a la telomerasa. Es por esta razón que, en cumplimiento de nuestro objetivo, seleccionamos la terapia CHOP, como concepto general, pero intentamos seleccionar la mejor versión de ella, y la complementamos con otra alternativa terapéutica como lo es la vacuna autóloga del propio linfonodo del paciente.

Dentro de las variables que tiene el protocolo CHOP están la dosis y la frecuencia de cada medicamento, así como la duración del protocolo, lo cual es decisión del médico veterinario, para el caso particular de cada individuo. Para tomar esta decisión, el médico debe considerar la eficacia del protocolo, los eventos adversos y su propia experiencia con ellos, así como también el costo y el compromiso de tiempo involucrado (Vail *et al.*, 2019). Es así como nuestra propuesta considera la utilización de cada medicamento en una dosis dentro de los rangos recomendados, para evitar efectos adversos, como ocurre por ejemplo con la CTX, la que pudiera causar cistitis hemorrágica estéril (Lee *et al.*, 2020), o con la DOX que pudiera causar toxicidad miocárdica, que es acumulativa y limita la dosis (Lori *et al.*, 2010), y la

Vincristina por su parte puede generar toxicidad gastrointestinal, pero es poco frecuente (Harding *et al.*, 2018).

Para la determinación de la duración de un protocolo CHOP es importante considerar que existen pocos estudios sobre el impacto de esta en el tiempo de remisión o la supervivencia de los pacientes. En el caso de nuestras publicaciones seleccionadas, se utilizaron periodos que van de 18 a 20 semanas. En literatura complementaria a nuestra búsqueda sistemática encontramos una publicación donde se compilan opiniones y experiencias de médicos veterinarios en el tratamiento de cL. En esta se expone que el 50 % de los clínicos utilizan protocolos que tiene una duración entre 24 a 28 semanas, el 10 % informó que usa protocolos ≤ 16 semanas y el 8 % informó usar protocolos ≥ 19 meses (Regan *et al.*, 2013).

En este sentido, el año 2019, Vos *et al.* compararon protocolos de 12 y 19 semanas (CHOP12 y CHOP19), donde determinaron que el segundo grupo presentó tiempos de supervivencia similares a los protocolos de 25 semanas (CHOP25), permitiendo considerar el acortamiento de la duración del tratamiento a las 19 semanas. Esto permite mayor factibilidad de que los tutores realicen el tratamiento, debido a la disminución del compromiso temporal, manteniendo las dosis utilizadas en protocolos de mayor duración, reduciendo la posibilidad de presentar resistencia a drogas. Por su parte, un CHOP12 sin "descansos" (semana sin tratamiento), dio como resultado un tiempo de supervivencia similar al de un CHOP19, lo que permitiría aumentar la dosis de algunos de los medicamentos, y disminuir el compromiso de tiempo y la carga financiera sobre el tutor (Vos *et al.*, 2019). Sin embargo, consideramos que aumentar la dosis pudiera ser riesgoso por los posibles efectos secundarios, por lo tanto, esperamos que puedan realizarse mayor cantidad de estudios al respecto para evaluar esta posibilidad. También se ha evaluado recientemente la utilización de un CHOP15 a dosis intensas que ha dado como resultado tiempos de supervivencia similares en comparación con los controles históricos tratados con protocolos CHOP más prolongados (Burton *et al.* y Curran y Thamm). Por todo lo anterior, proponemos un CHOP19, considerada la extensión más exitosa en la actualidad, con un RC de 89,5 % y PFS de 245 días (Vos *et al.*, 2019), en base a todos artículos revisados para este estudio (14) y la literatura complementaria encontrada.

La disposición en el tiempo del protocolo quimioterápico lo diseñamos en 4 ciclos de 4 semanas, separados por una semana de descanso entre ciclos, lo que es bastante estándar entre la literatura de nuestra revisión como en la complementaria. Se ha visto que no es necesario en todos los casos la realización de descansos, sin embargo, hay pacientes que requieren de esta pausa que les permita mantener los niveles de células sanguíneas dentro de los rangos recomendados (Vail *et al.*, 2019), y por lo tanto, es un periodo de tiempo que también le sirve al clínico para evaluar la respuesta del paciente y eventualmente reducir la dosis de alguno de los medicamentos a sus rango mínimo recomendado.

Como terapia complementaria proponemos la utilización de la vacuna autóloga de linfonodos neoplásicos, la que busca proporcionar una mayor especificidad tumoral y menos toxicidad inespecífica. Esta vacuna apunta a generar una respuesta inmune específica contra las proteínas de choque térmico, las cuales son purificadas desde el tumor y utilizadas como antígenos al ser inoculadas en el mismo paciente. Además, utiliza polvo cerámico de hidroxiapatita como adyuvante, lo que potencia la respuesta inmune. Sobre la base de los resultados de los estudios de Marconato *et al.* de 2014 y 2015, la vacuna genera respuesta inmune activa (DTH positivo), con potencial de combatir las células de DLBCL residuales al tratamiento quimioterápico, lo que lleva a una RC del 100 % de los pacientes tratados, y una LSS prolongada (Marconato *et al.*, 2014; Marcomato *et al.*, 2015b), lo que la transforma en una excelente terapia complementaria de elección para nuestra propuesta. La principal desventaja de esta vacuna es que se requiere de personal capacitado e instalaciones con características de bioseguridad e inocuidad especiales para su implementación (Anexo 3) (Marconato *et al.*, 2014; Marconato *et al.*, 2015b).

De las otras posibles terapias complementarias, la vacuna contra la telomerasa mostró buenos resultados en el año 2013, pero no presenta continuidad de su estudio a lo largo de los años y tampoco antecedentes de que este en proceso de patente. En el caso de RAB, como ya se mencionó, sus resultados como monoterapia no son comparables con CHOP, sin embargo, aún no hay estudios de su utilización con CHOP como terapia de inicio, por lo que, pese a ser prometedora, aun no es posible recomendar su utilización.

El protocolo propuesto no tiene un componente de mantenimiento, ya que todos los tratamientos cesarían a las 19 semanas, siempre y cuando el animal esté en remisión clínica

completa. Si el paciente presenta RP se debe evaluar el caso particularmente, y si está en condiciones de extender la quimioterapia, esta podría continuar durante un ciclo más. Aunque varios otros protocolos basados en CHOP incluyen L-ASP, ya sea al inicio o en diferentes momentos a lo largo del protocolo, algunos sugieren que esto no da como resultado aumentos clínicamente relevantes en la tasa de remisión, la velocidad para llegar a ella o la duración de la primera remisión y, por lo tanto, nos reservamos su uso para un protocolo de rescate (Vail *et al.*, 2019).

Por todo lo anterior mencionado, aunque la mayoría de los pacientes con cL tratados con protocolo CHOP logran una RC, con resolución de signos clínicos y una evidente mejoría en su calidad de vida, este no es sostenido en el tiempo y si el paciente ya no responde a los medicamento de inicio probablemente es porque se vuelve resistente a ellos. Es aquí donde se comienza con el denominado protocolo de rescate, que en un intento de que nuevos medicamentos o combinaciones de estos produzcan una respuesta. La quimioterapia de rescate generalmente no es tan efectiva como la quimioterapia de primera línea, con tasas de respuesta general (ORR) del 7 al 72 % durante 1 a 5 meses (Back *et al.*, 2016). El protocolo de rescate más estudiado y utilizado es Lomustina, como agente único o en combinación con L-ASP y prednisona (Regan *et al.*, 2013). Este protocolo presenta una ORR del 77% (Saba *et al.*, 2009). Sin embargo, como mencionamos anteriormente en la discusión, RAB ha emergido como una alternativa en esta etapa del tratamiento, ya sea como agente único o en combinación con L-ASP, presentando un RC del 41% (ORR del 67 %) (Cawley *et al.*, 2019). También la proponen en combinación con DOX, logrando un RC del 68 % (ORR del 84 %) (Thamm *et al.*, 2017). Por esta razón, no podemos dejar a RAB fuera de nuestra propuesta de tratamiento, aunque por no estar todavía disponible en nuestro país, mantenemos como sugerencia de rescate a la combinación Lombustina + L-ASP + prednisona, principalmente porque son medicamentos no incluidos en la terapia inicial, evitando así la resistencia quimioterápica y abordando nuevos mecanismos de acción.

Finalmente, hasta ahora no hay estudios publicados que evalúen los protocolos de quimioterapia para tratar linfomas refractarios o recaídas de dos o más veces, por lo tanto, la realización de un nuevo protocolo terapéutico dependerá de la decisión del Médico Veterinario, basada en la información clínica del paciente en ese momento. Además, el

tratamiento en este entorno suele ser un desafío clínico, ya que la enfermedad es resistente a múltiples fármacos y la respuesta del paciente a tratamientos a esta altura suele ser menor que en el primer intento (Lenz *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

- CHOP sigue siendo la terapia de elección para el primer abordaje del cL.
- La actualización del protocolo CHOP se basa en el manejo de la duración del protocolo y dosis de los medicamentos, para reducir al máximo los efectos secundarios y la multiresistencia a drogas.
- La mayoría de las investigaciones apuntan a mejorar los resultados de CHOP asociándolo con otros quimioterápicos (ejemplo RAB) o inmunoterapia (ejemplo, vacuna autóloga o contra telomerasa), buscando una mayor especificidad y menor toxicidad.
- La vacuna autóloga ha demostrado ser una excelente terapia complementaria para CHOP, sin embargo, a la fecha la implementación de esta terapia es compleja, por lo que creemos que esta línea de investigación debería avanzar en el desarrollo de un kit o protocolo más accesible de realizar en la clínica diaria.
- En nuestra revisión sistemática los artículos seleccionados utilizan el sistema VCOG para evaluar los resultados de sus tratamientos, lo que por una parte es positivo ya que permite estandarizar el análisis de los resultados, sin embargo, para alguno de los parámetros no existe una definición unificada, lo que finalmente se traduce en discrepancias al momento de la comparación de los datos.

BIBLIOGRAFÍA

Aresu, L.; Aricò, A.; Ferrareso, S.; Martini, V.; Comazzi, S.; Riondato, F.; Giantin, M.; Dacasto, M.; Guadagnin, E.; Frayssinet, P.; Rouquet, N.; Drigo, M.; Marconato, L. 2014. Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. *The Veterinary Journal*. 200(2):318-324.

Aresu, L.; Martini, V.; Rossi, F.; Vignoli, M.; Sampaolo, M.; Aricò, A.; Laganga, P.; Pierini, A.; Frayssinet, P.; Mantovani, R.; Marconato, L. 2015. Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. *Veterinary and Comparative Oncology*. 13(4):348-362.

Aresu, L.; Ferrareso, S.; Marconato, L.; Cascione, L.; Napoli, S.; Gaudio, E.; Kwee, I.; Tarantelli, C.; Testa, A.; Maniaci, C.; Ciulli, A.; Hillmann, P.; Bohnacket, T.; Wymann, P.; Comazzi, S.; Milam, M.; Riondato, F.; Rovere, G.; Giantin, M.; Giannuzzi, D.; Bertoni, F. 2018. New molecular and therapeutic insights into canine diffuse large B cell lymphoma elucidates the role of the dog as a model for human disease. *The American Society of Hematology*. 132:4173-4173.

Aricò, A.; Ferrareso, S.; Bresolin, S.; Marconato, L.; Comazzi, S.; Te Kronnie, G.; Aresu, L. 2014. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals chromosomal copy number aberrations associated with clinical outcome in canine diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One*. 9(11): e111817.

Avendaño, C.; Menéndez, J. C. 2008. Anticancer drugs acting via radical species, photosensitizers and photodynamic therapy of cancer. **In:** *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 2ª ed. Elsevier. Ámsterdam, Países Bajos. pp. 93-138.

Back, A. R.; Schleis, S. E.; Smrkovski, O. A.; Lee, J.; Smith, A. N.; Phillips, J. C. 2015. Mechlorethamine, vincristine, melphalan and prednisone (MOMP) for the treatment of relapsed lymphoma in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*. 13(4):398-408.

Baxter, D. 2014. Active and passive immunization for cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 10(7): 2123-2129.

Bentley, R. T.; Thomovsky, S. A.; Miller, M. A.; Knapp, D. W.; Cohen-Gadol, A. A. 2018. Canine (pet dog) tumor microsurgery and intratumoral concentration and safety of metronomic chlorambucil for spontaneous glioma: a phase I clinical trial. *World Neurosurgery*. 116:e534-e542.

Bergh, M.; Budsberg, S. 2014. A systematic review of the literature describing the efficacy of surgical treatments for canine hip dysplasia (1948-2012). *Veterinary Surgery*. 43(5):501-506.

Blake, M. K.; Carr, B. J.; Mauldin, G. E. 2016. Hypersensitivity reactions associated with L-asparaginase administration in 142 dogs and 68 cats with lymphoid malignancies: 2007–2012. *The Canadian Veterinary Journal*. 57(2): 176- 182.

Bijelic, L.; Sugarbaker, P. H.; Stuart, O. A. 2012. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with melphalan: a summary of clinical and pharmacological data in 34 patients. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012:1-5.

Burkhard, M. J.; Bienzle, D. 2015. Making sense of lymphoma diagnostics in small animal patients. *Clinics in Laboratory Medicine*. 35(3):591-607.

Burton, J. H.; Garrett-Mayer, E.; Thamm, D. H. 2013. Evaluation of a 15-week CHOP protocol for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*. 11(4): 306-315.

Bushell, K. R.; Kim, Y.; Chan, F. C.; Ben-Neriah, S.; Jenks, A.; Alcaide, M.; Fornika, D.; Grande, B. M.; Arthur, S.; Gascoyne, R. D.; Steidl, C.; Morin, R. D. 2015. Genetic inactivation of TRAF3 in canine and human B-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 125(6):999-1005.

Cannon, C.; Borgatti, A.; Henson, M.; Husbands, B. 2015. Evaluation of a combination chemotherapy protocol including lomustine and doxorubicin in canine histiocytic sarcoma. *Journal of Small Animal Practice*. 56(7):425-429.

Cawley, J. R.; Wright, Z. M.; Meleo, K.; Post, G. S.; Clifford, C. A.; Vickery, K. R.; Vali, D. M.; Bergman, P. J.; Thamm, D. H. 2020. Concurrent use of rabacfosadine and L-asparaginase for relapsed or refractory multicentric lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 34(2):882-889.

Chikazawa, S.; Dunning, M. D. 2016. A review of anaemia of inflammatory disease in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*. 57(7): 348-353.

Childress, M. O.; Ramos-Vara, J. A.; Ruple, A. 2016. A randomized controlled trial of the effect of prednisone omission from a multidrug chemotherapy protocol on treatment outcome in dogs with peripheral nodal lymphomas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 249(9):1067-1078.

Comazzi, S.; Cozzi, M.; Bernardi, S.; Zanella, D. R.; Aresu, L.; Stefanello, D.; Marconato, L.; Martini, V. 2018. Effects of pre-analytical variables on flow cytometric diagnosis of canine lymphoma: A retrospective study (2009–2015). *The Veterinary Journal*. 232: 65-69.

Cortes, C. L.; Veiga, S. R.; Almacellas, E.; Hernández-Losa, J.; Ferreres, J. C.; Kozma, S. C.; Ambrosio, S.; Thomas, G.; Tauler, A. 2016. Effect of low doses of actinomycin D on neuroblastoma cell lines. *Molecular Cancer*. 15(1):1-13.

Curran, K.; Thamm, D. H. 2016. Retrospective analysis for treatment of naive canine multicentric lymphoma with a 15-week, maintenance-free CHOP protocol. *Veterinary and Comparative Oncology*. 14: 147-155.

De Leval, L.; Jaffe, E. S. 2020. Lymphoma classification. *The Cancer Journal*. 26(3): 176-185.

Di Bella, A.; Maurella, C.; Cauvin, A.; Schmidt, J. M.; Tapia, B. B.; North, S. M. 2013. Proteinuria in canine patients with lymphoma. *Journal of Small Animal Practice*. 54(1): 28-32.

Dias, J. N.; Lopes, M.; Peleteiro, C.; Vicente, G.; Nunes, T.; Mateus, L.; Aires-da-Silva, F.; Tavares, L.; Gil, S. 2019. Canine multicentric lymphoma exhibits systemic and

intratumoral cytokine dysregulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 218: 1-9.

El-Subbagh, H. I.; Al-Badr, A. A. 2009. Cytarabine. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. Academic Press. 34:37-113.

Elvers, I.; Turner-Maier, J.; Swofford, R.; Koltookian, M.; Johnson, J.; Stewart, C.; Zhang, C.; Schumacher, S. E.; Beroukhim, R.; Rosenberg, M.; Thomas, R.; Mauceli, E.; Getz, G.; Di Palma, F.; Modiano, J. F.; Breen, M.; Lindblad-Toh, K.; Alföldi, J. 2015. Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns reflecting genetic background. *Genome Research*. 25(11):1634-1645.

Frantz, A. M.; Sarver, A. L.; Ito, D.; Phang, T. L.; Karimpour-Fard, A.; Scott, M. C.; Valli, V. E.; Lindblad-Toh, K.; Burgess, K.; Husbands, B.; Henson, M.; Borgatti, A.; Kisseberth, W. C.; Hunter, L. E.; Breen, M.; O'Brien, T. D.; Modiano, J. F. 2013. Molecular profiling reveals prognostically significant subtypes of canine lymphoma. *Veterinary Pathology*. 50(4):693-703.

Gavazza, A.; Presciuttini, S.; Barale, R.; Lubas, G.; Gugliucci, B. 2001. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 15(3): 190-195.

Gavazza, A.; Lubas, G.; Valori, E.; Gugliucci, B. 2008. Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. *Veterinary Research Communications*. 32(1): 291-293.

Gavazza, A.; Lubas, G.; Fridman, A.; Peruzzi, D.; Impellizeri, J. A.; Luberto, L.; Marra, E.; Roscilli, G.; Ciliberto, G.; Aurisicchio, L. 2013. Safety and efficacy of a genetic vaccine targeting telomerase plus chemotherapy for the therapy of canine B-cell lymphoma. *Human Gene Therapy*. 24(8):728-738.

Geyer, N. E.; Reichle, J. K.; Valdés-Martínez, A.; Williams, J.; Goggin, J. M.; Leach, L.; Hanson, J.; Hill, S.; Axam, T. 2010. Radiographic appearance of confirmed pulmonary lymphoma in cats and dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 51(4): 386-390.

Giannuzzi, D.; Marconato, L.; Cascione, L.; Comazzi, S.; Elgendy, R.; Pegolo, S.; Cecchinato, A.; Bertoni, F.; Aresu, L.; Ferraresso, S. 2019. Mutational landscape of canine B-cell lymphoma profiled at single nucleotide resolution by RNA-seq. *PLoS One*. 14(4):e0215154.

Giles, A. J.; Hutchinson, M. K. N.; Sonnemann, H. M.; Jung, J.; Fecci, P. E.; Ratnam, N. M.; Zhang, W.; Song, H.; Bailey, R.; Davis, D.; Reid, C. M.; Park, D. M.; Gilbert, M. R. 2018. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 6(1):1-13.

Gullà, A.; Di Martino, M. T.; Cantafio, M. E. G.; Morelli, E.; Amodio, N.; Botta, C.; Pitari, M. R.; Lio, S. G.; Britti, D.; Stamato, M. A.; Hideshima, T.; Munshi, N. C.; Anderson, K. C.; Taglaaferri, P.; Tassone, P. 2016. A 13 mer LNA-i-miR-221 inhibitor restores drug sensitivity in melphalan-refractory multiple myeloma cells. *Clinical Cancer Research*. 22(5):1222-1233.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-674.

Harding, K.; Bergman, N.; Smith, A.; Lindley, S.; Szivek, A.; Milner, R.; Brawner, W.; Lejeune, A. 2018. Response rate to a single dose of vinblastine administered to dogs with treatment-naïve multicentric lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*. 16(4):636-641.

Harrison, T. S.; Lyseng-Williamson, K. A. 2013. Vincristine sulfate liposome injection. *BioDrugs*, 27(1):69-74.

Heading, K. L.; Brockley, L. K.; Bennett, P. F. 2011. CCNU (lomustine) toxicity in dogs: a retrospective study (2002–07). *Australian Veterinary Journal*. 89(4):109-116.

Henriques, J.; Felisberto, R.; Constantino-Casas, F.; Cabeçadas, J.; Dobson, J. 2021. Peripheral blood cell ratios as prognostic factors in canine diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP protocol. *Veterinary and Comparative Oncology*. 19(2):242-252.

Higginbotham, M. L.; McCaw, D. L.; Roush, J. K.; Nietfeld, J. C.; Wilkerson, M. J.; Reeds, K.; Burr, D. 2013. Intermittent single-agent doxorubicin for the treatment of canine B-cell lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 49(6):357-362.

Hossain, M. A.; Park, J.; Choi, S. H.; Kim, G. 2008. Dexamethasone induces apoptosis in proliferative canine tendon cells and chondrocytes. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. 21(04):337-342.

Jeglum, K. A.; Young, K. M.; Barnsley, K.; Whereat, A. 1988. Chemotherapy versus chemotherapy with intralymphatic tumor cell vaccine in canine lymphoma. *Cancer*. 61(10):2042-2050.

Kastl, B. 2020. Beyond Cytologic Evaluation: Advanced Diagnostic Techniques for Canine Lymphomas. *Advances in Small Animal Medicine and Surgery*. 33(8):1-3.

Keglevich, P.; Hazai, L.; Kalaus, G.; Szántay, C. 2012. Modifications on the basic skeletons of vinblastine and vincristine. *Molecules*. 17(5):5893-5914.

Lee, J. J.; Liao, A. T.; Wang, S. L. 2020. Outcome of canine multicentric lymphoma after single or divided treatment with cyclophosphamide in multidrug chemotherapy. *Topics in Companion Animal Medicine*. 41:1-17.

Lenz, J. A.; Robot, C. S.; Stein, T. J. 2016. Vinblastine as a second rescue for the treatment of canine multicentric lymphoma in 39 cases (2005 to 2014). *Journal of Small Animal Practice*. 57(8): 429-434.

Leval, L.; Jaffe, E. S. 2020. Lymphoma classification. *The Cancer Journal*. 26(3):176-185.

Li, Y. L.; Pan, Y. Y.; Jiao, Y.; Ning, J.; Fan, Y. G.; Zhai, Z. M. 2014. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio predicts outcome for patients with diffuse large B cell lymphoma after standard first-line regimens. *Annals of hematology*. 93(4): 617-626.

London, C. A.; Bernabe, L. F.; Barnard, S.; Kisseberth, W. C.; Borgatti, A.; Henson, M.; Wilson, H.; Jensen, K.; Ito, D.; Modiano, J. F.; Bear, M. D.; Pennell, M. L.; Saint-Martin, J.; McCauley, D.; Kauffman, M.; Shacham, S. 2014. Preclinical evaluation of the

novel, orally bioavailable Selective Inhibitor of Nuclear Export (SINE) KPT-335 in spontaneous canine cancer: results of a phase I study. *PloS One*. 9(2):e87585.

Lori, J. C.; Stein, T. J.; Thamm, D. H. 2010. Doxorubicin and cyclophosphamide for the treatment of canine lymphoma: a randomized, placebo-controlled study. *Veterinary and Comparative Oncology*. 8(3):188-195.

Lowrie, M.; Thomson, S.; Smith, P.; Garosi, L. 2016. Effect of a constant rate infusion of cytosine arabinoside on mortality in dogs with meningoencephalitis of unknown origin. *The Veterinary Journal*. 213:1-5.

Lucas, S. R. R.; Maranhão, R. C.; Guerra, J. L.; Coelho, B. M. P.; Barboza, R.; Pozzi, D. H. B. 2013. Pilot clinical study of carmustine associated with a lipid nanoemulsion in combination with vincristine and prednisone for the treatment of canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*. 13(3):184-193.

Marconato, L.; Leo, C.; Girelli, R.; Salvi, S.; Abramo, F.; Bettini, G.; Comazzi, P.; Nardi, P.; Albanese, E.; Zini, E. 2009. Association between waste management and cancer in companion animals. *Journal of veterinary internal medicine*. 23(3): 564-569.

Marconato, L. 2011. The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: a review of recent developments and future prospects. *The Veterinary Journal*. 188(1):34-38.

Marconato, L.; Gelain, M. E.; Comazzi, S. 2013a. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematological Oncology*. 31(1):1-9.

Marconato, L.; Martini, V.; Aresu, L.; Sampaolo, M.; Valentini, F.; Rinaldi, V.; Comazzi, S. 2013b. Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: prognostic significance and proposal of a cut-off value. *The Veterinary Journal*. 197(3):776-781.

Marconato, L.; Frayssinet, P.; Rouquet, N.; Comazzi, S.; Leone, V. F.; Laganga, P.; Rossi, F.; Vignoli, M.; Pezzoli, L.; Aresu, L. 2014. Randomized, placebo-controlled,

double-blinded chemoimmunotherapy clinical trial in a pet dog model of diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 20(3):668-677.

Marconato, L.; Martini, V.; Stefanello, D.; Moretti, P.; Ferrari, R.; Comazzi, S.; Laganga, P.; Riondato, F.; Aresu, L. 2015a. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio as a useful prognostic factor in dogs with diffuse large B-cell lymphoma receiving chemoimmunotherapy. *The Veterinary Journal*. 206(2):226-230.

Marconato, L.; Stefanello, D.; Sabattini, S.; Comazzi, S.; Riondato, F.; Laganga, P.; Frayssinet, P.; Pizzoni, S.; Rouquet, N.; Aresu, L. 2015b. Enhanced therapeutic effect of APAVAC immunotherapy in combination with dose-intense chemotherapy in dogs with advanced indolent B-cell lymphoma. *Vaccine*. 33(39):5080-5086.

Marconato, L.; Polton, G. A.; Sabattini, S.; Dacasto, M.; Garden, O. A.; Grant, I.; Hendrickx, T.; Henriques, J.; Lubas, G.; Morello, E.; Stefanello, D.; Comazzi, S.; European Canine Lymphoma Network. 2016. Conformity and controversies in the diagnosis, staging and follow-up evaluation of canine nodal lymphoma: a systematic review of the last 15 years of published literature. *Veterinary and Comparative Oncology*. 15(3):1029-1040.

Martini, V.; Poggi, A.; Riondato, F.; Gelain, M. E.; Aresu, L.; Comazzi, S. 2015. Flow-cytometric detection of phenotypic aberrancies in canine small clear cell lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*. 13(3):281-287.

Mason, S. L.; Grant, I. A.; Elliott, J.; Cripps, P.; Blackwood, L. 2014. Gastrointestinal toxicity after vincristine or cyclophosphamide administered with or without maropitant in dogs: a prospective randomised controlled study. *Journal of Small Animal Practice*. 55(8):391-398.

McDonald, J. T.; Kritharis, A.; Beheshti, A.; Pilichowska, M.; Burgess, K.; Ricks-Santi, L.; McNeil, E.; London, C.; Ravi, D.; Evens, A. M. 2018. Comparative oncology DNA sequencing of canine T cell lymphoma via human hotspot panel. *Oncotarget*. 9(32): 22693-22702.

Miniscalco, B.; Poggi, A.; Martini, V.; Morello, E.; Sulce, M.; Melega, M.; Borrelli, A.; Tarducci, A.; Riondato, F. 2018. Flow cytometric characterization of S-phase fraction and ploidy in lymph node aspirates from dogs with lymphoma. *Journal of Comparative Pathology*. 161:34-42.

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.

Momparler, R. L. 2013. Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology and Oncology*. 2(1):1-5.

Mudaliar, M. A.; Haggart, R. D.; Miele, G.; Sellar, G.; Tan, K. A.; Goodlad, J. R.; Milne, E.; Vail, D. M.; Kurzman, L.; Crowther, D.; Argyle, D. J. 2013. Comparative gene expression profiling identifies common molecular signatures of NF- κ B activation in canine and human diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *PloS One*. 8(9):e72591.

Oxford Centre for Evidence-Based Medicine. 2011. The Oxford levels of evidence. [en línea]. <<https://www.cebm.ox.ac.uk/resources/levels-of-evidence/ocebml-levels-of-evidence>> [consulta: 14-04-2022]

Park, J. S.; Withers, S. S.; Modiano, J. F.; Kent, M. S.; Chen, M.; Luna, J. I.; Culp, W. T. N.; Sparger, E. E.; Rebhun, R. B.; Monjazeb, A. M.; Murphy, W. J.; Canter, R. J. 2016. Canine cancer immunotherapy studies: linking mouse and human. *Journal for immunotherapy of cancer*. 4(1): 1-11.

Parsons-Doherty, M.; Poirier, V. J.; Monteith, G. 2014. The efficacy and adverse event profile of dexamethasone, melphalan, actinomycin D, and cytosine arabinoside (DMAC) chemotherapy in relapsed canine lymphoma. *The Canadian Veterinary Journal*. 55(2):175-180.

Pawlak, A.; Rapak, A.; Drynda, A.; Poradowski, D.; Zbyryt, I.; Dzimira, S.; Suchanski, J.; Obmińska-Mrukowicz, B. 2016. Immunophenotypic characterization of canine

malignant lymphoma: a retrospective study of cases diagnosed in Poland Lower Silesia, over the period 2011–2013. *Veterinary and Comparative Oncology*. 14:52-60.

Perry, J. A.; Thamm, D. H.; Eickhoff, J.; Avery, A. C.; Dow, S. W. 2011. Increased monocyte chemotactic protein-1 concentration and monocyte count independently associate with a poor prognosis in dogs with lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*. 9(1): 55-64.

Peruzzi, D.; Gavazza, A.; Mesiti, G.; Lubas, G.; Scarselli, E.; Conforti, A.; Bendtsen, C.; Ciliberto, G.; Monica, N.; Aurisicchio, L. 2010. A vaccine targeting telomerase enhances survival of dogs affected by B-cell lymphoma. *Molecular Therapy*. 18(8):1559-1567.

Pinello, K. C.; Santos, M.; Leite-Martins, L.; Niza-Ribeiro, J.; De Matos, A. J. 2017. Immunocytochemical study of canine lymphomas and its correlation with exposure to tobacco smoke. *Veterinary World*. 10(11): 1307.

Poggi, A.; Miniscalco, B.; Morello, E.; Comazzi, S.; Gelain, M. E.; Aresu, L.; Riondato, F. 2015. Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*. 13(4):475-480.

Poggi, A.; Miniscalco, B.; Morello, E.; Gattino, F.; Delaude, A.; Ferrero Poschetto, L.; Aresu, L.; Gelain, M. E.; Martini, V.; Comazzi, S.; Riondato, F. 2016. Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*. 15(2):431-440.

Ponce, F.; Marchal, T.; Magnol, J. P.; Turinelli, V.; Ledieu, D.; Bonnefont, C.; Pastor, M.; Delingnette, M. L.; Fournel-Fleury, C. 2010. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Veterinary Pathology*. 47(3):414-433.

Rambaldi, A.; Boschini, C.; Gritti, G.; Delaini, F.; Oldani, E.; Rossi, A.; Barbui, A. M.; Caracciolo, D.; Ladetto, M.; Gueli, A.; De Crescenzo, A.; Passera, R.; Devizzi, L.; Patti, C.; Gianni, A. M.; Tarella, C. 2013. The lymphocyte to monocyte ratio improves the IPI-

risk definition of diffuse large B-cell lymphoma when rituximab is added to chemotherapy. *American journal of hematology*. 88(12): 1062-1067.

Rassnick, K. M.; Bailey, D. B.; Malone, E. K.; Flory, A. B.; Kiselow, M. A.; Intile, J. L. 2014. Tolerability of lomustine in combination with cyclophosphamide in dogs with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 50(3):167-173.

Regan, R. C.; Kaplan, M. S. W.; Bailey, D. B. 2013. Diagnostic evaluation and treatment recommendations for dogs with substage-a high-grade multicentric lymphoma: results of a survey of veterinarians. *Veterinary and Comparative Oncology*. 11(4):287-295.

Reynolds, P. M.; Reif, J. S.; Ramsdell, H. S.; Tessari, J. D. 1994. Canine exposure to herbicide-treated lawns and urinary excretion of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 3(3): 233-237.

Richards, K. L.; Motsinger-Reif, A. A.; Chen, H. W.; Fedoriw, Y.; Fan, C.; Nielsen, D. M.; Small, G. W.; Thomas, R.; Smith, C.; Dave, S. S.; Perou, C. M.; Breen, M.; Suter, S. E. 2013. Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and postgerminal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. *Cancer Research*. 73(16):5029-5039.

Ruple, A.; Avery, A. C.; Morley, P. S. 2017. Differences in the geographic distribution of lymphoma subtypes in Golden retrievers in the USA. *Veterinary and comparative oncology*. 15(4): 1590-1597.

Saba, C. F.; Hafeman, S. D.; Vail, D. M.; Thamm, D. H. 2009. Combination chemotherapy with continuous L-asparaginase, lomustine, and prednisone for relapsed canine lymphoma. *Journal of veterinary internal medicine*. 23(5): 1058-1063.

Saba, C. F.; Vickery, K. R.; Clifford, C. A.; Burgess, K. E.; Phillips, B.; Vail, D. M.; Wright, Z. M.; Morges, M. A.; Fan, T. M.; Thamm, D. H. 2017. Rabacfosadine for relapsed canine B-cell lymphoma: efficacy and adverse event profiles of 2 different doses. *Veterinary and Comparative Oncology*. 16(1):E76-E82.

Saba, C. F.; Clifford, C.; Burgess, K.; Phillips, B.; Vail, D.; Wright, Z.; Curran, K.; Fan, T.; Elmslie, R.; Post, G.; Thamm, D. 2020. Rabacfosadine for naïve canine intermediate to large cell lymphoma: efficacy and adverse event profile across three prospective clinical trials. *Veterinary and Comparative Oncology*. 18(4):763-769.

Salehi, B.; Selamoglu, Z.; Mileski, K.; Pezzani, R.; Redaelli, M.; Cho, W.; Kobarfard, F.; Rajabi, S.; Martorell, M.; Kumar, P.; Martins, N.; Santra, T.; Sharifi-Rad, J. 2019. Liposomal cytarabine as cancer therapy: from chemistry to medicine. *Biomolecules*. 9(12):773-792.

Sayag, D.; Fournel-Fleury, C.; Ponce, F. 2018. Prognostic significance of morphotypes in canine lymphomas: A systematic review of literature. *Veterinary and Comparative Oncology*. 16(1):12-19.

Seelig, D. M.; Avery, P.; Webb, T.; Yoshimoto, J.; Bromberek, J.; Ehrhart, E. J.; Avery, A. C. 2014. Canine T-zone lymphoma: unique immunophenotypic features, outcome, and population characteristics. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 28(3): 878-886.

Silverman, J. A.; Deitcher, S. R. 2013. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 71(3): 555-564.

Silvestri, R. 2013. New prospects for vinblastine analogues as anticancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 56:625–627.

Smith, P. A. D.; Waugh, E. M.; Crichton, C.; Jarrett, R. F., Morris, J. S. 2020. The prevalence and characterisation of TRAF3 and POT1 mutations in canine B-cell lymphoma. *The Veterinary Journal*. 266: 105575.

Sorenmo, K. U.; Krick, E.; Coughlin, C. M.; Overley, B.; Gregor, T. P., Vonderheide, R. H., & Mason, N. J. (2011). CD40-activated B cell cancer vaccine improves second clinical remission and survival in privately owned dogs with non-Hodgkin's lymphoma. *PloS One*. 6(8): e24167.

Sottnik, J. L.; Rao, S.; Lafferty, M. H.; Thamm, D. H.; Morley, P. S.; Withrow, S. J.; Dow, S. W. 2010. Association of blood monocyte and lymphocyte count and disease-free interval in dogs with osteosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine*. 24(6): 1439-1444.

Takashima-Uebelhoer, B. B.; Barber, L. G.; Zagarins, S. E.; Procter-Gray, E.; Gollenberg, A. L.; Moore, A. S.; Bertone-Johnson, E. R. 2012. Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin's lymphoma. *Environmental Research*. 112: 171-176.

Thamm, D. H.; Vail, D. M.; Post, G. S.; Fan, T. M.; Phillips, B. S.; Axiak-Bechtel, S.; Elmslie, R. S.; Klein, M. K.; Ruslander, D. A. 2017. Alternating rabacfosadine/doxorubicin: efficacy and tolerability in naïve canine multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 31(3): 872-878.

Turek, M. M.; Thamm, D. H.; Mitzey, A.; Kurzman, I. D.; Huelsmeyer, M. K.; Dubielzig, R. R.; Vail, D. M. 2007. Human granulocyte–macrophage colony-stimulating factor DNA cationic-lipid complexed autologous tumour cell vaccination in the treatment of canine B-cell multicentric lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*. 5(4): 219-231.

Vail, D. M.; Michels, G. M.; Khanna, C.; Selting, K. A.; London, C. A.; Veterinary Cooperative Oncology Group. 2010. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1. 0)—a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Veterinary and Comparative Oncology*. 8(1): 28-37.

Vail, D. M.; Thamm, D. H.; Liptak, J. M. 2019. Hematopoietic Tumors. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 6th ed. Elsevier Inc. St Louis, Misuri. pp. 688-772.

Valli, V. E.; Myint, M. S.; Barthel, A.; Bienzle, D.; Caswell, J.; Colbatzky, F.; Durham, A.; Ehrhart, E. J.; Johnson, Y.; Jones, C.; Kiupel, M.; Labelle, P.; Lester, S.; Miller, M.; Moore, P.; Moroff, S.; Rocchbianca, P.; Ramos-Vara, J.; Ross, A.; Scase, T.; Tvedten, H.; Vernau, W. 2011. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Veterinary Pathology*. 48(1):198-211.

- Vos, N.; Pellin, M.; Vail, D. M.** 2019. A comparison of 12-and 19-week CHOP protocols using non-randomized, contemporaneous controls. *Veterinary and comparative oncology*. 17(3): 276-284.
- Wang, S. L.; Lee, J. J.; Liao, A. T.** 2016. Comparison of efficacy and toxicity of doxorubicin and mitoxantrone in combination chemotherapy for canine lymphoma. *The Canadian Veterinary Journal*. 57(3): 271-276.
- Warry, E.; Bohn, A.; Emanuelli, M.; Thamm, D.; Lana, S.** 2013. Disease distribution in canine patients with acanthocytosis: 123 cases. *Veterinary Clinical Pathology*. 42(4): 465-470.
- Waugh, E. M.; Gallagher, A.; Haining, H.; Johnston, P. E.; Marchesi, F.; Jarrett, R. F.; Morris, J. S.** 2016. Optimisation and validation of a PCR for antigen receptor rearrangement (PARR) assay to detect clonality in canine lymphoid malignancies. *Veterinary immunology and immunopathology*. 182: 115-124.
- Zandvliet, M.; Rutteman, G. R.; Teske, E.** 2013. Prednisolone inclusion in a first-line multidrug cytostatic protocol for the treatment of canine lymphoma does not affect therapy results. *The Veterinary Journal*. 197(3): 656-661.
- Zandvliet, M.** 2016. Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly*. 36(2): 76-104.

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
A. Gavazza G. Lubas A. Fridman D. Peruzzi J. A. Impellizeri L. Luberto E. Marra G. Roscilli G. Ciliberto L. Aurisicchio	2013	Seguridad y eficacia de una vacuna genética dirigida a la telomerasa más quimioterapia para el tratamiento del linfoma canino de células B.	42	-Historial clínico. -Examen físico. -Hg +Pb+ P.coag. -Citología (NL y MO). -Rx de tórax y abdomen. -Eco abdominal.	-Vacuna: 1 ml (dividida en dos lugares de inyección con 0,5 ml / lugar). -Quimioterapia: IP: Vincristina (0,75 mg / m2 IV una vez a la sm.) CTX (50 mg / m2 PO 3-4 ds a la sm.) Prednisona (40 mg / m2 PO SID durante la 1ª sm, luego 20 mg / m2 PO SID por 6/8 sm.). MP: terapia con Clorambucil (2 mg / m2 PO 2-3 ds a la sm) Melfalán (2 mg / m2 PO 2-3 ds a la sm) Vincristina (0,60-0,70 mg. / m2 IV cada 3-4 sm). *DOX (30 mg / m2, cada 3 sm por recaídas + MP.	-La respuesta inmune se midió mediante ELISPOT. -La expresión de dTERT se cuantificó mediante PCR. -Los cambios hematológicos, la toxicidad local / sistémica o la disfunción orgánica y la fiebre se controlaron a lo largo del tiempo durante el tto.	3 años y 6 ms (1277 ds).	La vacuna contra el cáncer basada en Ad / DNA-EGT contra dTERT en combinación con quimioterapia COP es segura y prolonga significativamente la supervivencia de los pacientes caninos LSA.	II

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
M. Higginbotham D. L. McCaw J. K. Roush J. C. Nietfeld M. J. Wilkerson K. Reeds D. Burr	2013	Doxorrubicina intermitente como agente único para el tratamiento del linfoma canino de células B.	18	-Examen físico. -Hg, Pb, urianálisis. -Rx tórax, Eco abdominal. -Aspirado de MO. -Ecocardiograma. -Histopatología o citología. - Inmunofenotipificación por CF.	-DOX: Dosis de 30 mg / m2 (o 1 mg / kg para perros de 15 kg) → cada 2 sm, tres administraciones (días 0, 14 y 28).	- sistema de medición: VCOG -Citología (compararon con la anterior). -Ecocardiograma antes de los tto tres, seis y ocho.	1 año (365 ds).	DOX administrada intermitentemente y como agente único es bien tolerado para el linfoma de células B canino. Si bien la DOX, como agente único no sustituye a los protocolos de quimioterapia de agentes múltiples en el tto del cL, es una alternativa razonable si los compromisos de costo y tiempo son factores limitantes para el propietario.	III
M. Zandvliet G.R. Rutteman E. Teske	2013	La inclusión de prednisolona en un protocolo citostático multifármaco de primera línea para el tratamiento del linfoma canino no afecta los resultados del tratamiento.	81	-Hg + Pb. -Biopsia por aspiración de MO. -Examen citológico de un aspirado de nódulo linfático. -Rx tórax. -Eco abdominal.	- <u>Primer Protocolo:</u> L-ASP (10.000 UI / m2 IM) DOX (30 mg / m2 IV) Clorambucil (25 mg / m2 PO) Vincristina (0,5 a 0,7 mg / m2 IV) CTX (200 a 250 mg / m2 PO) Clorambucil (2 mg /	-Palpación/ medición de nódulos linfáticos periféricos, usando criterios de respuesta VCOG. -Hg +Pb + Electrolitos.	S/I	Los resultados actuales no respaldan el uso de prednisolona en un protocolo de múltiples fármacos de primera línea y no proporcionaron ninguna indicación de que	II

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
					m2 SID PO). - <u>Segundo Protocolo:</u> Igual al anterior + Prednisolona (mg / m2 SID).			el uso de prednisolona dentro de un protocolo de quimioterapia contribuya al desarrollo de resistencia a múltiples fármacos.	
S. R. R. Lucas R. C. Maranhao J. L. Guerra B. M. P. Coelho R. Barboza D. H. B. Pozzi	2013	Estudio clínico piloto de carmustina asociada a una nano emulsión lipídica en combinación con vincristina y prednisona para el tratamiento del linfoma canino.	15	-Examen físico. -Citología. -Biopsia -Hg, Pb, recuento de plaquetas. -Rx tórax. -Eco abdominal. -Urianálisis. -Aspirado de MO.	-LDE-carmustina a 50 mg m2 dosis asociada con Vincristina (0,75 mg m2) Prednisona (40 mg m2). -Posteriormente: Vincristina 1 vez a la sm (por 3 sm). Prednisona (20 mg m2) Carmustina a intervalos de 6 sm para el mantenimiento (hasta el final del período de tto o la aparición de una recaída).	-Medición tumores sólidos. -Hg y recuento de plaquetas, 1 sm después de cada tto. -Mensualmente un Pb. -Urianálisis cada 6 sm o cuando los perros mostraban algunas alteración.	52 sem (364 ds).	Se demostró que la LDE-carmustina es segura y eficaz en un protocolo de combinación de fármacos, lo que alienta a realizar estudios más amplios para investigar el uso de LDE como vehículo de fármacos en oncología veterinaria.	II
L. Marconato P. Frayssinet N. Rouquet S. Comazzi V. F. Leone	2014	Ensayo clínico de quimioinmunoterapia doble ciego, controlado con placebo y	19	-Historial clínico. -Examen físico. -Hg + Pb. -Rx torácicas -Eco Abdominal.	- <u>Quimioterapia (G1 y G2):</u> L-ASP Vincristina CTX	-Evaluación sistemática Oncológica. -Examen físico. -Pb.	598 días aprox.	La vacuna probada aquí es segura y eficaz para prolongar la TTP y LSS en	I

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
P. Laganga F. Rossi M. Vignoli L. Pezzoli L. Aresu		aleatorizado en un modelo de perro de linfoma difuso de células B grandes.		-Citología hígado y Bazo. -Inmunofenotipo por CF.	DOX Lomustina Prednisona Por 20 sm -Vacuna Intradérmica para G1 y placebo para G2.	-Citología + CF (de ser necesario PARR).		perros con DLBCL cuando se usa en combinación con quimioterapia de dosis intensa.	
M. Parsons-Doherty V. J. Poirier G. Monteith,	2014	La eficacia y el perfil de eventos adversos de la quimioterapia con dexametasona, melfalán, actinomicina D y arabinósido de citosina (DMAC) en el linfoma canino recidivante	86	-Citología/ Histología -Examen Físico -Hg -La información extraída de registros: raza, sexo, estado de castración, peso, edad al diagnóstico, etapa inicial y sub-estadificación, método diagnóstico, inmunofenotipo, tratamientos previos (protocolo basado en CHOP, L-ASP CCNU), orden en el que se administraron los protocolos, respuesta a tto previos.	-Dexametasona: 1 mg / kg, SQ -Actinomicina D: 0,75 mg / m ² , IV -Arabinósido de citosina (citarabina): 200 mg / m ² , SQ, dividido en 2 dosis, con 2 h de diferencia, el día 1 y dexametasona, 1,0 mg / kg, SQ -Melfalán: 20 mg / m ² , PO, el día 8 de un ciclo de 14 días.	-Evaluación sistemática de tumores medible. -EA: criterios de terminología común para eventos adversos (VCOG-EA)	300 ds aprox.	El protocolo DMAC como se usa aquí no se puede recomendar sobre otros protocolos de rescate para el tratamiento del linfoma recidivante en el perro. Debidos efectos adversos, costo y la intensidad del tiempo del protocolo, basado en este estudio retrospectivo.	IV
L. Marconato D. Stefanello S. Sabattini S. Comazzi F. Riondato P. Laganga P. Frayssinet	2015	Efecto terapéutico mejorado de la inmunoterapia APAVAC en combinación con quimioterapia de dosis intensa en	45	-Histopatológico + estadificación. -Linfadenectomía (confirmar diagnóstico y tener material para producir vacunas)	- <u>Vacuna:</u> intradérmica de 0,5 ml las sm 4- 7, 12, 16, 20 y 24. - <u>Quimioterapia:</u> duración 20 sm. L-ASP	-Medición de tumores sólidos. -Luego de 2 sm de termino el tto se realizó 2ª linfadenectomía para un	800 ds	Estos resultados demuestran que la vacunación con HSPPC-HA puede producir beneficios clínicos sin	III

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
S. Pizzoni N. Rouquet L. Aresu		perros con linfoma avanzado de células B indolentes.			Vincristina CTX DOX Lomustina Prednisona	histopatológico + estataficación.		aumento de la toxicidad, proporcionando así una estrategia para mejorar la quimioterapia en perros con linfoma.	
M. O. Childress J. A. Ramos-Vara A. Ruple	2016	Un ensayo controlado aleatorio del efecto de la omisión de prednisona de un protocolo de quimioterapia con múltiples fármacos sobre el resultado del tratamiento en perros con linfomas ganglionares periféricos	40	-Citología o histopatológico. -Consentimiento informado del propietario.	<u>-L-CHOP:</u> L-ASP (400 U / kg, SC) Vincristina (0,7 mg / m ² , IV), CTX (250 mg / m ² , IV o PO) DOX (30 mg / m ² , IV, o 1 mg /kg, IV) Prednisona. <u>-L-CHO:</u> L-ASP (400 U / kg, SC) Vincristina (0,7 mg / m ² , IV), CTX (250 mg / m ² , IV o PO) DOX (30 mg / m ² , IV, o 1 mg /kg, IV).	-Medición nódulos periférico en base a los criterios VCOG.	341 ds aprox. (rango, 41 a 1545 días)	La exclusión de prednisona del protocolo L-CHOP no pareció dar como resultado un mejor tiempo de supervivencia libre de progresión para perros con linfomas ganglionares.	II
S.-L. Wang J.-J. Lee A. T. Liao	2016	Comparación de la eficacia y la toxicidad de la DOX y la mitoxantrona en la quimioterapia combinada para el linfoma canino.	44	-Examen físico. - Hg + Pb. -Rx tórax-abdominales. -Eco abdominal -Inmuno fenotipificación por CF.	<u>-Quimioterapia:</u> protocolo Madison-Wisconsin modificado de 25 sm. (excluí la L-ASP) -Grupo 1: CTX, DOX,	-Examen físico. - Medición de los NL. -Hg -Ecocardiografía (antes de cada dosis de antibiótico antitumoral para	895 ds	Estos resultados sugieren que el protocolo CMOP proporciona SLP, MST similares y causa menos efectos secundarios en	II

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
				-Aspirado de MO (solo si el paciente lo ameritaba).	Vincristina Prednisolona (CHOP) -Grupo 2: CTX, Mitoxantrona, Vincristina y Prednisolona (CMOP) -Dosis: Vincristina (0,7 mg / m ² IV) CTX (250 mg / m ² PO, du) DOX (30 mg / m ² IV) o mitoxantrona (6 mg / m ² IV) Prednisolona (PO SID)	medir el acortamiento de la fracción (FS))		comparación con el protocolo CHOP. Por lo tanto, el protocolo CMOP puede ser otra opción de tratamiento para el linfoma multicéntrico canino.	
D. H. Thamm D. M. Vail G. S. Post T. M. Fan B. S. Phillips S. Axiak-Bechtel R. S. Elmslie M. K. Klein D. A. Ruslander	2017	Alternancia de rabacfosadina / doxorubicina: eficacia y tolerabilidad en el linfoma multicéntrico canino	54	-citológico/histológico - Inmunofenotipificación -Hg + Pb -Urianálisis	-Los perros recibieron dosis alternas de RAB y DOX cada 3 sem. -La RAB se administró a una dosis de 1,0 mg / kg como una infusión IV de 30 min en las sem 0, 6 y 12. -La DOX se administró a una dosis de 30 mg / m ² (1,0 mg / kg para perros que pesen <15 kg) como una	- Criterios de evaluación de respuesta del VCOG para linfoma de ganglio periférico en perros. -EA se identificaron a través del historial médico proporcionado por el propietario en cada visita.	400 ds aprox.	El régimen alterno de RAB / DOX fue bien tolerado y resultó en PFI (intervalo libre de progresión) comparables a los observados después de los protocolos estándar basados en CHOP, con menos visitas de tratamiento (6 versus 12-16). La mayoría de los	II

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
					infusión IV de aprox. 20 min en las sem 3, 9 y 15.			eventos adversos fueron leves o moderados y autolimitados. Se justifican estudios adicionales para explorar el resultado a largo plazo en perros tratados con esta combinación, así como con otras combinaciones de quimioterapia RAB.	
C. F. Saba K. R. Vickery C. A. Clifford K. E. Burgess B. Phillips D. M. Vail Z. M. Wright M. A. Morges T. M. Fan D. H. Thamm,	2017	Rabacfosadina para el linfoma de células B canino recidivante: perfiles de eficacia y eventos adversos de 2 dosis diferentes	50	- Inmunofenotipificación (mediante inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, CF o PCR.	Se asignó al azar para recibir: - <u>Grupo de tratamiento A:</u> RAB a 0,82 mg / kg - <u>Grupo de tratamiento B:</u> RAB a 1,0 mg / kg * Para lograr un volumen total de infusión de 2 ml / kg y se administró por vía intravenosa (IV) durante 30 minutos. -Los tratamientos se repitieron cada 21 días hasta un total de 5 tratamientos,	- Criterios de Evaluación de Respuesta del Grupo de Oncología Cooperativa Veterinaria (VCOG) para el linfoma de nódulos periféricos. *Eventos Adversos: Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos del Grupo de Oncología Cooperativa Veterinaria	6 meses aprox. (180 ds aprox.)	El RAB a una dosis de 1,0 mg / kg cada 21 días es una opción viable y generalmente bien tolerada para perros con linfoma de células B recidivante. Una reducción de la dosis de 1,0 mg / kg a 0,82 mg / kg, si es necesaria para tratar los EA.	II

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
					según la dosis designada a cada grupo.	(VCOG-EA)			
J. R. Cawley Z. M. Wright K. Meleo G. S. Post C. A. Clifford K. R. Vickery D. M. Vali P. J. Bergman D. H. Thamm	2020	Uso concurrente de rabacfosadina (RAB) y L-asparaginasa (L-ASP) para el Linfoma multicéntrico en recaída o refractario en perros	52	- Confirmar la recaída Citológicamente -Hg -Urianálisis	- RAB a una dosis de 1,0 mg / kg cada 3 sem hasta un total de 5 dosis. - L-ASP SC a una dosis de 400 UI / kg, al mismo tiempo que los 2 primeros tto de RAB.	- La respuesta al tratamiento se determinó mediante el uso de los criterios de evaluación de la respuesta del Grupo de Oncología Cooperativa Veterinaria (VCOG) para el linfoma - Los eventos adversos se clasificaron de acuerdo con los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos del Grupo de Oncología Cooperativa Veterinaria (VCOG-CTCAE)	480 ds aprox.	RAB / L-ASP parece ser seguro y eficaz para perros con linfoma multicéntrico recidivante. Se necesitan más estudios para evaluar si RAB / L-ASP ofrece algún beneficio clínico sobre el RAB solo como protocolo de rescate.	II
J. J. Lee A. T. Liao S. L. Wang	2020	Resultado del linfoma multicéntrico canino después del tratamiento único o dividido con	72	- citología o Histopatología -Medición nódulos periférico en base a los criterios VCOG	- <u>Quimioterapia:</u> CTX (en bolo o dosis divididas; dosis: 250 mg / m2) DOX Vincristina	-Medición de los NL: criterios de respuesta del linfoma ganglionar. periférico VCOG. -Urianálisis y	400 días máx.	La incidencia de SHC entre los grupos (dos única y dividida), de CTX, no fue significativamente	IV

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
		ciclofosfamida en quimioterapia multifármaco			Prednisolona (CHOP) por 19 o 25 sm	cultivo bacteriano (SHC) -Evaluación de SCI (hematuria, estranguria o polaquiuria).		e diferente.	
C. F. Saba C. Clifford K. Burgess B. Phillips D. Vail Z. Wright K. Curran T. Fan R. Elmslie G. Post D. Thamm	2020	Rabacfosadina (RAB) para el linfoma canino de células intermedias a grandes sin tratamiento previo: perfil de eficacia y eventos adversos en tres ensayos clínicos prospectivos	63	-Examen Físico. -Hg + Pb -Urianálisis. -citológico o histológico. - Inmunofenotipificación.	RAB 0,82 o 1,0 mg / kg, vía intravenosa (IV) durante 30 minutos	-Criterios de evaluación de respuesta del Grupo de oncología cooperativa veterinaria (VCOG). -Criterios de terminología común para eventos adversos del Grupo de oncología cooperativa veterinaria (VCOG-EA)	365 ds.	El RAB parece ser un tratamiento eficaz para perros con linfoma de células intermedias a grandes, multicéntrico, sin tratamiento previo, con una tasa de respuesta general del 87 % y una PFI mediana de 122 días. La tasa de respuesta y el PFI fueron más prolongados en perros con linfoma de células B.	II
DLBCL: linfoma difuso de células B grandes; S/I: sin información; cL: linfoma canino; NL: nódulo linfático; SID: cada 24 horas; BID: cada 12 horas; du: dosis única; ms: meses; sm.: semana; ds.: días; hrs: horas; min: minutis; PO: oral; SC: subcutánea; IV: intravenosa; IM: intramuscular; P. coag.: panel de coagulación; Hg: hemograma; Pb: Perfil bioquímico; Elec.: electrolitos; Rx: radiografía; Eco: ecografía; CF: citometría de flujo; MO: médula ósea; PK:									

ANEXO 1: Resumen de estudios clínicos que abordan tratamientos para cL, recopilados en una revisión sistemática entre 2011 y 2021.

Autores	Año	Título	n	Diagnóstico	Dosis/duración del tratamiento	Evaluación de resultados	Tiempo de seguimiento	Conclusiones	GDE
farmacocinético; IP: Fase de inducción; MP: Fase mantención; tto: tratamiento; SCl: signos clínicos; MST: mediana del tiempo de supervivencia; SLP: Supervivencia libre de progresión; TTP: tiempo de progresión; LSS: supervivencia específica del linfoma; SLP: supervivencia libre de progresión; MST: Mediana de tiempo de supervivencia; N/E: no especificado; DU: dosis única;									

Anexo 2: Generación de vacunas

Todo el procedimiento, el tejido tumoral y todo el material utilizado para preparar la vacuna se realizan condiciones estériles, en un gabinete de flujo laminar.

- El tejido del linfoma se obtiene mediante linfadenectomía.
- Una parte del nódulo linfático extirpado se envía al laboratorio en un recipiente estéril con hielo seco.
- El tejido tumoral congelado (200 mg) se homogeneiza usando un homogeneizador de tejido de perlas.
- Se agrega 1 ml de carbonato de sodio (30 mmol /L, pH 7) por cada 1 ml de homogeneizado. El homogeneizado resultante se centrifuga durante 15 minutos para eliminar todos los fragmentos celulares.
- El sobrenadante que contenía las proteínas citoplásmicas se utiliza para la purificación de proteínas mediante cromatografía en columna de hidroxilapatita:
- Se precipitan las proteínas citoplasmáticas utilizando sulfato de amonio (primero al 50 %, luego al 70 %) y se recupera los sedimentos.
- El último sedimento se resuspende en 2 ml de tampón fosfato (20 mmol / L, pH 7).
- La columna se llena con 0,333 g de hidroxapatita. A continuación, se añade el sedimento resuspendido y la columna se lava con una solución tampón de fosfato.

Para la inoculación de las proteínas tumorales, el polvo de hidroxapatita se resuspende en 5 ml de solución de carboximetilcelulosa (al 2 % en agua destilada). Se inoculan 0,5 ml de esta solución para cada inyección de vacuna.

Para realizar el control electroforético se utiliza 0,2 mL de la solución anterior. Se centrifuga a 1.000 rpm por 30 segundos. Se descarta el sobrenadante. Se lava el polvo del sedimento con 0,1 ml de una solución de NaCl 0,5 mol/L, se centrifuga nuevamente y el sobrenadante se usa para SDS-PAGE (10µL de la solución). Como anticuerpos se utilizan el anti-HSP70 y anti-gp90. Para el marcado de anticuerpos, se utiliza un kit WesternBreeze (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.