



Uso de los marcadores CD79a y CD3 en la tipificación inmunológica de leucemia linfoblástica, secundaria al virus de leucemia viral felina

Juan Miguel Pérez Enriquez^{1*}

0000-0001-6363-2927

Luis Enrique García Ortuño²

0000-0003-2964-630X

Laura Romero Romero³

0000-0002-5158-8129

Andrea Carrasco Reyes⁴

0000-0002-5094-876X

Oscar Aguayo Ávalos⁵

0000-0001-5350-4593

¹ Universidad Nacional Autónoma de México
Alumno de posgrado en el Departamento de Patología, sección Patología Clínica

² Universidad Nacional Autónoma de México
Profesor asociado de tiempo completo del Departamento de Patología

³ Universidad Nacional Autónoma de México
Profesora asociado de tiempo completo y Jefa del Departamento de Patología

⁴ Universidad Nacional Autónoma de México
Alumna de posgrado en el Hospital Veterinario de Especialidades de la FMVZ

⁵ Universidad Nacional Autónoma de México
Alumno del departamento de Patología, sección de Anatomopatología

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México.
CDMX, 04510.

*** Autor para correspondencia:**

Tel: +56225878 ext. 220

Correo electrónico:

mvz.jumpe@gmail.com

Recibido: 2016-10-17

Aceptado: 2017-01-17

Publicado: 2017-02-17

Información y declaraciones adicionales en la página 11

© Derechos de autor:

Juan Miguel Pérez Enriquez *et al.* 2017

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Resumen

Descripción del caso. En el Hospital Veterinario de Especialidades de la FMVZ-UNAM, revisamos a un gato europeo doméstico, macho, de cinco meses de edad, que convivía con un congénere positivo a leucemia viral felina.

Hallazgos clínicos. Al inicio del examen físico no presentó alteraciones significativas. Realizamos una prueba serológica para diagnóstico de SIDA y leucemia viral felina (FIV/FelV combo test IDEXX), que resultó positiva a leucemia viral felina.

Tratamiento y evolución. Iniciamos un protocolo inmunomodulador y se establecieron revisiones constantes. El día 425 se nos reportó depresión, anorexia, linfadenomegalia generalizada y palidez en las mucosas orales. En el hemograma observamos leucocitosis ($627.2 \times 10^9/L$) por linfocitosis; $407.7 \times 10^9/L$ correspondían a linfocitos inmaduros (prolinfocitos y linfoblastos) lo cual asociamos a leucemia linfoblástica aguda, secundaria a leucemia viral felina. Debido al mal estado del paciente, los propietarios decidieron aplicar la eutanasia; remitimos el cuerpo al área de necropsias de la FMVZ-UNAM. Se detectó infiltrado linfoide en distintos órganos, así como una médula ósea hiper celular. En la inmunotipificación del corte histológico de médula ósea, encontramos positividad para CD79a, con lo que determinamos que la estirpe celular neoplásica corresponde a linfocitos tipo B.

Relevancia clínica. En los gatos, a diferencia de los perros, existe escasa información en la literatura con respecto a la sobrevida y el pronóstico de las neoplasias linfoproliferativas. La inmunotipificación es útil para complementar la estadificación histológica y contribuir con información para determinar el comportamiento de estos procesos neoplásicos, e incluso tiene un valor pronóstico importante.

Palabras clave: leucemia viral felina, leucemia linfoblástica, linfoma, inmunohistoquímica, inmunotipificación, desórdenes linfoproliferativos en gatos, CD79a, CD3.

Use of CD79a and CD3 markers in the lymphoblastic leukemia immunological tipification secondary to viral feline leukemia virus

Abstract

Case description. A male European domestic cat of 5 months old and previously exposed to the FLV virus, was admitted into the Veterinary Hospital of the National Autonomous University of Mexico.

Clinical findings. During physical examination, no significant alterations were found. A SNAP FIV/FelV IDEXX Combo test was performed, which showed a positive result to FeLV.

Treatment and evolution. An immunomodulatory protocol was initiated and constant examinations were scheduled. On day 425, several symptoms such as depression, anorexia, generalized lymphadenomegaly and oral mucosa paleness were reported. A hemogram was performed, where leukocytosis ($627.2 \times 10^9/L$) was observed by lymphocytosis, from which $407.7 \times 10^9/L$ corresponded to immature lymphocytes (prolymphocytes and lymphoblasts) associated to acute lymphoblastic leukemia, secondary to viral feline leukemia. Due to the poor condition of the patient, euthanasia was performed and the body was referred to the pathology department of the FMVZ-UNAM for a *post mortem* study. Necropsy revealed lymphoid infiltrate in different organs, as well as, bone marrow hypercellularity. Bone marrow immunotyping was positive to CD79a, whereby it was diagnosed as a B-cell lymphoid neoplasia.

Clinical relevance. Unlike dogs, there is scarce information for cats regarding the survival and prognosis of lymphoproliferative malignancies. Therefore, immunotyping may be useful for complementing the histological staging and contributing with information, in order to determine the behaviour of these neoplastic processes, and even having an important prognostic value.

Keywords: viral feline leukemia, lymphoblastic leukemia, lymphoma, immunohistochemistry, immunotyping, lymphoproliferative disorders in cats, CD79a, CD3.

Descripción del caso

En el Hospital Veterinario de Especialidades (HVE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), recibimos a un gato europeo doméstico, macho, de cinco meses de edad, rescatado de la calle un mes atrás. Tenía una vacuna triple felina y desparasitación vigente. El motivo de la consulta fue porque convive con un gato positivo a leucemia viral felina (LeVF).

Hallazgos clínicos e interpretación

Realizamos el examen físico general (EFG) donde no encontramos alteraciones aparentes. Tomamos una muestra de sangre con EDTA como anticoagulante para hacer una prueba de SNAP FIV/FelV (combo test IDEXX): un inmunoensayo rápido que permite la identificación de la proteína vírica nuclear p27 del virus de la leucemia felina en suero, plasma o sangre completa con anticoagulante (EDTA o heparina); resultó positiva.

Analizamos un hemograma, en los resultados se apreció trombocitopenia ligera ($190 \times 10^9/L$ [$300-700 \times 10^9/L$]), no le dimos relevancia debido a la presencia de agregados plaquetarios que causan una subestimación en el conteo. Leucocitosis por neutrofilia ($13.7 \times 10^9/L$ [$2.5 - 12.5 \times 10^9/L$]) asociada a redistribución por efecto de catecolaminas. También observamos linfocitosis ($10.5 \times 10^9/L$ [$1.5 - 7.0 \times 10^9/L$]) con evidencia de ocasionales linfoblastos en circulación y eosinofilia ($2.2 \times 10^9/L$ [$0 - 0.8 \times 10^9/L$]) lo cual corresponde con el proceso viral (LeVF).

Iniciamos un protocolo inmunomodulador y se establecieron revisiones constantes con valoraciones del leucograma y EFG.

Para el día 185 posdiagnóstico, realizamos otra prueba SNAP FIV/FelV combo test IDEXX: también resultó positiva, por lo que lo estadificamos como virémico persistente, sin embargo, no se apreciaron alteraciones en el EFG ni en el hemograma.

El paciente dejó de acudir a sus revisiones mensuales. El día 425, los propietarios lo llevaron de nuevo al HVE, debido a que lo notaron deprimido, con anorexia, había perdido peso, y detectamos las mucosas orales pálidas. En el EFG se le apreció consciente, deprimido, con condición corporal 2/5, deshidratado un 7 %, con las mucosas orales pálidas y con linfadenomegalia generalizada.

Tomamos muestras para hemograma, bioquímica clínica y urianálisis. En el hemograma observamos anemia severa ($0.13 L/L$ [$0.27 - 0.45 L/L$]) no regenerativa, trombocitopenia severa ($44 \times 10^9/L$ [$300 - 700 \times 10^9/L$]) y neutropenia absoluta ($0 \times 10^9/L$ [$2.5 - 12.5 \times 10^9/L$]), compatibles con disminución en la producción por mieloptisis. Se aprecia leucocitosis severa ($627.2 \times 10^9/L$ [$5.5 - 19.5 \times 10^9/L$]) por linfocitosis absoluta, con predominio de linfocitos inmaduros (65 %).

La presencia de mieloptisis y la leucocitosis severa por células linfoides en diferentes estadios de maduración (incluyendo linfoblastos) dos a tres veces más grandes que un linfocito maduro normal con núcleo redondo, en ocasiones ligeramente indentado, con cromatina fina granular, presencia de uno a dos nucléolos prominentes; y con un borde delgado en forma de anillo incompleto de citoplasma basófilo; indicaban que la médula ósea estaba comprometida y sugerían un diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda secundaria a leucemia viral felina (figuras 1 y 2).

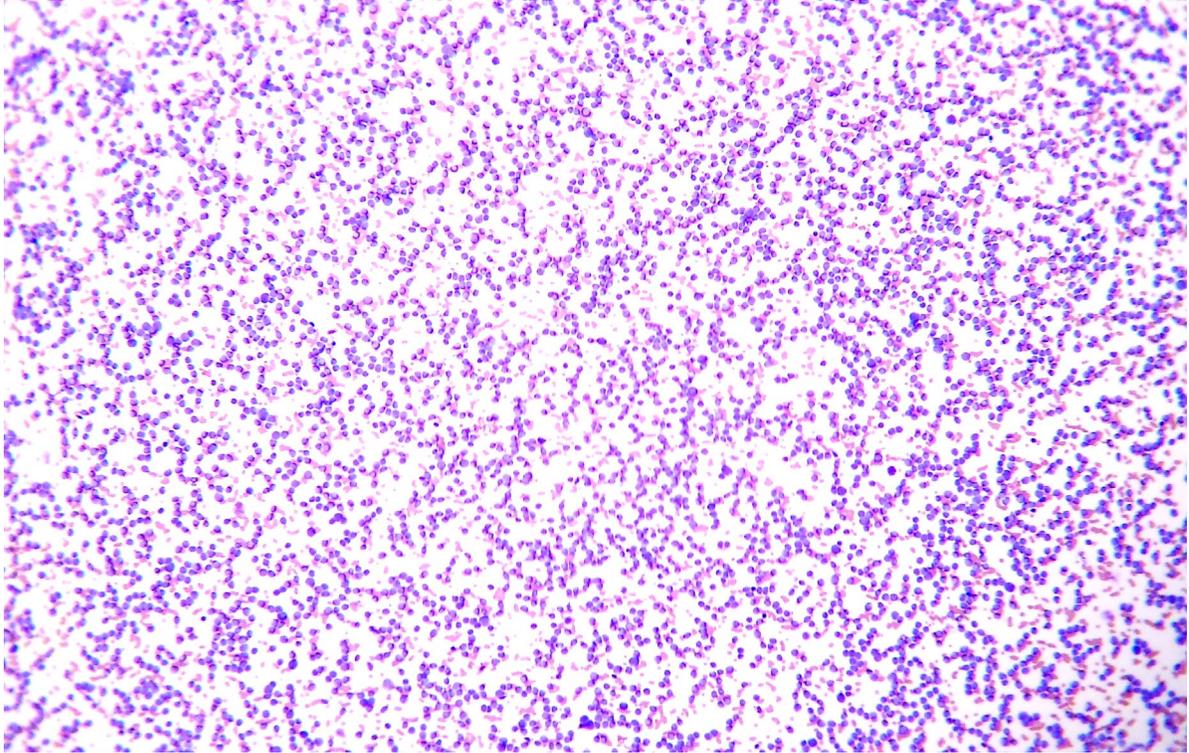


Figura 1. Frotis sanguíneo. Se aprecia una gran cantidad de leucocitos. 10x. Tinción de Wright.

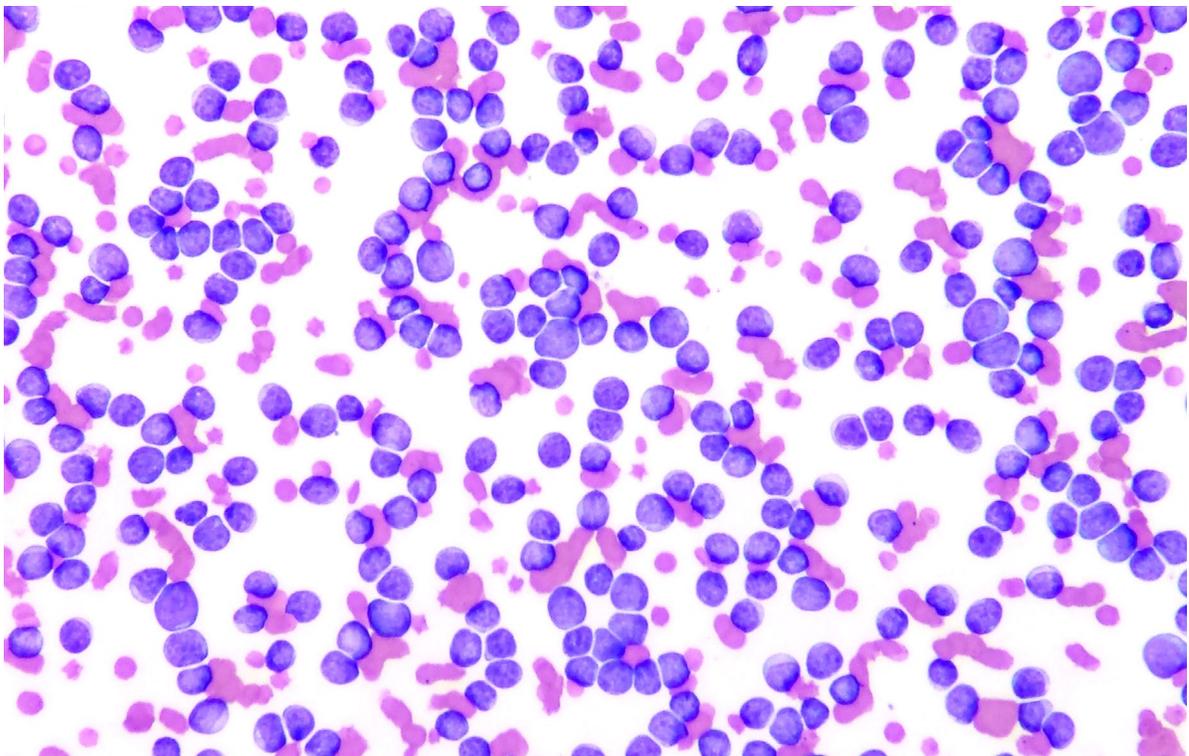


Figura 2. Frotis sanguíneo. Se observa linfocitosis absoluta con linfocitos en distintas etapas de maduración. 40x. Tinción de Wright.

La bioquímica clínica arrojó hiperglucemia ligera (11.7 mmol/L [3.8 - 7.9 mmol/L]) transitoria por efecto de catecolaminas, o bien, por estimulación crónica de glucocorticoides; hiperazotemia prerrenal (urea: 11.0 mmol/L [4.1 - 10.8 mmol/L]) por hemoconcentración, incremento de fosfatasa alcalina (137 U/L [$<$ 107 U/L]) sugerente de daño en los canalículos biliares y acidosis metabólica (bicarbonato: 12 mmol/L [14 - 24 mmol/L]) hiperclorémica (cloro: 120 mmol/L, DIF: 27 mmol/L). También manifestó hipercaliemia (5.5 mmol/L [3.6 - 5.3 mmol/L]) asociada a la liberación de potasio intracelular por la marcada leucocitosis, sin descartar un mecanismo transcelular compensatorio a la acidosis. En el urianálisis no se aprecian alteraciones relevantes.

Tratamiento y evolución

Hospitalizamos al paciente, le instauramos una terapia de reposición de líquidos e iniciamos quimioterapia según el protocolo Madison Wisconsin con una primera aplicación de acetato de metil prednisolona.

Como el paciente estaba muy afectado de forma negativa, los propietarios decidieron que se le practicara la eutanasia el segundo día del protocolo quimioterapéutico.

Remitimos el cuerpo al área de necropsias del Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM. Los hallazgos macroscópicos más relevantes fueron hepatomegalia leve con múltiples áreas blancas de aproximadamente un milímetro de diámetro en todo el parénquima hepático, esplenomegalia leve y linfadenomegalia generalizada.

Dentro de los hallazgos microscópicos hallamos abundante infiltrado mononuclear en el hígado, concentrado principalmente en la zona I (periportal) de los lobulillos hepáticos. Las venas centrales tenían un infiltrado discreto (figura 3). En los linfonodos, la cápsula estaba infiltrada por células mononucleares neoplásicas. La corteza presentaba abundantes células neoplásicas linfoides que formaban sábanas densas con pérdida de la estructura folicular normal, además, identificamos espacios claros compatibles con necrosis (figura 4).

El riñón y bazo también presentaban amplias zonas de infiltrado por células neoplásicas en el parénquima. La médula ósea se apreciaba hiper celular con un bajo número de megacariocitos por campo de 10x y con predominio marcado de las células neoplásicas, lo que ocasionó una disminución importante de las líneas eritrocítica y granulocítica (figura 5).

Inmunotipificamos las células neoplásicas de un corte histológico de médula ósea mediante los marcadores CD79a y CD3 (figuras 6 y 7). El resultado fue un marcaje positivo para CD79a, lo que se asocia con un predominio de células del lineaje tipo B.

Discusión y relevancia clínica

El término leucemia linfocítica se refiere a una condición neoplásica de linfocitos presente en la médula ósea o en circulación, que no se asocia con un tumor sólido. La leucemia linfocítica se clasifica como aguda o linfoblástica (LLA), y crónica (LLC),

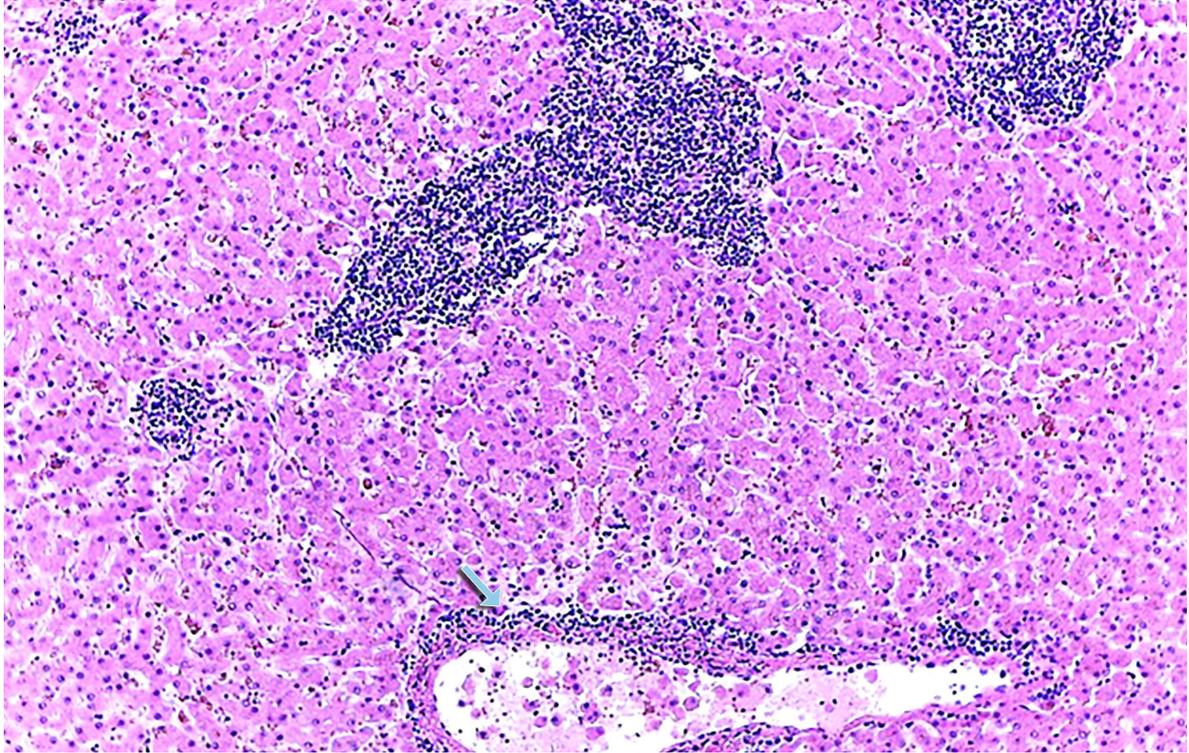


Figura 3. Corte histológico de hígado. Se aprecia infiltrado linfocítico periportal y centrolobulillar. 40x, H&E.

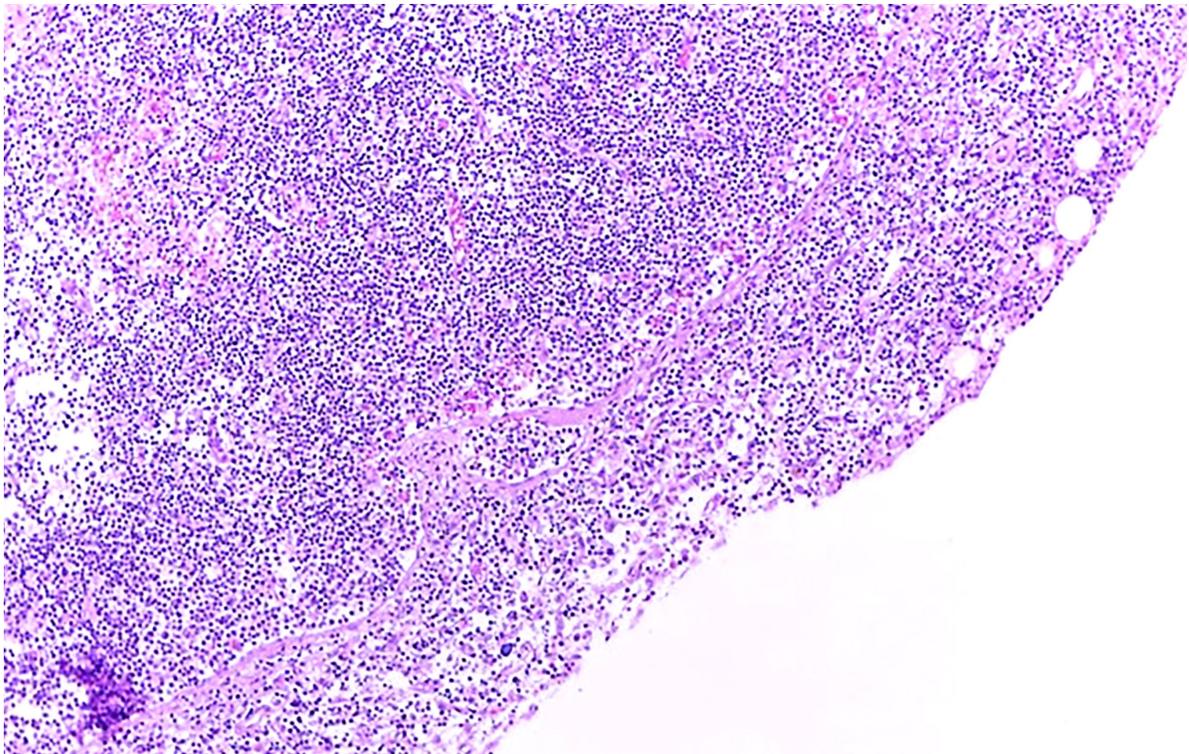


Figura 4. Corte histológico de linfonodo. Se observa pérdida de la estructura folicular e infiltrado neoplásico que se extiende hasta la cápsula del tejido linfoide. 40x, H&E.

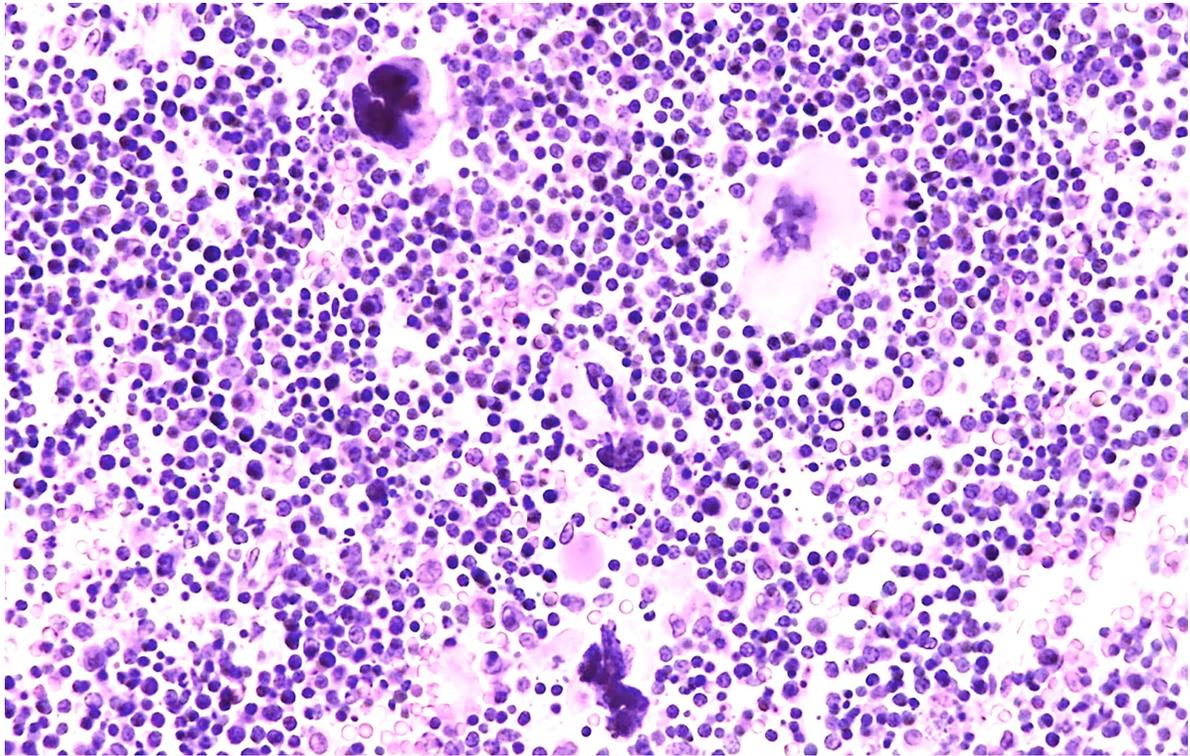


Figura 5. Corte histológico de médula ósea. Se aprecia hiper celular con predominio de células linfoides y disminución en otras líneas celulares. 40x, H&E.

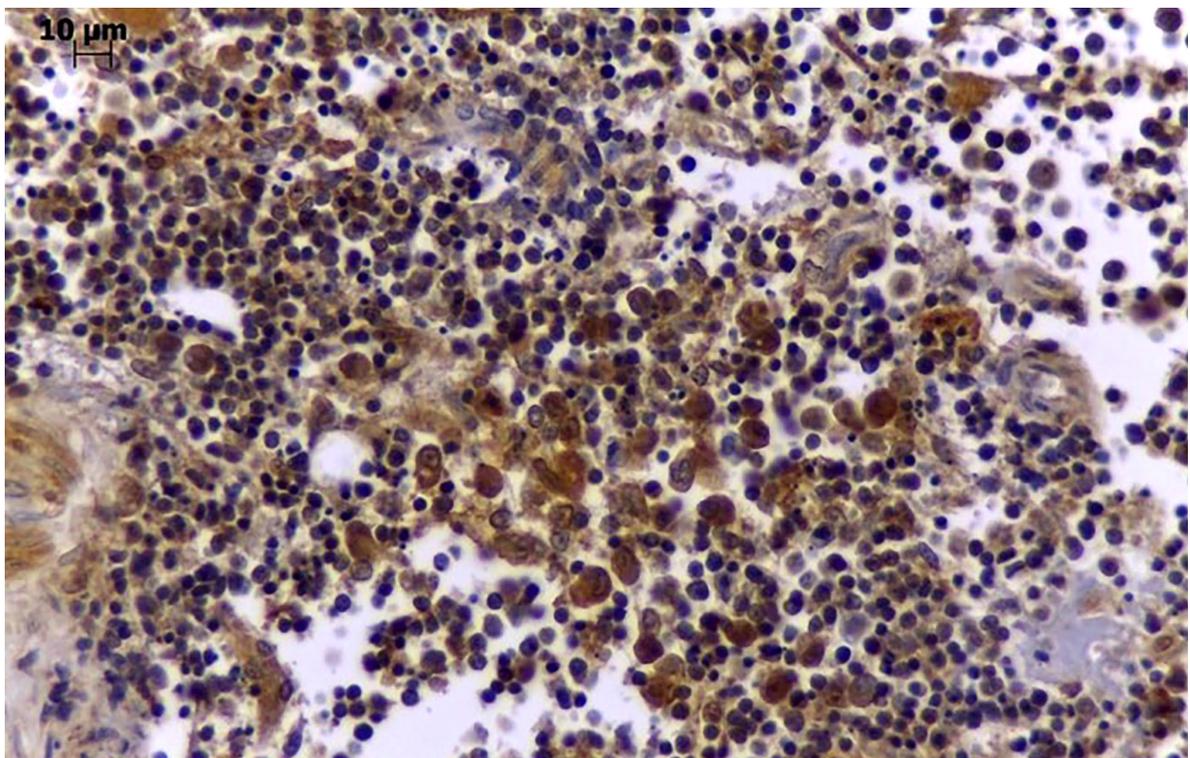


Figura 6. Inmunohistoquímica para CD79a de corte histológico de médula ósea. El color ocre indica un resultado positivo.

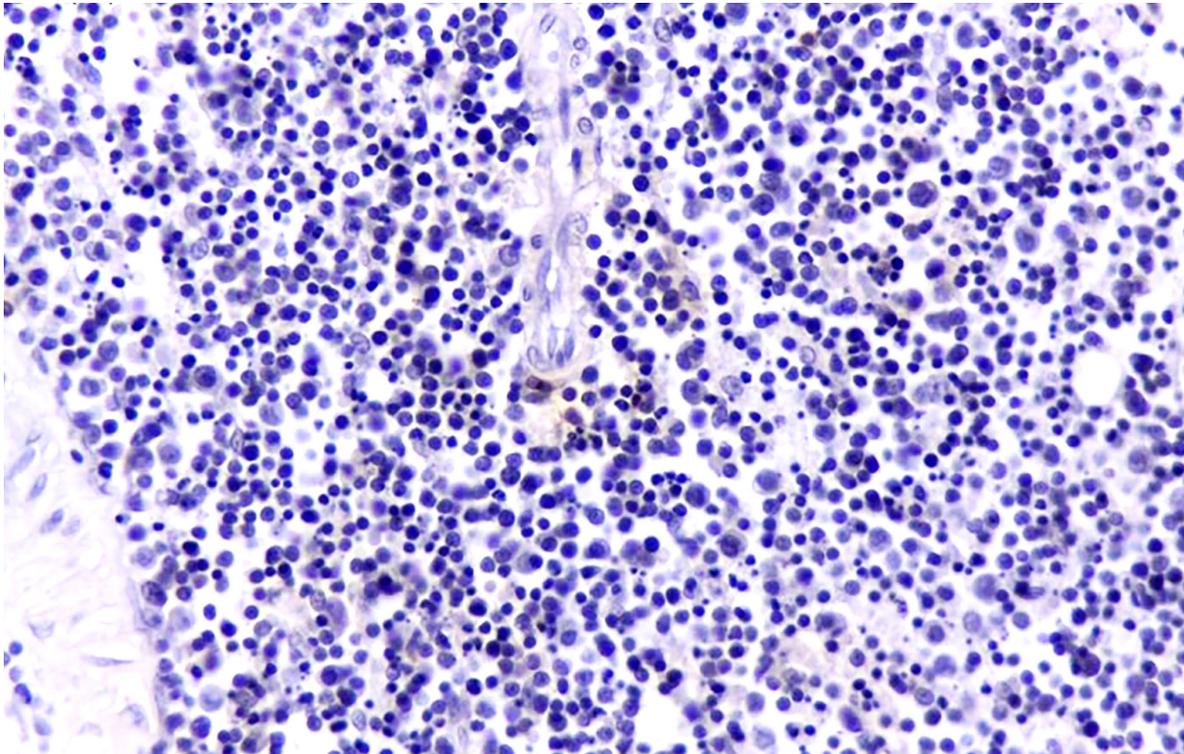


Figura 7. Inmunohistoquímica con marcador CD3 de corte histológico de médula ósea. La ausencia de color ocre indica un resultado negativo.

con base en la madurez de las células involucradas. La metástasis de médula ósea a linfonodo y viceversa (linfoma estadio V) es frecuente, por lo que en ocasiones es complicado distinguir el proceso inicial.¹

El mecanismo por el cual el virus de la leucemia viral felina causa malignidad, puede explicarse por la inserción de su genoma en el genoma celular cerca de un oncogén (comúnmente *myc*), lo que resulta en la activación y la sobreexpresión de dicho gen. Estos efectos conducen a una proliferación incontrolada de esa célula (clona) y la malignidad resulta en ausencia de una respuesta inmune apropiada. El virus de la leucemia viral felina tipo A también puede incorporar el oncogén para formar un virus recombinante (por ejemplo, FeLV-B, FeSV) que contiene secuencias de oncogenes celulares que a continuación se reordenan y activan. Cuando entran en una célula, estos virus recombinantes son oncogénicos; por lo tanto, las neoplasias inducidas por el virus de la leucemia viral felina son causadas, al menos en parte, por mutagénesis de inserción somáticamente adquirida en la que los provirus integrados pueden activar un protooncogén o interrumpir un gen supresor de tumor.²

En gatos LeVF positivos es frecuente observar tanto LLA como linfoma; sin embargo, también se han reportado otras neoplasias hematopoyéticas, como el síndrome mielodisplásico (considerado un proceso preleucémico), leucemias mielocíticas con diversas variantes de líneas celulares e incluso existe un reporte de leucemia eosinofílica en un paciente LeVF positivo.

Del 60 al 80 % de los gatos con LLA son positivos a LeVF, lo que se considera un factor de mal pronóstico.^{3,4} Mientras que la forma más frecuente asociada al LeVF es el linfoma mediastínico en gatos jóvenes.⁴ En este análisis, el hallazgo prin-

principal fue la leucemia linfoblástica aguda sin evidencia de alteraciones mediastínicas durante el diagnóstico.

Tanto en medicina humana como en veterinaria, el uso de sistemas de clasificación para las diferentes formas en que se presentan los desórdenes linfoproliferativos, ha permitido un mayor entendimiento del comportamiento de los mismos. El sistema Kiel de clasificación fue considerado el más conveniente en oncología clínica veterinaria, debido a que determinaba los subtipos a partir de la morfología celular y no siempre requería del estudio histopatológico; este sistema fue actualizado incorporando técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular con la finalidad de elucidar la línea celular y revelar su estado de actividad proliferativa.⁵

Existen escasos informes de la clasificación actualizada de Kiel aplicada a linfomas felinos. Callanan et al (1996) utilizaron el sistema Kiel para la clasificación de los desórdenes linfoproliferativos en gatos infectados con el virus de la inmunodeficiencia felina.⁶ En otro estudio, Chino et al (2013) clasificaron un grupo de gatos con linfoma espinal bajo este método.⁷ Sin embargo, cada informe incluye sólo ocho casos, lo cual está lejos de describir el comportamiento de los linfomas felinos y de brindar información para estimar el posible valor pronóstico.

Valli et al (2004) revisaron 602 casos de enfermedades linfoproliferativas en gatos a lo largo de diez años utilizando la clasificación del Instituto Nacional de Cáncer de EUA (Working Formulation) para definir histológicamente estas patologías. Estos investigadores encontraron que las características morfológicas son similares a las presentadas en los desórdenes linfoproliferativos de perros y humanos, por lo que, en esta clasificación, fue posible agruparlos de acuerdo a sus características en alto o bajo grado. A pesar de ello, el objetivo del estudio solo fue la aplicación del sistema de clasificación sin evaluar el factor pronóstico y la respuesta al tratamiento; pero sugiere la inmunotipificación como herramienta que aporta información clínica relevante.⁸

Otro hallazgo importante fue el alto grado de mitosis en pacientes LeVF positivos, en comparación con los negativos; esto corresponde con el hecho de que los gatos LeVF negativos con linfoma tengan respuesta pobre a la terapia y periodos cortos de remisión. Vezzali et al (2009) utilizaron el mismo sistema de clasificación en 171 casos (48 gatos) e incluyeron la inmunotipificación. Con esto, los investigadores concluyeron que se necesitan más estudios conjuntos entre clínicos y patólogos para mejorar la eficacia de las clasificaciones; asimismo, los resultados sugieren una clasificación diferente entre perros y gatos.⁹

En perros con desórdenes linfoproliferativos, la inmunotipificación tiene un importante valor pronóstico y de respuesta al tratamiento. Hasta la fecha, son pocos los trabajos enfocados en la inmunotipificación de los desórdenes linfoproliferativos en gatos. En el 2004, Petterson-Kane et al (2004) publicaron un estudio retrospectivo de 23 casos de linfoma alimentario en gatos, a los que se les practicó inmunohistoquímica usando los marcadores CD3 y CD79a; estos investigadores reportaron que el 65 % fueron positivos a CD79a, todos de alto grado (células grandes) (10), resultado que corresponde con nuestro caso de estudio. Sin embargo, Harvey (2012) menciona mayor positividad para el CD3 en gatos con LLA y positivos a LeVF.¹ En el estudio retrospectivo no se demostró una diferencia significativa en el tiempo de supervivencia entre los distintos fenotipos, lo que puede atribuirse al tamaño de la muestra (una población pequeña), por lo que concluyeron que es necesario realizar estudios con poblaciones más significativas.

En el 2016, ya existen distintas técnicas de inmunotipificación de las células neoplásicas en desórdenes linfoproliferativos de perros y gatos. En perros, el uso de citometría de flujo se ha convertido en un instrumento importante en el diagnóstico de linfoma/leucemia canino, contribuyendo a la evaluación del linaje celular y la clonalidad, la presentación de formas aberrantes, así como a la evaluación de la enfermedad residual mínima¹¹; incluso se ha llegado a considerar una herramienta fundamental para el pronóstico de estos pacientes.

Esta técnica no ha sido del todo estudiada en gatos, las más utilizadas han sido la inmunohistoquímica e la inmunocitoquímica; reportadas en inmunotipificación de desórdenes linfoproliferativos en esta especie.^{9,10,12}

El caso de estudio, que ahora investigamos, fue tipificado a través de técnicas de inmunohistoquímica; pero en nuestra opinión, la citometría de flujo es un método más completo y fiable en cuanto a inmunotipificación se refiere, ya que permite un estudio detallado de las células que se encuentran en la circulación sanguínea (para el caso de leucemias) u obtenidas por aspiración con aguja delgada de los linfonodos afectados; de manera que aportan información en cuanto a su morfología (tamaño y complejidad) y exhiben la presencia de distintos biomarcadores.

Una de sus principales limitantes es que requiere de equipos sofisticados, a diferencia de la inmunohistoquímica o inmunocitoquímica que son procedimientos de tipificación más accesibles y económicos.

A partir del siglo XXI, se empezó a utilizar la citometría de flujo en desórdenes linfoproliferativos en gatos con la finalidad de encontrar los patrones de expresión en las células neoplásicas y su posible implicación en el pronóstico del paciente. Guzera et al (2014), en su estudio retrospectivo, inmunotipificaron 19 casos en gatos mediante citometría de flujo. A los gatos se les dividió en dos grupos: uno con diagnóstico previo de linfoma, y otro con desórdenes linfoproliferativos no neoplásicos.

Guzera y su equipo utilizaron los marcadores CD4, CD5, CD8 α/β y CD21 RPE, analizaron las muestras de seis casos de linfomas alimentarios, tres de linfoma multicéntrico, uno con linfoma extranodal y uno con leucemia/linfoma multicéntrico. La citometría de flujo logró inmunotipificar 12 de los 13 casos de linfoma. De estos, ocho casos (cinco linfomas alimentarios, un linfoma multicéntrico, un linfoma mediastinal y un linfoma extranodal-retrobulvar) fueron de tipo B, mientras que los otros cuatro (un linfoma alimentario, un linfoma/leucemia multicéntrico, un linfoma multicéntrico y un linfoma mediastinal) fueron del tipo T.¹²

Si se consideran estos resultados y los datos en la literatura, los autores recomiendan el uso de la citometría de flujo como apoyo de la citología, por encima de otros estudios que requieren de mayor tiempo y llegan a ser más invasivos como la histopatología.

Chino et al (2013), hallaron que todos los linfomas en gatos con infección por retrovirus (LeVF o VIF) mostraron la morfología de alto grado⁷; situación que se correlaciona con el caso aquí estudiado. Se considera que el retrovirus puede tener un potencial en la carcinogénesis en la fase temprana de la diferenciación linfoide. En especial el LeFV tiende a infectar células en división.

En esta investigación, los linfomas en gatos con infección por VIF tuvieron alta prevalencia del subtipo de células B, lo que se cree puede estar asociado a la estimulación de estas células durante el proceso viral.

Como vemos en la literatura, existe un interés creciente en la aplicación de distintas herramientas de diagnóstico que ayuden a entender mejor el comportamiento de los desórdenes linfoproliferativos en gatos. Es necesario hacer estudios de inmunotipificación con una población más amplia, debido a la prevalencia de LeVF en nuestro país para poder establecer valores pronósticos de esta técnica en los gatos infectados con el virus que desarrollan desórdenes linfoproliferativos.

En el paciente de nuestro estudio, quien desarrolló una leucemia linfoblástica aguda de células tipo B, el progreso del padecimiento fue 400 días después del diagnóstico de la enfermedad viral. Debido a que no se dio un seguimiento oportuno, no fue posible detectar cuándo iniciaron las alteraciones hematopoyéticas, pero el curso de la enfermedad fue agudo con deterioro severo del estado general del paciente.

Sería importante reportar el curso, los signos clínicos y las alteraciones hematopoyéticas, así como la inmunotipificación de los desórdenes linfoproliferativos que pueden llegar a desarrollarse en un paciente LeVF positivo para correlacionarlos con el presente caso de estudio. Aunque la presencia del virus *per se*, tiene valor pronóstico importante, sin duda la inmunotipificación de neoplasias de origen linfóide es una técnica cada vez más utilizada en medicina veterinaria que abre una ventana en el estudio de la naturaleza de estas alteraciones en los gatos.

Financiamiento

Las pruebas de laboratorio realizadas fue otorgado por el propietario del paciente.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Rubén Danilo Méndez Medina por su apoyo en la interpretación de los hallazgos macro y microscópicos del estudio *post mortem*.

Conflictos de interés

Los autores de este trabajo declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Carrasco RA: Clínico responsable del paciente.

Romero RL: Interpretación de los hallazgos histopatológicos, redacción de trabajo escrito.

Pérez EJM, García OLE: Evaluación e interpretación de las pruebas de hematología y bioquímica clínica, redacción del trabajo escrito.

Aguayo AO: Interpretación de los hallazgos histopatológicos

Referencias

1. Harvey WJ. 2012. Disorders of bone marrow. En: Veterinary Hematology a Diagnostic Guide and Color Atlas. St. Louis, Missouri, EUA: Elsevier. p. 298—300.
2. Hartmann K. Feline leukemia virus infection. En: Green EC Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4a ed. St. Louis, Missouri, USA: Elsevier; 2012. p. 113—8.
3. Vall DM, Young KM. Hematopoietic tumors. En: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4a. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2007. p. 699—784.

4. Vail DM, Moore AS, Ogilvie GK, Volk LM. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J Vet Intern Med.* septiembre de 1998;12:249–354. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02134.x.
5. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelényi G, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *The Lancet.* 6 febrero 1988;331(8580):292–3. DOI: 10.1016/S0140-6736(88)90367-4.
6. Callanan JJ, Jones BA, Irvine J, Willett BJ, McCandish IA, Jarrett O. Histologic Classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections. *Vet Pathol.* 1996;33:264–72.
7. Chino J, Fujino Y, Kobayashi T, Goto-Koshino Y, Ohno K, Nakayama H, et al. Cytomorphological and immunological classification of feline lymphomas: clinico-pathological features of 76 cases. *J Vet Med Sci.* 21 enero 2013;75(6):701–7. DOI: 10.1292/jvms.12-0246.
8. Valli VE, Jacobs RM, Norris A, Couto CG, Morrison WB, McCaw D, et al. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Investigation.* 1 julio 2000;12(4):295–306. DOI: 10.1177/104063870001200401.
9. Vezzali E, Parodi AL, Marcato PS, Bettini G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol.* Marzo 2010;8(1):38–49. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2009.00201.x.
10. Petterson-Kane JC, Kugler BP, Francis K. The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. *J Comp Pathol.* 2004;130:220–2. DOI: 10.1016/j.jcpa.2003.09.008.
11. Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J.* mayo de 2011;188(2):149–55. DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.03.011.
12. Guzera M, Cian F, Leo C, Winnicka A, Archer J. The use of flow cytometry for Immunophenotyping lymphoproliferative disorders in cats: a retrospective study of 19 cases. *Vet Comp Oncol.* 2 junio 2014;14(S1):40–51. DOI: 10.1111/vco.12098.