



TRABAJO FINAL

Institución: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias.

Carrera: Especialización en Diagnóstico de Laboratorio Veterinario

Título: “Aproximación diagnóstica a los distintos tipos de leucemias en caninos”

Alumno: Mg Med Vet Cora Colla

Nombre del Director: Dra Sandra Arauz

Nombre del Director: Dra Graciela Mira

Agradecimientos:

- A la Dra Sandra Arauz por ser mi tutora y ayudarme en la realización de este trabajo
- A las Dra Marcela Pereyra y Dra Mercedes Fianza por brindarme sus conocimientos y contribuir a mi formación
- A la Dra Graciela Mira por ser codirectora en este trabajo, ser mi maestra y amiga, y por compartir siempre su sabiduría e impulsarme a crecer.

Indice	Página
• Introducción	5
• Breve recordatorio fisiológico	5
• Neoplasias hematopoyéticas	9
• Leucemias	9
*Clasificación de las leucemias	10
*Etiología	11
*Patogenia	12
• Leucemias Agudas	14
*Características Clínicas	14
*Características Hematológicas	15
*Diagnóstico	16
*Clasificación	19
*Tratamiento	20
• Leucemias Crónicas	22
*Características Clínicas	23
*Características Hematológicas	24

*Diagnóstico	25
*Clasificación	28
*Tratamiento	31
• Desarrollo del Trabajo	
*Objetivos	33
*Hipótesis de Partida	33
*Materiales y Métodos	34
*Resultados	35
*Discusión	38
*Conclusiones	40
• Bibliografía	43

INTRODUCCIÓN

Las **leucemias** son enfermedades progresivas de la médula ósea caracterizadas por una proliferación y desarrollo anormal de las células hematopoyéticas y sus precursores. En la práctica de pequeños animales, las leucemias no son un diagnóstico frecuente, sin embargo el incremento en el uso de la evaluación hematológica del paciente enfermo ha conducido a la apreciación de que las leucemias son una causa significativa de morbilidad y mortalidad en perros y gatos.

En Medicina Veterinaria las leucemias en caninos son patologías poco frecuentes que representan el 10% de las neoplasias hematopoyéticas, muchas veces pueden estar mal caracterizadas, por lo cual su diagnóstico resulta un desafío.

En relación al diagnóstico, son fundamentales la historia clínica del paciente, el examen hematológico completo, los estudios a nivel de medular así como las tinciones citoquímicas.

Breve recordatorio fisiológico:

La hematopoyesis es el proceso de proliferación, diferenciación y maduración de las células madre en células sanguíneas diferenciadas. Para poder entender cómo se clasifican las neoplasias hematológicas es importante recordar brevemente la hematopoyesis normal.

La médula ósea es el principal órgano hematopoyético del organismo. En los animales jóvenes, el tejido hematopoyético activo se encuentra tanto en los huesos largos como en los huesos planos. Cuando cesa el crecimiento, disminuye la actividad hematopoyética en el área central de los huesos largos. En los individuos adultos, la mayor parte de la actividad hematopoyética se produce en los huesos planos y en los extremos de los huesos largos. El área central de los huesos largos contiene principalmente grasa con escaso tejido hematopoyético activo.⁽²⁾

El tejido hematopoyético activo es muy vascular y consiste en islas de tejido hematopoyético rodeadas por senos vasculares. Las islas de tejido hematopoyético se componen de: series celulares eritroides, granulocíticas, monocíticas y trombocíticas; células estructurales de la médula ósea (células adventicias), células grasas y algunos macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y mastocitos. Las islas de tejido hematopoyético se encuentran limitadas por el recubrimiento endotelial de los senos vasculares.⁽²⁾

Básicamente, el tejido hematopoyético está constituido por células precursoras en distintos estadios de maduración y por el llamado microambiente hematopoyético, que es una amalgama de estirpes celulares.⁽⁵⁾

Dentro de la médula ósea, aparecen al menos tres tipos diferentes de Stem cells (HSCs) (células progenitoras). Las HSCs son células progenitoras pluripotenciales, que dan origen a células maduras de componentes de la sangre (ej: eritrocitos, neutrófilos, monocitos, plaquetas, etc). Los componentes del estroma de la médula ósea, como hueso, cartílago, grasa y tejido conectivo derivan de células progenitoras mesenquimáticas (MSCs), también son conocidas como células del estroma de la médula. Finalmente, los precursores de las células endoteliales (EPCs) son una población de células derivadas de la médula ósea con funciones de angiogénesis. Las EPCs son movilizadas desde la médula hacia la sangre periférica, para localizarse en sitios de neovascularización que están presentes en áreas de inflamación, tumores muy vascularizados o cicatrización de heridas.⁽⁴¹⁾

A las HSCs se las considera “células pluripotenciales hematopoyéticas” por dos propiedades: pluripotencialidad, o capacidad de dar origen a las distintas estirpes celulares, y autorrenovación, o propiedad de perpetuarse generando células iguales en todo a sí mismas. Esta última capacidad es esencial para el mantenimiento de la hematopoyesis a lo largo de la vida, ya que sin la autorrenovación se agotaría rápidamente el pool disponible de células pluripotenciales. Las dimensiones de este pool están estrechamente reguladas, probablemente por el microambiente hematopoyético. Existen “nichos” formados por células estromales en íntimo contacto con las células progenitoras. Estos “nichos” acogerían a las células pluripotenciales inactivas, impidiéndoles entrar en la cascada de la diferenciación. El número y la calidad de estos “nichos” condicionaría el número de células pluripotenciales, por lo que el aumento o la reducción de los mismos podría explicar la expansión o extinción de la hematopoyesis que se observa en ciertas enfermedades hematológicas.⁽⁵⁾

La célula pluripotencial pierde la capacidad de autorreplicarse cuando entra en el proceso de diferenciación. Hasta hoy no se ha conseguido probar la capacidad autorreplicativa de progenitores que ya han emprendido la diferenciación a una determinada estirpe (unidad formadora de colonias ó CFU-C). A medida que el progenitor hematopoyético se va diferenciando pierde su potencial proliferativo. El número de células terminales generado por un tipo de progenitor está determinado por el tiempo de diferenciación, es decir, el período necesario para la adquisición de

estructuras de células funcionales, y en consecuencia, con el número de posibles mitosis dentro de ese período. Se sabe que el programa de diferenciación y la pérdida de la capacidad del núcleo para proliferar, corren paralelas con el aumento de la síntesis proteínica necesaria para la función de la célula madura. Por otro lado, la pluripotencialidad, se pierde a medida que el progenitor hematopoyético adquiere receptores para factores de crecimiento específicos de la estirpe y de forma concomitante, pierde receptores para factores de las otras estirpes.⁽⁵⁾

Los estudios en animales indican que todas las células sanguíneas derivan de una célula estaminal pluripotencial común. Las células estaminales se presentan dentro de la médula ósea y sangre, se pueden autorreplicar y/o diferenciar en un microambiente inductivo hematopoyético favorable bajo la influencia de factores de crecimiento. La granulopoyesis o granulocitopoyesis es un mecanismo por el cual se producen en forma secuenciada y ordenada los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. La célula involucrada en la producción de neutrófilos y monocitos es conocida como unidad formadora de colonias granulocítica-monocítica (UFC-GM); esta célula en un estado temprano, es una célula bipotencial que con una estimulación apropiada posteriormente se diferencia en dos células comisionadas unipotenciales UFC-Gy UFC-M encargadas de producir células precursoras de neutrófilos y monocitos respectivamente.⁽⁴⁶⁾ Dentro de la serie linfoide existen células progenitoras comunes para natural killer (NK) linfocitos B y linfocitos T.

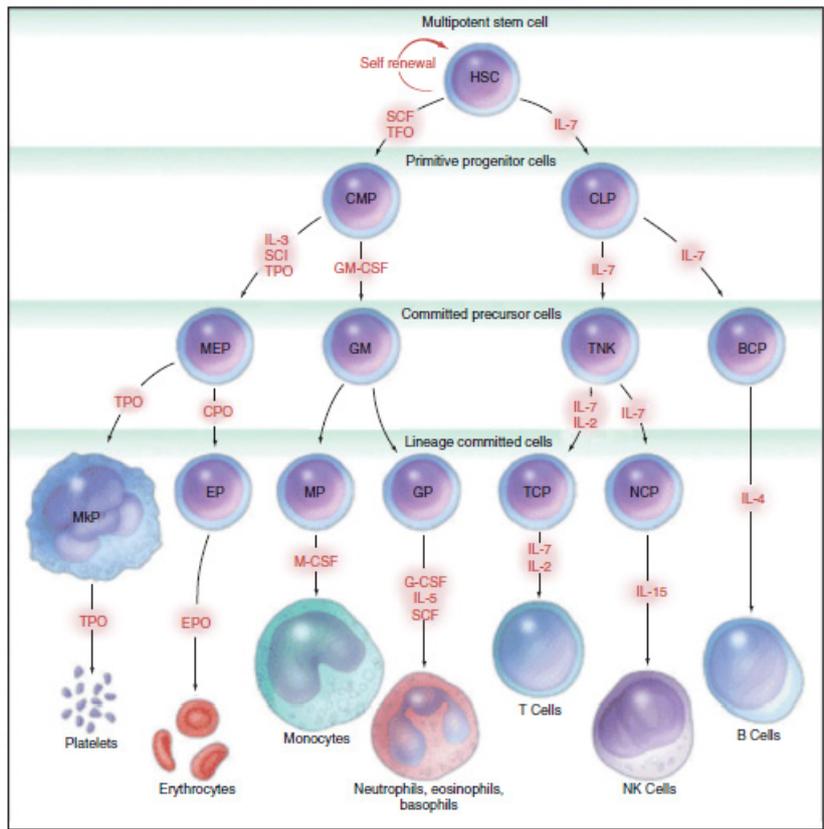


Figura 1: Modelo general de hematopoyesis.

NEOPLASIAS HEMATOPOYÉTICAS

Los tumores hematopoyéticos se dividen en dos grandes grupos:

1)- TUMORES LINFOPROLIFERATIVOS:

- A) Linfoma
- B) Leucemia Linfoide (aguda y crónica)
- C) Tumores de células plasmáticas

2)- TUMORES MIELOPROLIFERATIVOS:

- Leucemias: *mieloide (o neutrofílica)
- *monocítica
 - *mielomonocítica
 - *mielosis eritremica
 - *eritroleucemia
 - *megacariocítica

Los trastornos linfoproliferativos representan el 84% de las neoplasias hematopoyéticas en el perro y el 69% en el gato. Dentro de los trastornos linfoproliferativos el Linfoma es el más frecuente tanto en caninos (90%) como en felinos (60-70%)⁽⁴⁶⁾

LEUCEMIAS

Las **leucemias** son enfermedades progresivas de la médula ósea caracterizadas por una proliferación y desarrollo anormal de las células hematopoyéticas y sus precursores.

Esta proliferación de células tumorales hematopoyéticas causa la destrucción de los precursores celulares de las líneas hematopoyéticas normales (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), Las células tumorales tienen un doble mecanismo de acción sobre los precursores normales de las series hematopoyéticas; 1) al multiplicarse muy rápidamente las células tumorales compiten por los nutrientes y el espacio físico con los precursores normales hematopoyéticos quitándoles parte de los elementos

necesarios para su multiplicación; 2) las células tumorales producen sustancias inhibitoras de los precursores normales de cada línea celular.⁽⁴⁶⁾

CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS:

Las leucemias pueden clasificarse desde distintos puntos de vista. Pueden tener o no expresión en sangre periférica. Por ello, se las clasifica en **leucemias aleucémicas**, aquellas en las que no se observan células tumorales en sangre periférica; **leucemias subleucémicas**, sólo son evidentes escasas células tumorales en frotis sanguíneos; y **leucemias leucémicas**, se encuentra un porcentaje muy elevado de células tumorales en sangre periférica.

Las leucemias son ampliamente categorizadas según su origen, mielóide o linfóide. Las neoplasias mieloides (también llamados desórdenes mieloproliferativos) han sido clasificadas según el linaje celular implicado, en cuatro grandes categorías, incluyendo granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) monocitos, eritrocitos y megacariocitos. Al tener una stem cell común las neoplasias mieloides pueden comenzar afectando a una línea celular y al progresar la enfermedad puede comprometer otro linaje. Por ej. la mielosis eritrémica (neoplasia que compromete al eritrocito) puede extenderse e involucrar a la progenie del neutrófilo dando lugar a la llamada eritroleucemia (neoplasia que compromete al eritrocito y al neutrófilo). Las leucemias linfoides se dividen según el tipo de linfocito comprometido en linfocitos B, linfocitos T o a linfocitos NK (natural killer o citotóxicos), siendo estas últimas leucemias de muy mal pronóstico por la agresividad de las células NK.

A su vez, tanto las leucemias mieloides como las linfoides, han sido divididas en agudas y crónicas basados en la presentación clínica y en las características madurativas de la célula comprometida. El elemento celular que caracteriza a las leucemias agudas es el blasto, mientras que las formas crónicas presentan células morfológicamente diferenciadas pero afuncionales.

En caninos las leucemias constituyen menos del 10% de las neoplasias hematopoyéticas, por lo que se consideran enfermedades raras. En líneas generales se considera que las leucemias linfoides en caninos, son más comunes que las mieloides.

ETIOLOGIA

Los orígenes de la leucemia son tan misteriosos como el resto de las formas de cáncer. No hay un factor etiológico único que pueda adaptarse a todos los tipos de leucemias.

Factores ambientales como la exposición a radiaciones, a drogas o a ciertos agentes tóxicos y las alteraciones genéticas jugarían un importante rol como agentes etiológicos. ^(10,40,32,33,36,37,38)

Aunque los **cambios genéticos** pueden producirse espontáneamente en el transcurso de la vida del animal, varios **agentes ambientales** pueden contribuir en la lesión del ADN y acelerar la progresión de la neoplasia. Experimentalmente, la exposición a radiación ionizante induce lesión en el ADN y provoca enfermedades mieloproliferativas en los perros.

En Medicina Humana, se ha estudiado el poder leucemógeno de las **radiaciones ionizantes** en la población japonesa que estuvo expuesta a las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki, la cual experimentó un incremento en la frecuencia de leucemias agudas con respecto a la esperada. El pico de leucemia radiogénica se produjo a los cinco años de la exposición. Otro caso, fue el accidente nuclear de Chernobyl (antigua URSS) donde se observó un aumento de la incidencia de leucemias en la población expuesta. El riesgo de que se desarrolle una leucemia en personas expuestas a radiaciones, además de la susceptibilidad individual está en relación directa con la dosis, el tiempo de exposición y la superficie corporal expuesta, persistiendo dicho riesgo durante muchos años.⁽⁵⁾

En cuanto a la exposición a **sustancias tóxicas**, algunos productos químicos (derivados del benceno) y medicamentos (cloranfenicol y agentes alquilantes) tiene un potencial leucemógeno evidente. El riesgo se incrementa en pacientes que reciben simultáneamente quimioterapia y radioterapia.⁽⁵⁾

En felinos, el retrovirus oncogénico Virus de la Leucemia Felina (ViLeF) , es conocido por ser importante en el desarrollo de enfermedades mieloproliferativas y linfoproliferativas, mediante la inserción del provirus en el genoma del gato y la consecuente alteración de la función de los genes.⁽⁹⁾ En felinos también se encontró una asociación positiva entre el Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF) y el desarrollo de leucemias mieloides.⁽⁴⁶⁾

En humanos, muchas leucemias, surgen cuando el genoma se interrumpe por reordenamiento estructurales de los cromosomas, por ejemplo, translocaciones e inserciones. En muchos casos, una redistribución cromosómica única, está consistentemente identificada con un tipo particular de leucemia. En la leucemia mieloide crónica (LMC), una translocación recíproca entre el cromosoma 9 y 22 conduce a un cromosoma 22 más corto, ya que está identificado citogenéticamente y se llama cromosoma “**Filadelfia**”, presente en el 95% de los pacientes. Los genes allí ubicados dan como resultado un gen quimérico ABL/BCR y la producción de una nueva proteína de fusión BCR/ABL p210, con actividad tirosin-quinasa intrínseca que provoca la alteración de los mecanismos reguladores de: proliferación, diferenciación y muerte celular programada. Convirtiéndose estas líneas celulares en inmortales. El gen BCR/ABL puede ser detectado mediante técnicas de biología molecular como la de PCR y su hallazgo equivale a encontrar el CrPh1.^(5,10,22,26,27)

Algunas investigaciones reportan un equivalente, en Medicina Veterinaria, al cromosoma Filadelfia que involucra la translocación entre los cromosomas 9 y 26 llamado cromosoma “**Raleigh**” que genera una nueva proteína análoga a la producida en humanos.^(7,9) Sin embargo estos hallazgos necesitan mayores estudios.

En las leucemias linfoides muchas de las translocaciones, afectan al loci que codifica las inmunoglobulinas y receptores de las células T y B, ya que varias subunidades de los receptores de cromosomas diferentes se reordenan. Los estudios citogenéticos de leucemia en el perro son limitados y aunque se han identificado translocaciones, todavía no se han detectado cambios consistentes.⁽⁹⁾

PATOGENIA

Las leucemias son consideradas un proceso hematopoyético aberrante, iniciado en una leucemia de células progenitoras, las cuales mantienen la capacidad de proliferación indefinida a través de la acumulación de mutaciones o de producir cambios epigenéticos. En la hematopoyesis normal, la diferenciación escalonada de las células hematopoyéticas progenitoras (stem cells) genera una jerarquía de la población de progenitores, cada uno con una progresiva restricción del potencial de desarrollo, hasta que finalmente se producen todas las células maduras de la sangre. De manera similar, a la hematopoyesis normal, las leucemias tienen una capacidad ilimitada de replicación de las stem cells y aparecen progenitores leucémicos clonogénicos. Experimentalmente, las leucemias probablemente se inicien con una

serie de eventos de transformaciones que toman lugar en la población de stem cells, como mutaciones, cambios epigenéticos o la expresión de ciertos genes que aumentan la capacidad de replicación. De hecho, la desregulación del mecanismo de autorreplicación, parece ser el camino más común usado por las leucemias mieloides agudas asociado a la fusión de genes para transformar la población de células progenitoras.⁽⁴¹⁾

Dentro de los estudios de las bases moleculares de la leucemia, el más avanzado es el de la leucemia mieloide crónica (LMC). Basados en la patogenia molecular de la LMC en humanos, se ha postulado que las leucemias en general resultan de una mutación de genes que codifican moléculas claves que desregulan el control dependiente de receptores de citoquinas que deciden la expansión proliferativa de las células hematopoyéticas. Para el desarrollo de las leucemias, una ventaja de crecimiento selectiva basta que ocurra en la mutación de una sola célula, para que permita someter a su progenie a una expansión proliferativa, lo que conduce en última instancia a la acumulación y diseminación de las células de la leucemia. En el caso de las LMC de humanos, la mutación BCR/ABL provee esa ventaja de crecimiento selectiva que genera una perturbación en el receptor de citoquinas, una expansión proliferativa y subsecuentemente una acumulación de mutaciones múltiples adicionales y la transformación de las células blásticas.⁽⁴¹⁾

LEUCEMIAS AGUDAS

Las leucemias agudas se caracterizan por tener un curso rápido (pocas semanas) y agresivo, de presentación abrupta y que en caso de no tratarse conduce a falla orgánica y muerte en poco tiempo. Si bien el origen de la leucemia está en médula ósea y las mismas pueden liberarse a sangre, no es infrecuente que se observe infiltración de las células tumorales en hígado, bazo y linfonódulos.

La edad de los enfermos varía de 1 a 12 años, con una mediana de 6 años; el paciente presenta signos clínicos inespecíficos y en general la sobrevida es corta.^(6,21)

Características clínicas:

Generalmente, los signos clínicos y hallazgos de la exploración física en perros con leucemia aguda son vagos e inespecíficos. La mayoría de los dueños solicita atención veterinaria cuando observan que sus perros están letárgicos o anoréxicos, o cuando presentan fiebre persistente o recurrente, pérdida de peso, cojera u otros signo inespecífico; ocasionalmente aparecen alteraciones neurológicas. Algunos de estos síntomas pueden aparecer de forma aguda (en días) y la duración de las manifestaciones clínicas rara vez es mayor de 1 mes y muchas veces es menor de 2 semanas.⁽¹⁸⁾ Durante la exploración física, los hallazgos más frecuentes son esplenomegalia, hepatomegalia, palidez de mucosas, fiebre y una ligera linfadenopatía generalizada.^(6,10,21,35) Generalmente, el bazo está muy aumentado de tamaño, presentando una superficie lisa a la palpación. Una inspección cuidadosa de las mucosas de perros con leucemia aguda revela, con frecuencia, la presencia de petequias y/o equimosis, además de la palidez. Puede aparecer ictericia si se ha producido una infiltración leucémica hepática masiva. En la mayor parte de los perros con leucemia aguda, la linfadenopatía generalizada es ligera, a diferencia de lo observado en casos de linfoma, que cursan con aumento masivo del tamaño ganglionar. En otras palabras, la hepatoesplenomegalia es más evidente que la linfadenopatía. La mayoría de los perros con leucemia presentan signos clínicos (están clínicamente enfermos), mientras que la mayoría de los perros con linfoma son asintomáticos. Aunque generalmente es imposible diferenciar entre leucemia aguda mieloide y linfoide basándose sólo en los hallazgos de la exploración, existen algunas diferencias sutiles: síntomas como la cojera, fiebre y lesiones oculares son más frecuentes en perros con Leucemia Mieloide Aguda (LMA), mientras que los signos neurológicos lo son en perros con Leucemia Linfoide Aguda (LLA).⁽⁷⁾

Es importante explicar el porqué de los signos clínicos y datos del examen del paciente. Los signos clínicos inespecíficos como letargo, anorexia, decaimiento, palidez de las mucosas son las anormalidades más frecuentes notadas por los propietarios y están asociadas a la anemia, producto de una disminución de los precursores eritroides en médula ósea.^(6,18,35) La presencia de petequias y equimosis están relacionadas con la trombocitopenia, por disminución de los precursores plaquetarios en médula ósea. La fiebre y los cuadros infecciosos se presentan por la disminución de neutrófilos funcionales, por disminuir los precursores en médula. Esta disminución de los precursores de todas las líneas hematopoyéticas, está asociado, por un lado a la competencia de las células tumorales por los nutrientes y el espacio físico en médula y por el otro, a la síntesis de factores inhibidores de los precursores hematopoyéticos normales.⁽⁴⁶⁾

En un estudio, más de un tercio de perros tuvieron claudicación intermitente en forma alterna en distintos miembros, esto puede estar asociado a la infiltración de las células neoplásicas a nivel subperióstico o por infartos óseos o lesiones neuronales mediadas por reacciones inmunológicas.⁽⁶⁾ Los signos neurológicos son inespecíficos, y no son frecuentes de ver, salvo en pacientes que cursen con leucemias leucémicas donde el exagerado recuento leucocitario provoca un espesamiento de la sangre con enlentecimiento de la circulación, lo cual a nivel de SNC puede traer como consecuencia manifestaciones neurológicas.⁽⁴⁶⁾

Los cambios oculares comprenden desprendimiento de retina, a menudo con sangrado; hifema, glaucoma, corioretinitis, quemosis y conjuntivitis. Estos cambios se presentan en aproximadamente el 30% de los perros con LMA.^(6,21)

Características hematológicas:

Generalmente, los perros con leucemia aguda presentan alteraciones hematológicas evidentes. Las células anormales (leucémicas) se observan en sangre periférica en la mayoría de los perros con LMA y LLA, aunque es ligeramente más frecuente en la segunda (algunos perros con LMA no presentan blastos circulantes). Casi todos los perros con LMA y LLA presentan citopenias aisladas, bicitopenias o pancitopenias (disminución importante de los elementos celulares normales, ya sea de dos líneas o de las tres de ellas) Se detectan reacciones leucoeritroblásticas en, aproximadamente, la mitad de los perros con LMA, pero son raras en perros con LLA. El recuento leucocitario y de blastos es más elevado en perros con LLA.^(6,18) La mayoría de los perros con LMA y LLA presentan anemia, de tipo arregenenerativa normocítica, normocrómica, severa. Generalmente, las leucemias agudas se

acompañan de trombocitopenia severa. Tanto la anemia como la trombocitopenia serán siempre severas y sintomáticas en las leucemias agudas por la rapidez y masiva invasión de las células tumorales en médula ósea.⁽⁴⁶⁾

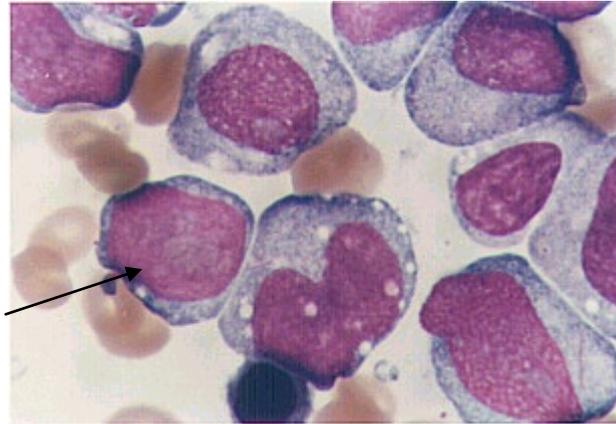


Figura 2 Leucemia Mieloide Aguda. Mieloblastos: células grandes, núcleo con cromatina laxa, nucleólos evidentes, basofilia citoplasmática, zona clara del aparato de Golgi

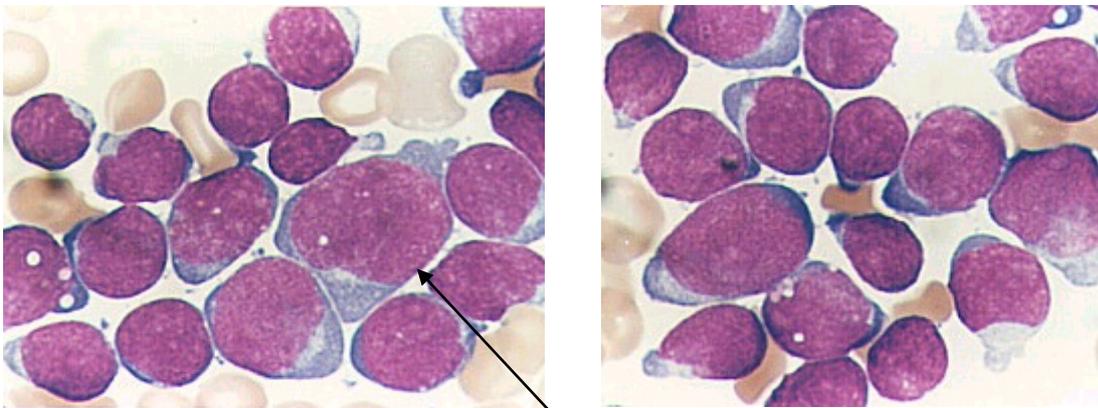


Figura 3 . Leucemia Linfoide Aguda. Linfoblastos: nucleólos, cromatina laxa, basofilia citoplasmática, zona clara del aparato Golgi

Diagnóstico:

Normalmente, los datos de la anamnesis, los signos clínicos y los hallazgos de la exploración física permiten establecer un diagnóstico presuntivo de leucemia aguda, que se confirma con la evaluación del hemograma; sin embargo, los cambios hematológicos en perros con “leucemia aleucémica” pueden ser similares a los de la ehrlichiosis u otras alteraciones de médula ósea. Está indicado realizar un aspirado o

biopsia de médula ósea para evaluar la extensión de la enfermedad. También es sencillo obtener aspirados de bazo, hígado o ganglios para su estudio citológico, aunque la información que proporcionan no siempre es útil para establecer el diagnóstico o el pronóstico.⁽⁷⁾

En cuanto a la punción aspiración de médula ósea, en condiciones normales cuando se realiza una citología de médula cualquiera sea la línea que se evalúe podría representarse a la progenie como un triángulo donde en el vértice superior se encuentran los blastos (o sea la célula más inmadura de cada serie) y a medida que esas células se van multiplicando y madurando cada vez habrá mayor cantidad de células. Por lo tanto, cuando se realiza una citología medular y se encuentra que el 30% o más de las células halladas son blastos, se confirma que el paciente padece una leucemia aguda.⁽⁴⁶⁾

Ahora bien, cuando en una citología (sea medular o sanguínea) se encuentran blastos, nunca se puede asegurar a través de las tinciones de rutina (tipo Romanowsky) si ese blasto es mielóide o linfóide dado que es imposible reconocerlos. La única forma de establecer el linaje del mismo es a través de una tinción citoquímica: **“Mieloperoxidasa”**. Esta enzima está presente en el citoplasma de las células mieloides (neutrófilos) pero no en las linfoides. Por lo tanto si se encuentran en sangre periférica y/o en médula ósea blastos, se hace la tinción de mieloperoxidasa y si es positiva se confirma que los blastos son mieloblastos; pero si es negativa, se confirma el origen linfóide de los mismos. Es importante realizar esta tinción y determinar el origen de los blastos ya que si bien las leucemias son patologías de pronóstico malo y de corta sobrevida, está comprobado que cuando la leucemia es linfoblástica o LLA, existe la posibilidad de instaurar un tratamiento y se puede lograr una sobrevida del paciente que podrá variar entre 6 meses a un año o año y medio, con buena calidad de vida. Pero también es sabido que si la leucemia es mieloblástica o LMA, no existe en medicina veterinaria protocolos como para poder controlar la enfermedad.⁽⁴⁶⁾

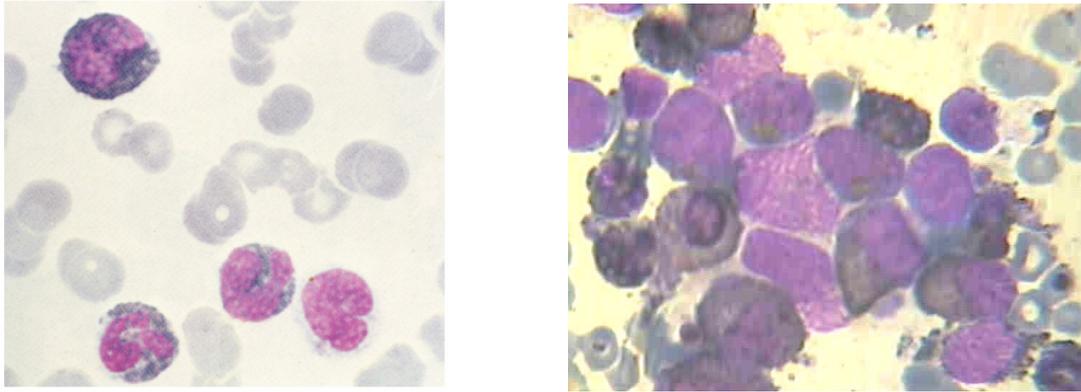


Figura 4. Tinción de mieloperoxidasa positiva. Mieloblastos

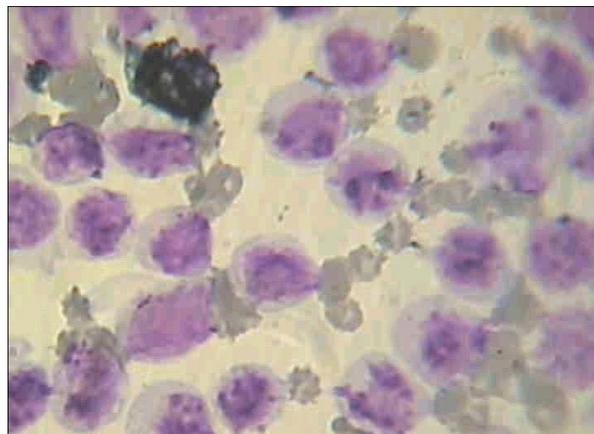


Figura 5 Tinción de mieloperoxidasa negativa. Linfoblastos

Hoy en día, existen nuevas tecnologías en base de citometría de flujo y coloraciones inmunohistoquímicas que han permitido establecer el tipo de leucemia analizando, la sangre periférica, incluso en perros sin leucemia evidente.^(13,42) La inmunotinción utilizando marcadores (anticuerpos) de grupos de diferenciación (CD) puede colaborar diferenciando entre LMA y LLA. Las células de la LMA se colorean con CD1c, CD11 CD14, o DM-5; las células de la LLA lo hacen con CD3 (células T) CD79a (células B) o CD8⁽²⁷⁾ Aunque estas técnicas están restringidas debido al acceso a infraestructura adecuada, en los próximos años, sin lugar a dudas se producirá la aplicación creciente de estas metodologías.⁽⁴¹⁾

Dentro de los diagnósticos diferenciales de la leucemia aguda, además del linfoma, se deben considerar otras alteraciones de los sistemas mononuclear-fagocitario o hematopoyético, como la histiocitosis maligna o sistémica, el mastocitoma sistémico

(leucemia de mastocitos) y enfermedades infecciosas como ehrlichiosis, bartonelosis, micoplasmosis y micobacteriosis

Clasificación

En Medicina Humana, al igual que en Medicina Veterinaria, las LLA se clasifican de acuerdo al sistema FAB (French-American- British system) basado en los rasgos morfológicos de las células en médula ósea y en sangre periférica cuando se utilizan los colorantes de rutina. Distingue tres formas de LLA: LLA-L1, LLA-L2 y LLA-3. Esta clasificación se hace teniendo en cuenta la edad del paciente, los rasgos del núcleo y del citoplasma de las células y la presencia o no de prominentes nucleolos. No tiene valor pronóstico ni terapéutico.

Criterios que se incluyen para la clasificación:

- **Relación núcleo-citoplasma.**
- **Presencia de nucleolos prominentes.**
- **Membranas nucleares irregulares.**
- **Tamaño celular.**

Criterio	Puntos
Relación núcleo-citoplasma alta en $\geq 75\%$ de células las leucémicas.	+1
Relación núcleo-citoplasma baja en $\geq 25\%$ de células las leucémicas.	-1
0 o 1 pequeño nucleolo en $\geq 75\%$ de las células.	+1
1 o más prominentes nucleolos en $\geq 25\%$ de las células	-1
Membranas nucleares irregulares en $\geq 25\%$ de las células	-1
Grandes células $> 50\%$ de las células	-1

Interpretación:

Score mínimo:-4

Score máximo:+2

Score de 0 a 2 indica L1

Score de -1 a -4 indica L2

El sistema de clasificación para las LMA en caninos fue desarrollado por American Society for Veterinary Clinical Pathology Animal Leukemia Study Group⁽²⁰⁾ Es una adaptación del sistema de clasificación FAB, en donde se subdivide en 6 subtipos (M1-M6) basados en un recuento mayor al 30% de células blásticas, cambios celulares morfológicos y citoquímicos, en médula ósea y sangre periférica. Este porcentaje fue disminuido a un 20% en Medicina Humana en un sistema de clasificación reciente de la OMS (Organización Mundial de la Salud), y parece que hay un consenso para hacerlo en la Medicina Veterinaria⁽²⁵⁾.

Tratamiento:

Generalmente, el tratamiento de perros con leucemias agudas es infructuoso. La mayoría de los perros responden mal al tratamiento, y las remisiones prolongadas son raras. El fracaso del tratamiento se debe a uno o varios de los siguientes factores:

1. Fracaso en inducir la remisión (más frecuente en LMA que en LLA)
2. Fracaso en mantener la remisión
3. La presencia o desarrollo de una insuficiencia funcional como consecuencia de la infiltración leucémica del órgano, que impide la administración de una quimioterapia combinada agresiva (porque se incrementa la toxicidad)
4. El desarrollo de sepsis y/o hemorragia como consecuencia de las citopenias ya existentes o inducidas por el tratamiento⁽⁷⁾

El tratamiento de las LLA está dirigido hacia la destrucción de las células leucémicas y al restablecimiento de la hematopoyesis normal. Las respuestas al tratamiento y los tiempos de supervivencia son muchos menos significativos que en los casos de linfoma. Las tasas de remisión son del 20-40% en contraste del 90% que presentan los perros con linfoma. Los tiempos de supervivencia también son más cortos (media 1-3 meses) que los de perros con linfoma (media de 12 a 18 meses). Los perros no tratados viven menos de 2 semanas. Los protocolos antiblásticos suelen combinar vincristina, ciclofosfamida, prednisona y L-asparaginasa.

Las remisiones prolongadas en perros con LMA tratados con quimioterapia son extremadamente raras. En la mayoría de los casos, no suele observarse respuesta a los protocolos. Si el animal responde, la remisión suele ser muy corta, con tiempos de supervivencia que difícilmente superan los 3 meses. Los protocolos que se han empleado para la LMA son similares a los empleados para la leucemia mieloide

crónica (LMC) con agudización para eliminar los blastos de sangre y medula, estos tratamientos combinan arabinosido de citosina con prednisolona. El pronóstico de los pacientes con LMA es malo debido a la falta de eficacia probada con los agentes quimioterápicos y la ausencia del soporte adecuado con transfusiones especializadas (por ej. granulocitos) y cobertura antimicrobiana. El empleo de algún factor estimulante de colonia para sostener los elementos medulares normales es controvertido, porque estos productos también fomentan el crecimiento de las células malignas. No obstante, el crecimiento estimulado puede hacer que las células tumorales sean más susceptibles a la quimioterapia⁽⁴⁶⁾

LEUCEMIAS CRÓNICAS

Las leucemias crónicas son neoplasias hematopoyéticas originadas en médula ósea, caracterizadas por la presencia de células morfológicamente bien diferenciadas pero afuncionales. Estas patologías, a diferencia de las leucemias agudas, llevan mucho tiempo de evolución generalmente meses o años, y dado que las mismas muchas veces son asintomáticas, muchos de los casos (más del 50%) son diagnosticados accidentalmente durante una evaluación clínica y exámenes de laboratorio de rutina, sobre todo teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes son seniles y llegan a la consulta muchas veces por otras patologías (insuficiencia renal, alteraciones traumatológicas, insuficiencia cardíaca, entre otras) y es el hemograma el que va hacer sospechar de dicha patología.

A diferencia de las leucemias agudas que pueden ser leucémicas, subleucémicas o aleucémicas, las leucemias crónicas son generalmente leucémicas o sea en la mayoría de los pacientes va a haber células tumorales en sangre periférica.⁽⁴⁶⁾

Al igual que en las leucemias agudas, las leucemias crónicas pueden afectar tanto a la serie de granulocitos como a los linfocitos. La **Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)** es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación y acumulación de pequeños linfocitos con apariencia madura, de pequeño tamaño pero inmunoincompetentes. Es la forma de leucemia más frecuente, e incide en animales adultos o seniles. Las manifestaciones clínicas se deben a la acumulación progresiva de linfocitos en médula ósea, ganglios linfáticos y otros tejidos así como a las alteraciones inmunológicas que invariablemente acompañan a este proceso.

La **Leucemia Mieloide Crónica (LMC)** se caracteriza por la proliferación anormal de neutrófilos con morfología aparentemente normal pero afuncionales en médula ósea y en sangre periférica. Es común observar en estos pacientes células más inmaduras que el neutrófilo segmentado (en banda, metamielocitos, mielocitos) pero generalmente no se observan promielocitos ni mieloblastos. Puede aparecer a cualquier edad, pero es más frecuente en edades medias y avanzadas de la vida. El curso evolutivo de la LMC puede presentarse como bifásico, con un primer período prolongado, la fase crónica, en el que la enfermedad resulta fácil de controlar, y una fase aguda o crisis blástica, que se comporta como una leucemia aguda resistente.

Características clínicas:

Como en las formas agudas, la sintomatología de perros con LLC o LMC es vaga e inespecífica; aproximadamente la mitad de los perros con leucemia crónica presentan una historia de signos crónicos (meses) poco evidentes. Muchos casos se diagnostican de forma accidental durante una exploración física o analítica realizada por otros motivos (perros asintomáticos).

En Medicina Humana, al igual que en Medicina Veterinaria, el diagnóstico se realiza en forma casual. La exploración física puede ser completamente normal, aunque pueden hallarse datos patológicos, incluso en pacientes asintomáticos, como adenopatías, esplenomegalia, hepatomegalia; y en ocasiones los principales signos pueden asociarse con infecciones bacterianas o víricas.⁽¹⁾

Los signos clínicos de perros con LLC incluyen letargia, anorexia, vómitos, ligero aumento de tamaño de los ganglios, diarrea y pérdida de peso. Los hallazgos de la exploración física en perros con LLC incluyen linfadenopatía ligera generalizada, esplenomegalia, hepatomegalia, palidez de mucosas y pirexia.⁽⁴⁵⁾

Un hecho terminal que se produce en perros con LLC es el desarrollo de un linfoma de células grandes, denominado **síndrome de Ritche**; en Medicina Humana este síndrome también incluye leucemia prolinfocítica, leucemia aguda y linfoma Hodking.⁽⁷⁾ En humanos, el síndrome de Ritche surge de la transformación del propio clon leucémico; este síndrome puede asentar en órganos extraganglionares, como el tubo digestivo o el pulmón.⁽¹⁾ En perros se caracteriza por una linfadenopatía generalizada y hepatoesplenomegalia masiva. Una vez que se desarrolla el linfoma multicéntrico, es difícil conseguir remisiones prolongadas con quimioterapia y los tiempos de supervivencias son cortos.⁽⁷⁾

La LMC, en Medicina Humana, presenta tres fases con pronóstico y respuesta diferente.^(5,11,19,26,27) La **fase crónica** presenta leucocitosis, menos del 2% de blastos en sangre periférica y médula ósea y disminución de precursores. El 80-85% de los pacientes son diagnosticados en esta fase la cual es asintomática en el 40% de los casos. La **fase acelerada** presenta leucocitosis, un 10-19% de blastos en sangre periférica y médula ósea; anemia y trombocitopenia importante y nuevas alteraciones citogenéticas y moleculares. Hay un deterioro progresivo del estado general. La **fase blástica o crisis blástica** es la agudización, con un 20% o más de blastos en sangre periférica y médula ósea con signos de leucemia aguda.^(5,11,19,26,44)

En Medicina Veterinaria también se reconocen tres fases. La mayoría de los pacientes se presentan en fase crónica y acelerada, siendo la fase crónica la de mayores

posibilidades terapéuticas y supervivencias con mejor calidad de vida.^(22,32,33,36,37,38,41)
Los signos clínicos son inespecíficos e incluyen decaimiento, pérdida de peso, disminución del apetito, palidez en membranas mucosas e hipertermia y signos específicos en relación al órgano u órganos afectados, como signos neurológicos, disfunción hepática y claudicación intermitente.^(22,32,33,36,37,38,41)

Características hematológicas

El hemograma es el método complementario que va a permitir sospechar de una leucemia crónica. Las LLC suelen ser típicamente leucémicas, con recuentos leucocitarios elevados a expensas de un importante incremento del número de linfocitos pequeños, aparentemente normales pero afuncionales.

En Medicina Humana se ha determinado que la mayoría de las LLC corresponden a linfocitos tipo B con un fenotipo característico.⁽¹⁾ La LLC de células B en caninos al igual que en humanos, es una enfermedad primaria de médula ósea. Tanto en las personas, como en los perros la LLC de células B normalmente se caracteriza por una significativa proliferación de pequeños linfocitos maduros en médula ósea. En contraste, la LLC de células T del tipo de linfocitos granulares grandes (LGL) no parece ser una enfermedad primaria de médula ósea sino más bien una enfermedad esplénica primaria.^(30,45) En las personas, la LLC de células B representa más del 95% de los casos de LLC; a diferencia de lo que ocurre en caninos, donde la LLC de células T parece ser mucho más común que la de células B ^(39; 45)

Otros hallazgos hematológicos pueden ser anemia arregenerativa normocítica normocrómica y el recuento de plaquetas suele ser normal o algo disminuido.⁽⁴¹⁾

El estudio citológico de aspirados de médula ósea en perros con LLC revela la presencia de muchos linfocitos morfológicamente normales (valor de referencia de linfocitos en médula ósea de caninos es menor a 10%).

Las gammopatías monoclonales constituyen un síndrome paraneoplásico que se presenta en casi dos tercios de los pacientes. El componente monoclonal por lo general es IgM pero también se han comunicado componentes IgA e IgG. Esta gammapatía puede inducir hiperviscosidad sanguínea. A veces los caninos con LLC tienen hemopatías inmunomediadas paraneoplásicas tales como anemia hemolítica, trombocitopenia, neutropenia, hipercalcemia.⁽⁴¹⁾ Es importante destacar la hipercalcemia, en la cual, las células linfoides neoplásicas pueden producir factores humorales/citosinas aparte de la proteína relacionada con la parathormona, (por ejemplo, interleucina 1, factor de necrosis tumoral y factores de crecimiento de

transformación), que estimulan la reabsorción osteoclástica del hueso y provocan una hipercalcemia maligna. La hipercalcemia tiene efectos sistémicos serios, al reducir la conducción neuromuscular y deprimir la excitabilidad de las membranas celulares. La hipercalcemia también tiene un efecto directo sobre los túbulos renales, inicialmente a través de la inhibición de la hormona antidiurética, causando incapacidad de concentrar la orina. El calcio también puede causar daño directo a los túbulos renales.⁽⁹⁾

Las características hematológicas de la LMC en perros, incluyen leucocitosis a expensas de una neutrofilia con un marcado desvío hacia la izquierda. El desvío a la izquierda se refiere a la aparición en sangre periférica de células de la serie del neutrófilo más inmaduras que el neutrófilo segmentado. Puede observarse una leve anemia arregenerativa normocítica normocrómica y el recuento de plaquetas suele ser normal o algo disminuido.⁽⁴⁶⁾

Este cuadro hematológico no solo se presenta en LMC, sino también puede aparecer en procesos infecciosos con una **“reacción leucemoide”**, en esta reacción la médula ósea no registra si el proceso está controlado y sigue mandando a sangre células de la serie del neutrófilo pero más inmaduras ya que no tiene tiempo para generar neutrófilos segmentados por la excesiva demanda. Por lo tanto, el desafío es diferenciar si el cuadro sanguíneo corresponde a una reacción leucemoide o a una LMC.⁽⁴¹⁾

Diagnóstico

La presencia de linfocitosis absoluta es el principal criterio diagnóstico de LLC en perros. Aunque la lista de diagnósticos diferenciales de perros con linfocitosis ligera (7.000-20000/ μ l) incluye otras enfermedades (ehrlichiosis, babesiosis, leishmaniosis, enfermedad de Chagas, enfermedad de Addison), la linfocitosis marcada (> 20.000/ μ l) es prácticamente patognomónica de LLC.⁽⁴¹⁾ Las alteraciones físicas y hematológicas descritas anteriormente (ligera linfadenopatía, esplenomegalia, gammapatía monoclonal, anemia) apoyan el diagnóstico de LLC en perros con linfocitosis, aunque hay que tener en cuenta que también pueden estar presentes en perros con ehrlichiosis crónica.⁽⁷⁾ La LLC como cualquier otro tipo de leucemia requiere para terminar de confirmar el diagnóstico una evaluación de la médula ósea por medio de la citología medular. En condiciones normales, el porcentaje de linfocitos que se pueden encontrar en médula ósea es en caninos hasta un 10% de los elementos celulares de médula. Por lo tanto, si al hacer la citología medular se encuentran porcentajes

superiores a los esperados normalmente, sumado a la linfocitosis de sangre periférica se confirma el diagnóstico de LLC.⁽⁴⁶⁾

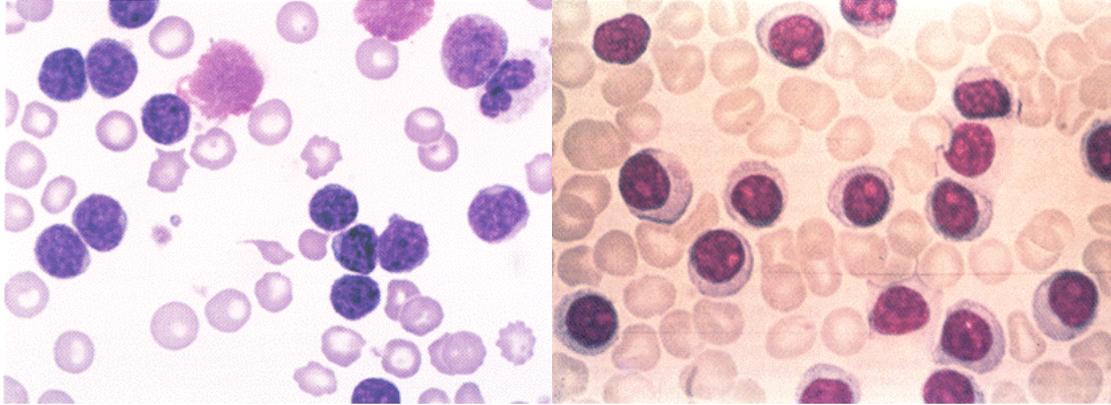


Foto 6. Leucemia Linfocítica Crónica

El diagnóstico de LMC es más complicado, que el de la LLC, sobre todo porque este síndrome está mal definido en perros. En Medicina Humana para el diagnóstico es fundamental la historia clínica y un completo examen clínico y hematológico que incluyen punción y biopsia medular.^(5,11,19,26,27) Hay disminución de la actividad de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria (FAL). Los estudios citogenéticos ponen en evidencia al cromosoma Filadelfia y las técnicas de biología molecular identifican el gen ABL/BCR. Los estudios por imágenes permiten hacer una valoración general del estado del paciente.^(5,11,19,26,27) En Medicina Veterinaria el diagnóstico se basa en la historia clínica del paciente; en el examen objetivo general y en las alteraciones hematológicas; donde se destaca la leucocitosis la cual debe diferenciarse de una reacción leucemoide que acompaña a importantes procesos infecciosos.^(32,33,36,37,38,41) En esta entidad se reconoce un patrón madurativo ordenado, con signos de toxicidad celular y con respuesta a la terapéutica antibiótica implementada. En la LMC en cambio, se observa un patrón madurativo desordenado sin presencia de cambios celulares tóxicos salvo en aquellos pacientes que presenten conjuntamente cuadros infecciosos debido a la mielosupresión, casos en los cuales se observará una mejoría transitoria con la terapia antibiótica.^(32,33,36,37,38,41) La punción medular refleja hiperplasia mieloide, disminución de precursores eritroides y plaquetarios y la relación mieloide/eritroide aumentada, cuadro similar al que se observa en medulogramas de pacientes con reacción leucemoide.^(17,22,24) Por lo tanto el diagnóstico definitivo se

realiza a través de la tinción citoquímica de **FAL “Fosfatasa Alcalina Leucocitaria”**, en sangre periférica y médula ósea. En la especie canina es positiva en los casos de LMC a diferencia de lo que ocurre en humanos en donde se negativiza en los pacientes leucémicos.^(10,15,22,41)

Se ha demostrado que en los neutrófilos no neoplásicos del hombre hay actividad de fosfatasa alcalina, pero no, en los del perro, gato y ratón. La actividad de la fosfatasa alcalina del canino, disminuye con la maduración celular, de modo que está ausente en la mayoría de los metamielocitos, y en todas las formas en banda; independientemente del recuento total de leucocitos y de la desviación a la izquierda en sangre periférica. Sin embargo, en los frotis sanguíneos y de médula ósea de pacientes con LMC, teñidos con FAL se probó la presencia de la enzima en algunos neutrófilos, tanto maduros como inmaduros. Estos hallazgos se interpretan como indicadores de la utilidad de las tinciones de FAL en el diagnóstico diferencial de los casos dudosos de LMC y reacción leucemoide.⁽²⁴⁾

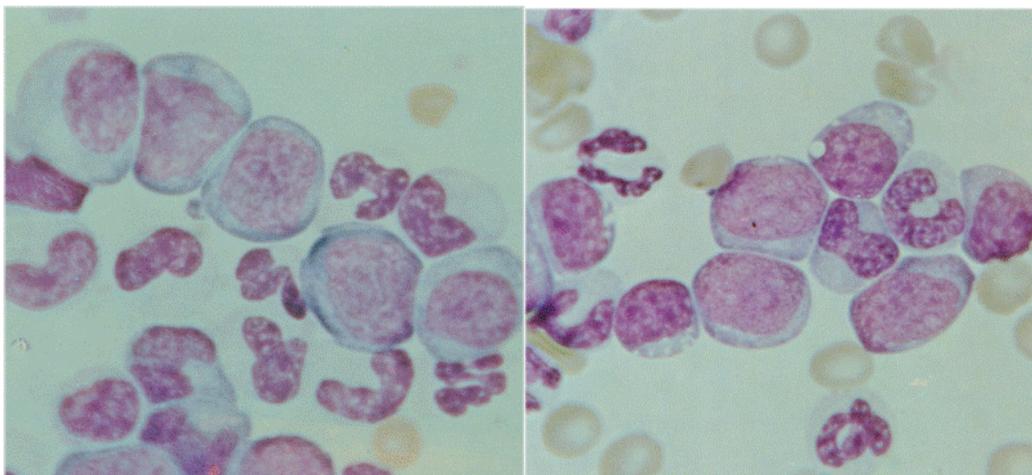


Foto 7. Leucemia Mieloide Crónica



Foto 7. Tinción de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria Positiva en sangre periférica y en médula ósea

Existen técnicas de diagnóstico más avanzadas para aquellos pacientes en los que no puede establecerse un diagnóstico de leucemia definitivo. Por ejemplo, en pacientes con linfocitosis con diagnóstico presuntivo de LLC, puede realizarse una PCR de clonalidad que muestra si las células son de origen clonal. Las leucemias son consideradas patologías clonales u oligoclonales, por lo tanto, la demostración de una población de células clonales en sangre o en médula ósea es una prueba para el diagnóstico de leucemia. La clonalidad de la población de células linfoides puede ser determinada usando PCR basado en el análisis de inmunoglobulinas y en un reordenamiento genético del receptor de células T.⁽⁴⁾ Un test diagnóstico similar no es útil para demostrar la clonalidad de las leucemias mieloides. Un test de clonalidad negativo de inmunoglobulinas o del gen del receptor de células T, puede hacer sospechar de una leucemia mieloide, pero no es diagnóstico.⁽⁴¹⁾

La citometria de flujo usada en conjunto con un panel de marcadores celulares podría ser utilizada para identificar y caracterizar poblaciones de células malignas en sangre y en médula ósea.^(14,39,43) El inmunofenotipo de células leucémicas provee información respecto de un linaje celular presuntivo, un componente crítico de la clasificación correcta. Los anticuerpos disponibles para el inmunofenotipo de las células hematopoyéticas en perros son más limitados que en humanos. Desafortunadamente, sigue habiendo una escasez de marcadores de linaje mieloide validados de manera que la subclasificación de las leucemias mieloides es difícil.⁽⁴¹⁾

Hasta el momento este tipo de técnicas complejas no están disponibles en nuestro país.

Clasificación:

En la mayoría de los cánceres, la clasificación por etapas (estadios) es un proceso para determinar el grado de propagación de un cáncer. A menudo, las etapas son útiles ya que pueden ayudar a guiar el tratamiento y a determinar el pronóstico de un paciente. Generalmente está en toda la médula ósea, y en muchos casos cuando se detecta, ya se ha propagado a otros órganos como el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos.

Clasificación por etapas de la Leucemia Linfocítica Crónica

Un sistema de estadificación es una manera estandarizada que los especialistas en el tratamiento del cáncer utilizan para resumir la información sobre cuánto se ha

propagado un cáncer. Existen dos sistemas diferentes para clasificar por etapas la LLC:

- Sistema de Rai: se usa con más frecuencia en Estados Unidos.
- Sistema Binet: se usa más ampliamente en Europa.

*** Sistema de clasificación de Rai**

Este sistema divide la LLC en cinco etapas:

Estadio 0: linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm³) sin linfadenopatía, hepatomegalia, anemia o trombocitopenia.

Estadio I: linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm³) con linfadenopatía, sin hepatomegalia, anemia o trombocitopenia.

Estadio II: linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm³) con hepatomegalia o esplenomegalia con o sin linfadenopatía.

Estadio III: linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm³) con anemia (hemoglobina <11g/dl), con o sin linfadenopatía, hepatomegalia o esplenomegalia.

Estadio IV: linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm³) con trombocitopenia (<100000 por mm³), con o sin linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia o anemia.

Estadio	Características
0	linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm ³) sin linfadenopatía, hepatomegalia, anemia o trombocitopenia.
I	linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm ³) con linfadenopatía, sin hepatomegalia, anemia o trombocitopenia.
II	linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm ³) con hepatomegalia o esplenomegalia con o sin linfadenopatía.
III	linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm ³) con anemia (hemoglobina <11g/dl), con o sin linfadenopatía, hepatomegalia o esplenomegalia.

IV	linfocitosis absoluta (más de 15000 por mm ³) con trombocitopenia (<100000 por mm ³), con o sin linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia o anemia.
-----------	---

***Sistema de clasificación de Binet**

En el sistema de clasificación Binet, la LLC se clasifica por el número de grupos de tejido linfático afectados (ganglios linfáticos preescapulares, ganglios linfáticos inguinales, ganglios linfáticos axilares, bazo e hígado) y si el paciente tiene o no anemia o trombocitopenia.

Estadio Clínico A: sin anemia o trombocitopenia y menos de tres áreas linfoides involucradas. (estadios 0, I y II de Rai)

Estadio Clínico B: sin anemia o trombocitopenia con tres o más áreas linfoides involucradas. (estadios I y II de Rai)

Estadio Clínico C: anemia y/o trombocitopenia y menos de tres áreas linfoides involucradas. (estadios III y IV de Rai)

Las áreas linfoides incluyen: la cervical, axilar, inguinal y la región esplénica.

Estadio Clínico	Particularidades
A	sin anemia o trombocitopenia y menos de tres áreas linfoides involucradas.
B	sin anemia o trombocitopenia con tres o más áreas linfoides involucradas.
C	anemia y/o trombocitopenia y menos de tres áreas linfoides involucradas.

Comparación entre ambas clasificaciones:

Clasificación de Binet:	Clasificación de Rai
Estadio Clínico	
A	0, I y II
B	I y II
C	II y IV

En Medicina Humana, en la actualidad la LMC se clasifica de acuerdo a los estudios citogenéticos y de biología molecular. En Medicina Veterinaria aun no se cuenta con este tipo de técnicas para el diagnóstico y clasificación de la enfermedad.

Tratamiento:

La LLC es uno de los tumores hematopoyéticos de mejor pronóstico, con largos períodos de sobrevida, muchos de los pacientes mueren de otra patología y no de la LLC.

Si bien los pacientes con LLC son muy sensibles al tratamiento para los casos asintomáticos, se debe considerar un período de observación durante el cual se realizan evaluaciones hematológicas seriadas cada 3 meses.⁽³⁴⁾

La presencia o emergencia de signos clínicos debería motivar la implementación de quimioterapia. Está indicado el tratamiento con un alquilante (con o sin corticoides) si el perro es sintomático, tiene organomegalia o presenta alteraciones hematológicas asociadas. Si no hay síndromes paraneoplásicos (hemólisis o trombocitopenia inmunomediada, gammapatía monoclonal), se recomienda el empleo de Clorambucilo como fármaco único 2mg/m² por vía oral cada 24 horas por 1 semanas, y luego cada 48 hs, en caso contrario, es útil la adición de corticoides como Metilprednisolona 40 mg/m² cada 24 horas vía oral durante 1 semana, 20 mg/m² cada 48 horas posteriormente.⁽⁷⁾

Pueden emplearse una terapéutica con protocolos de quimioterapia combinadas, en casos de una gran compromiso medular u orgánico, que determine un mal estado del paciente o cuando se produzca agudización del proceso, o sea cuando empiecen a aparecer blastos en sangre periférica y/o médula ósea, en estos casos la terapia es

similar a la LLA, se emplea L-Asparaginasa, Vincristina, Ciclofosfamida y Metilprednisolona; este tratamiento sólo se realiza hasta normalizar al paciente o hasta que desaparezcan los blastos y luego se sigue sólo con controles sanguíneos y medulares.⁽⁴⁶⁾

En la LMC el objetivo inmediato del tratamiento es reducir la masa leucocitaria mientras que el objetivo final es alcanzar la remisión citogenética. La quimioterapia convencional con agentes mielosupresores como la Hidroxiurea y el Busulfán es eficaz para inducir respuesta hematológica pero muy limitada para alcanzar la respuesta citogenética. La Hidroxiurea y el Busulfán son efectivas para disminuir el número de células mieloides circulantes y para suprimir la producción de las mismas en la médula ósea. Se usan bajo un estricto control médico debido a la acción mielosupresora prolongada que presentan, pudiéndose llegar hasta incluso la aplasia medular. El inconveniente es que estas drogas no previenen contra una posible “**crisis blástica**” (o sea una agudización de la leucemia), la cual lleva indefectiblemente a la muerte del paciente. Debido a este posible desenlace, es que en general se dice que el pronóstico es reservado. Durante la fase blástica la elección terapéutica es la poliquimioterapia. La incorporación del Interferon Alfa induce respuesta hematológica y citogénica en el 40-50% y prolonga la mediana de supervivencia comparada con la obtenida con Hidroxiurea o Busulfán pero estos agentes no son selectivos para el clon leucémico.

En Medicina Humana el único tratamiento que ha logrado la curación de una proporción importante de enfermos es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos pero no todos reúnen los requisitos para tal tratamiento siendo accesible en menos del 20% de los pacientes, razón por la que se deben emplear alternativas terapéuticas farmacológicas. El conocimiento de los aspectos moleculares involucrados en la patogenia de la LMC condujo al desarrollo de drogas selectivamente dirigidas a un blanco específico presente en las células neoplásicas como lo son los inhibidores de la proteína tirosin-quinasa por bloqueo de las señales de transducción. El Mesilato de Imatinib es un potente inhibidor de un gran grupo de proteínas con actividad quinasa. Esta estrategia terapéutica ha revolucionado el tratamiento de la LMC, ya que además de incidir sobre el defecto específico causante del desorden mieloproliferativo, no altera de manera significativa el funcionamiento de las células normales, reduciendo los efectos asociados y mejorando la expectativa y calidad de vida de los pacientes. En Medicina Veterinaria ya se cuenta con este tipo de drogas aunque las mismas no se comercializan todavía en el país.⁽⁴⁶⁾

DESARROLLO DEL TRABAJO

Objetivos:

El objetivo de este trabajo final fue realizar un estudio retrospectivo y prospectivo de la aproximación diagnóstica de leucemias mieloides y linfoides en pacientes caninos que asistieron y asisten al Hospital de la FCV UBA o derivados para su diagnóstico y/o atención por colegas que se desempeñan en el ámbito privado.

Objetivos particulares:

*Contribuir al diagnóstico hematológico de los distintos tipos de leucemias caninas desde una perspectiva fundada en la experiencia del laboratorio clínico veterinario.

*Describir los principales hallazgos clínicos, hematológicos asociados con la leucemia mieloide y linfoide canina en el área de estudio.

*Realizar un algoritmo que contribuya a la orientación del médico clínico al diagnóstico de las leucemias, en relación a los hallazgos clínicos del paciente.

Hipótesis de Partida

La hipótesis de partida, se basó en que las leucemias en caninos son enfermedades de baja incidencia, que están subdiagnosticadas, y de las cuales no hay información epidemiológica específica.

Materiales y Métodos

El trabajo se realizó recopilando datos a través de la revisión de las historias clínicas de 24 caninos con diagnóstico de leucemias, pacientes del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UBA o derivados para su diagnóstico y/o atención por colegas que se desempeñan en el ámbito privado, en el período comprendido entre el año 2011 y 2014.

Los pacientes fueron sometidos al siguiente esquema de evaluación:

1° -Examen físico general y particular

2° -Métodos complementarios rutinarios de laboratorio:

- a) Estudios hematológicos: determinación de parámetros rutinarios: Hematocrito, recuento de glóbulos rojos, recuento de glóbulos blancos, hemoglobina, lectura de frotis (fórmula leucocitaria relativa y absoluta). Método Manual
- b) Estudios de bioquímica sanguínea:
 - ◆ Métodos colorimétricos: urea, creatinina, proteínas totales, albúminas, calcio y fósforo
 - ◆ Métodos cinéticos: AST, ALT, FAS
- c) Pruebas de hemostasia:
 - ◆ Recuento plaquetario relativo, realizado a través del frotis
 - ◆ Tiempo de Tromboplastina parcial activado
 - ◆ Tiempo de Protrombina
- d) Estudios citológicos: punción y lectura de médula ósea.
- e) Punción y lectura de ganglios

Las muestras de médula ósea fueron tomadas de la región del esternón (tercio anterior o medio), previa infiltración de la zona con lidocaína, utilizando agujas 25/12, 40/12 ó 50/12 (según el tamaño del paciente) y jeringas de 5ml. Las muestras de linfonodos se obtuvieron a través de una punción – aspiración con aguja fina.

3º -Métodos complementarios especiales:

Estudios con técnicas histoquímicas:

- ◆ Tinción con coloración tipo Romanowsky (Giemsa o Tinción 15)
- ◆ Tinción citoquímica de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria por el método de Kaplow ^(3,38,39)
- ◆ Tinción citoquímica de Mieloperoxidasa por el método de Washburn ⁽³⁾

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de la situación con medidas de posición y con el estudio de las distribuciones.⁽⁴⁰⁾

Resultados:

Los resultados fueron los siguientes: 24 pacientes fueron diagnosticados con leucemia: 10 (42%) con LLC y 14 (58%) con LMC. Durante el período en estudio no se presentaron pacientes con leucemias agudas.

En relación al sexo; de los 10 pacientes con LLC 4 (40%) fueron machos; de los cuales 1 solo estaba castrado y 6 (60%) hembras; 2 castradas. En cuanto a los 14 pacientes con LMC, 8 (57%) fueron machos enteros y 6 (43%) hembras, 5 castradas. Para estudiar la asociación entre el sexo y la presentación de leucemias linfoides o mieloides, se realizó una prueba Chi-cuadrado de independencia (GraphPad InStat). A partir de este análisis se concluyó que la probabilidad de presentar LL o LM no está asociada al sexo ($p=1$)

	Machos	Hembras	Total
LLC	4 (17%)	6 (25%)	10 (42%)
LMC	8 (36%)	6 (27%)	14 (64%)
Total	12 (50%)	12 (50%)	24 (100%)

Con respecto a la edad, la LLC se presentó en pacientes entre los 6 y los 14 años con una mediana de 10 años. En cuanto a la LMC el grupo etario de pacientes enfermos estuvo entre los 2 y los 12 años con una mediana de 8 años

En cuanto a la distribución racial, los pacientes con LLC fueron 6 (60%) mestizos de talla media (entre 12 y 20 kilos de peso), y 4 (40%) de distintas razas (Siberian Huski, Airdale Terrier, Beagle y Doberman). Para la LMC, la distribución racial fue: 5 (36%) mestizos de talla media (entre 8 y 15 kilos de peso), 4 (28%) caniches, 5 (36%) de distintas razas (Cocker, Rottweiler, Beagle, Boyero de Berna, Shih-tzu).

Clínicamente, los pacientes con LLC o LMC, al momento de la consulta se presentaron con signos clínicos inespecíficos: el 8% presento decaimiento, el 4% apetito disminuido, un 21% mucosas pálidas, y un 50% presentaban una historia de antibioticoterapia de larga data y sin mejoría clínica, además se presentaron pacientes con procesos infecciosos que involucraban dermatitis, otitis, enfermedades periodontales, piómetra, gastroenteritis y cistitis. Algunos pacientes se presentaron con otros tipos de procesos neoplásicos (7%) como tumores de mamas, donde la leucemia fue un hallazgo casual.

De los 10 caninos con **LLC**, 7(70%) de estos pacientes estaban en fase de agudización (presencia de blastos en sangre periférica y/o médula ósea).

Los valores hematológicos hallados en los pacientes con LLC fueron: valor medio de hematocrito 32% con un rango entre 13% y 43% (Normal 37-55%), también se observó una leucocitosis persistente en un rango entre 38000 y 147200 leucocitos/mm³, con una media de 51090 leucocitos/mm³ (Normal 6000-17000 leucocitos/mm³) En los extendidos de sangre periférica se observó en todos los pacientes una marcada linfocitosis con una media de 32698 linfocitos/mm³ (Normal: 1000-4800 linfocitos/mm³);.

Recuento plaquetario: 5 (50%) pacientes presentaron una trombocitopenia relativa (3 plaquetas/campo, siendo el valor de referencia mínimo 6 plaquetas/campo), pero que no manifestaron signos clínicos de sangrado.

Pruebas de hemostasia: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado y Tiempo de Protrombina se encontraron dentro del rango considerado normal en la totalidad de los pacientes.

Pruebas bioquímicas: los valores de media obtenidos fueron: Urea 27 mg/dl (Normal 15-50 mg/dl); Creatinina 1 mg/dl (Normal hasta 1,5 mg/dl); GPT 55 UI/L (Normal hasta

80 UI/L); GOT 42 UI/L (Normal hasta 60 UI/L); FAS 373 UI/L (hasta 250 UI/L); Proteínas Totales 6,8 g/dl (Normal 5,7-7,5); Albúminas 2,4 g/dl (Normal 2,4-4,6); Calcio 10,67 mg/dl (Normal: 8-12); Fósforo 4 mg/dl (Normal: 2,1-5,6).

Citología medular se observó un infiltrado de linfocitos superior al 10%, de morfología en apariencia normal, en todos los pacientes. En 5 (50%) de los pacientes en fase de agudización se observaron formas blásticas con un valor de media del 12% (rango entre 2% y 40%), tanto en médula ósea como en sangre periférica. En aquellos pacientes donde se observaron blastos se realizó la tinción de Mieloperoxidasa para confirmar el linaje de los mismos.

Punción de ganglios: No se efectuó punción ganglionar, ya que ningún paciente presentó linfadenopatía

Los 14 pacientes con **LMC** presentaron un curso crónico de la enfermedad.

Los valores hematológicos hallados en los pacientes con LMC fueron: El 93% de los pacientes presentó una anemia moderada normocítica, normocrómica arregenerativa con un valor medio de hematocrito 30% con un rango entre 22 y 41.% (Normal 37-55%), también se observó una leucocitosis persistente en un rango entre 58000 y 121000 leucocitos/mm³, con una media de 38350 leucocitos/mm³ (Normal: hasta 17000 leucocitos/mm³), neutrofilia media de 31830 neutrófilos/mm³ (Normal: hasta 12000 neutrófilos/mm³). De los 14 pacientes con LMC, 10 (71%) presentaron desvío a la izquierda regenerativo

Recuento plaquetario: Sólo 2 pacientes presentaron trombocitopenia relativa con un recuento plaquetario medio de 4 plaquetas/campo (Normal: 6 plaquetas/campo), sin manifestación clínica de sangrado.

Pruebas de hemostasia: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado y Tiempo de Protrombina se encontraron dentro del rango considerado normal en la totalidad de los pacientes.

Pruebas bioquímicas: los valores de media obtenidos fueron: Urea 66 mg/dl (Normal 15-50 mg/dl); Creatinina 1 mg/dl (Normal hasta 1,5 mg/dl); GPT 93 UI/L (Normal hasta 80 UI/L); GOT 57 UI/L (Normal hasta 60 UI/L); FAS 620 UI/L (hasta 250 UI/L); Proteínas Totales 6,83 g/dl (Normal 5,7-7,5); Albúminas 2 g/dl (Normal 2,4-4,6).

Citología medular: el medulograma reveló distintos grados de hiperplasia mieloide a expensas en algunos casos de un tipo celular (por ejemplo mielocito o promielocito), con disminución de precursores eritroides y plaquetarios y una relación mieloide/eritroide aumentada. El diagnóstico se basó en la positividad de la reacción de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria en extendidos de sangre periférica y médula ósea

Punción de ganglios: No se efectuó punción ganglionar, ya que ningún paciente presento linfadenopatía

Discusión:

Según la bibliografía consultada en Medicina Humana la LMC tiene una incidencia que va de uno a dos casos cada 100.000 personas por año representando el 15 al 20 % de todas las leucemias ^(1,9,10,17,26). En cuanto a las LLC, en los países occidentales su incidencia es de alrededor de 3 casos nuevos por 100 000 habitantes y por año. En Europa y en Estados Unidos de América representa el 0,8 % de todas las neoplasias y cerca del 30 % de la totalidad de las leucemias. Su incidencia tiene una gran variación de acuerdo con el área geográfica.⁽¹⁾ En Medicina Veterinaria las leucemias en caninos son patologías poco frecuentes que representan el 10% de las neoplasias hematopoyéticas.^(11,22,27,32,33,36,38)

No se ha podido determinar la incidencia que esta enfermedad presenta en la población canina en un área geográfica determinada, debido a que el Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias recibe gran cantidad de pacientes los cuales son derivados en su mayoría por colegas que trabajan en el ámbito privado dentro y fuera de la Ciudad de Buenos Aires. A su vez el hecho de recibir pacientes con derivación no permite poder realizar una tasa de prevalencia de la enfermedad.

Con respecto a las causas que predisponen a la presentación de las leucemias, la exposición a radiaciones o a ciertos agentes químicos, como así también las alteraciones genéticas podrían ser responsables tanto en Medicina Humana como en Medicina Veterinaria de esta patología. ^(1,9,10,11,17,22,26,27,32,33,36,38). En este estudio se ha observado que muchos pacientes provienen de familias en donde un integrante incluso sus propios dueños padecen o han padecido alguna enfermedad neoplásica. Podría existir algún factor ambiental que aumente la predisposición pero estos son supuestos que deberán ser objeto de mayores y más profundos estudios.

En Medicina Humana la incidencia de LMC, es ligeramente mayor en la población masculina que en la femenina, se da en todas las razas y puede presentarse a cualquier edad aunque el mayor número de casos aparece en pacientes de 40 a 60 años y no se da con frecuencia en niños.^(1,9,10,17,26)

La bibliografía consultada en Medicina Veterinaria indica que no se ha observado hasta el momento una predisposición mayor en un sexo o raza en particular y que se presenta entre los 5 a 8 años.^(11,22,27,32,33,36,38)

En este trabajo, se ha observado pacientes con LMC, con una ligera predisposición en machos al igual que en Medicina Humana y a diferencia de los autores consultados de Medicina Veterinaria. En cuanto a la edad de los caninos afectados, el grupo etario promedio es de 8 años al igual que en otras publicaciones. En relación a las razas afectadas también se encontraron diferencias en relación a la bibliografía consultada con una mayor predisposición en pacientes mestizos. Estos datos deben ser tomados cuidadosamente ya que es posible que la mayor prevalencia en una raza en particular presente correlación con la popularidad de esa raza entre la población normal.

En cuanto a los pacientes que padecen LLC, en Medicina Humana existe un ligero predominio del sexo masculino (1,5/1). Es el tipo de leucemia más frecuente en los individuos caucásicos y resulta raro en los asiáticos. Se presenta generalmente en personas de edad avanzada y es la más común después de los 50 años. Se ha señalado que sólo el 10 % de los enfermos tiene menos de esa edad en el momento del diagnóstico^(3;31). Su incidencia depende de la edad, pues aumenta de 5,2 a 30,4 casos por 100 000 personas por encima de las edades de 50 y 80 años, respectivamente⁽¹²⁾

En Medicina Veterinaria, según la bibliografía consultada, la LLC aparece en perros de avanzada a mediana edad. Este dato coincide con lo observado, donde la edad media de los animales enfermos fue de 10 años. La relación de machos a hembras es 2:1, pero no se ha descrito una predisposición racial⁽⁹⁾. En los resultados obtenidos relacionados al sexo, hubo una mayor predisposición en hembras, siendo esta una diferencia con la bibliografía consultada. Con respecto a las razas afectadas, se encontró una mayor predisposición en pacientes mestizos, sin embargo, al igual que ocurre con las LMC, estos resultados pueden deberse a una mayor popularidad de la raza.

Por otro lado las diferencias encontradas, tanto para los pacientes con LMC como los pacientes con LLC, deberán ser sujetas a estudios posteriores que involucren nuevas series de pacientes que ayuden a corroborar o refutar dichas diferencias.

En relación al diagnóstico en Medicina Humana la historia clínica del paciente, el examen hematológico completo, los estudios a nivel medular así como las tinciones citoquímicas son importantes, pero los estudios citogenéticos y las técnicas de biología molecular son fundamentales en el diagnóstico de los diferentes tipos de leucemias.^(1,9,10,17,26)

Ante la imposibilidad por el momento de investigaciones citogenéticas y de estudios de biología molecular, la tinción citoquímica de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria resultó fundamental para el diagnóstico de LMC junto a la historia clínica de los pacientes, sus estudios hematológicos y medulares. Para el diagnóstico de LLC fue importante, al igual que para LMC, la historia clínica, los datos de laboratorio, la citología medular y la tinción citoquímica de Mieloperoxidasa.

Dentro de los análisis de laboratorio, las pruebas bioquímicas fueron importantes para determinar el funcionamiento de órganos que podrían haber estado infiltrados de células neoplásicas y haber generado complicaciones metabólicas. Se evaluó la concentración de urea y creatinina para la función renal, enzimas hepáticas, proteínas totales y albúminas. Tanto para los pacientes con LMC y LLC no se detectaron valores con diferencias significativas con respecto a los valores considerados normales. Un dato relevante es la medición de calcio por los efectos sistémicos serios que tiene una alteración de este. Según la bibliografía consultada, la hipercalcemia se produce en el 10-20% de los casos de leucemia mieloide y linfoide⁽⁹⁾, en este estudio no se presentó ningún paciente con valores de calcemia por encima de lo normal.

Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico y pronóstico de las leucemias son indispensables para el clínico, sobre todo por el gran avance en el estudio de la biología de esta enfermedad. Existen técnicas de diagnósticos con alta sensibilidad como son los estudios de citomorfología, inmunofenotipos, citogenética y las técnicas de biología molecular que pueden ofrecer un diagnóstico certero, con perspectivas a dar un pronóstico de la enfermedad y favorecer la terapéutica; en un futuro serán herramientas que podrán estar disponibles para su empleo en Medicina Veterinaria.

Conclusiones

De acuerdo a los casos estudiados y los resultados obtenidos en este trabajo se sugieren los siguientes pasos para el diagnóstico de LLC, LMC y leucemias agudas.

El algoritmo indispensable para realizar el diagnóstico de LLC

Historia Clínica:

Los pacientes suelen llegar asintomáticos a la consulta y en general se descubre la patología a partir de exámenes de rutina o de control por alguna otra enfermedad. Sólo cuando la infiltración medular, sanguínea u orgánica es importante puede manifestar alguna signología (letargia, anorexia parcial, diarrea, palidez de las mucosas)

Es importante considerar en la anamnesis y ante la posible sospecha de esta enfermedad si existe o no en el grupo familiar alguna persona que padezca neoplasia.

Estudios hematológicos: Las LLC suelen ser típicamente leucémicas con leucocitosis persistente a expensas de una linfocitosis marcada, con linfocitos pequeños aparentemente normales pero afuncionales. En casos de reagudización de la enfermedad podrían hallarse formas blásticas.

Puede observarse una anemia leve normocítica normocrómica.

Recuento de plaquetas: Trombocitopenia relativa

Bioquímica sanguínea: comprobar la afectación o no de otros órganos.

Citología medular: se observa un recuento de linfocitos superior al 10%, de morfología en apariencia normal o de formas blásticas en caso de agudización de la enfermedad. Se debe realizar la tinción citoquímica de Mieloperoxidasa para determinar el linaje de los blastos.

El algoritmo indispensable para realizar el diagnóstico de LMC

Historia Clínica:

Los pacientes suelen presentarse asintomáticos a la consulta, y en general se los trae por otra patología. Se observa una neutrofilia sin signos de infección en el paciente y la cual no revierte con antibióticos. Sólo en casos excepcionales pueden presentar alguna signología inespecífica.

Estudios hematológicos: Puede observarse una leve anemia arregenerativa normocítica, normocrómica. Generalmente se observa una leucocitosis persistente a expensas de una neutrofilia con desvío a la izquierda regenerativo.

Bioquímica sanguínea: comprobar la afectación o no de otros órganos.

Citología medular: la citología medular revelará una Hiperplasia Mieloide pero para confirmar el diagnóstico de leucemia, debe realizarse la tinción de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria, la cual será positiva en caso de leucemia o negativa en caso de una “reacción leucemoide”

El algoritmo indispensable para realizar el diagnóstico de Leucemia Aguda

Historia Clínica:

Los signos clínicos son generalmente inespecíficos como letargo, decaimiento anorexia, pérdida de peso, fiebre, claudicación intermitente, o signos neurológicos inespecíficos. Es frecuente encontrar hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, palidez de las mucosas, petequias. La mayoría de las leucemias agudas se presentan con signos de enfermedad sistémica.

Estudios hematológicos: En el hemograma puede encontrarse una anemia arregenerativa normocítica normocrómica severa, trombocitopenia severa. En cuanto al recuento leucocitario podrá ser normal, cursar con leucocitosis o con leucopenias.

Bioquímica sanguínea: comprobar la afectación o no de otros órganos.

Citología medular: Cuando se realiza una citología medular y se encuentra que el 30% o más de las células halladas son blastos, se confirma que el paciente padece de una Leucemia Aguda. Nunca se puede asegurar a través de las tinciones de rutina si ese blasto es mieloide o linfoide, dado que es imposible reconocerlo. La única forma de establecer el linaje del mismo es a través de la tinción de Mieloperoxidasa.

Bibliografía

1. Borrasca A; Piñango C; Guerra C: Enciclopedia iberoamericana de Hematología. Vol II. 1era ed. Universidad de Salamanca, España 1992
2. Breen M, Modiano JF: Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans—man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Res.*16:145-154, 2008
3. Brincker H. Population-based age and sex-specific incidence rates in the 4 main types of leukemia. *Scand J Haematol*; 29:241-9,1982
4. Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, et al. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet Pathol*;40:32-41,2003
5. Cervantes Requena F, Castro-Malaspina H: Síndromes mieloproliferativos crónicos. En: Rozman, C (Director). *Medicina Interna*. Farreras-Rozman. 15ª Edición. Madrid: Elsevier, 2:1706-1710,2004
6. Couto CG: clinicopathologic aspects of acute leukemias in the dog. *JAVMA* 186:681-685, 1985
7. Couto CG: Leucemias. *Revista del XXVI Congreso Anual de AMVAC*. Madrid. 147-158. 2009
8. Cowell R; Tyler R; Meinkoth J; DeNicola D: Diagnóstico citológico y hematológico del perro y el gato. 3ra ed. Elsevier, España, 2009
9. Day M; Mackin A; Littlewood J: Manual de hematología y transfusión en pequeños animales. Lexus, España, 2012
10. Facklam NR; Kociba GJ: Cytochemical characterization of leukemic cells from 20 dogs. *Vet Pathol*; 22:363,1995
11. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM: The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*; 3:164-72, 1999
12. Faguet GB. Chronic lymphocytic leukemia: an updated review. *J Clin Oncol*; 12:1974-90,1994
13. Fernandes PJ, Modiano JF Wojcieszyn J, et al: Use of the cell Dyn-3500 to predict leukemic cell lineage in peripheral blood of dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 31:167-182,2002
14. Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, et al. Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol*;121:179-188, 2008
15. Grindem CB: Bone Marrow biopsy and evaluation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 19:699,1989
16. Grindem CB, Steven JB, Brost DR, Johnson DD: Chronic myelogenous leukaemia with meningeal infiltration in a dog. *Compar Haematol Int* 2:170-174, 1983
17. Grindem CB; Stenens JB; Perman V: Cytochemical reactions in cells from leukemia dogs. *Vet Pathol*; 23:103,1986

18. Grindem CB, Stevens JB, Perman V. Morphological classification and clinical and pathological characterization of spontaneous leukemia in 17 dogs. *JAAHA* 21:219-226, 1985
19. Hehlmann R, Berger U, Hochhaus A: Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann Hematol*; 8:487-497, 2005
20. Jain NC, Blue JT, Grindem CB, et al. Proposed criteria for classification of acute myeloid leukemia in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*; 20:63-82, 1991
21. Jain NC, Madewell BR, Weller RE, Geissler MC: Clinical pathological findings and cytochemical characterization of myelomonocytic leukaemia in 5 dogs. *J Comp Pathol* 91:17-31, 1981
22. Jain NC: Schalm's Veterinary Hematology, 4th ed. Philadelphia, Lea and Febiger. 2000:47:724-726.
23. Jain NC: Schalm's Veterinary Hematology, 4th ed. Philadelphia, Lea and Febiger; 47:724-726, 2000
24. Jain NC, Schalm's OW, Carroll EJ: Schalm's Veterinary Hematology, 3th ed. Buenos Aires, Hemisferio Sur; 10:554-556, 1981
25. Juopperi TA, Bienzie D, Bernreuter DC, et al. Prognostic markers for myeloid neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet Pathol*; 48:182-197, 2011
26. Kantarjian H, O'Brien S. The chronic leukemias. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 195, 2007
27. Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am.*; 18:3, 2004
28. Kaplow LS; A histochemical producer for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood* 10:1023; 1955
29. Kaplow LS: Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry; Applications and methods. *Ann New York Acad Sciences*. 155:911, 1968.
30. MacDonough SP, Moore PF, Clinical, hematologic, and immunophenotypic characterization of canine large granular lymphocytosis. *Vet Pathol*; 37:637-646, 2000
31. Montserrat E, López-Kartpovitch. Tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, prolinfocítica y otros síndromes linfoproliferativos. En: Ruiz-Argüelles GJ, San Miguel JF, eds. *Actualización en leucemias*. México, DF: Editorial Médica Panamericana; 107-13, 1996
32. Morrison Wallace B: Cancer in dogs and cats. Baltimore: Williams and Wilkins; 10:105-108, 1998
33. Ogilvie G; Moore A: Managing the Veterinary Cancer Patient. *Veterinary Learning Systems*; 273-274, 1996
34. Ogilvie G; Moore A: Manejo del paciente canino oncológico. 1ª ed. Intermédica, Buenos Aires, 2008

- 35 Rohring KE: Acute myelomonocytic leukemia in a dog. JAVMA 182:137-141, 1983
- 36 Vail DM: Hematopoietic tumors. In Ettinger SJ, Feldman EC (eds): Textbook Of Veterinary Internal Medicine, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders; 507-523,2000
- 37 Vail DM; MacEwen EG: Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. Cancer Invest;18: 781-792,2000:
- 38 Vail DM ; Mc Ewen EG; Young KM: Small Animal Clinical Oncology, 3th ed. Philadelphia, WB Saunders; 28:611-624, 2001
- 39 Vernau W; Moore PF: An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assesmentof clonality by polymerase chain reaction. Vet Inmunol Immunopathol 69:14-164,1999
- 40 Watson P; Petri A: Statistic for Veterinary and Animal Science, 2nd ed. Blackwell Science, London; 243,2000
- 41 Weiss DJ; Wardrop KJ: Schalm's Veterinary Hematology, 6thed. Philadelphia, Lea and Febiger, 2010.
- 42 Weiss DJ: Evaluation of proliferative disorders in canine bone marrow by use of flow cytometric scatter plots and monoclonal antibodies. Vet Pathol 38:512-518,2001
- 43 Wilkerson MJ; Dolce K, Koopman T, et al. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. Vet Immunol Immunopathol; 106:179-196,2005
- 44 Withrow S; Vail D: Withrow&MacEwen's Oncologia Clínica de pequeños animals, 4ed. Multimédica Ediciones Veterinarias, 2009
- 45 Workman HC, Vernau W. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats, the veterinary perspective. Vet Clin N Am Small Anim Pract;33:1379-1399, 2003
- 46 Guía Hematología: Docentes Cátedra Patología Clínica y Enfermedades Médicas, Facultad Ciencias Veterinarias UBA, 2013