

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze Medico-Veterinarie

Ciclo XXVII

**Linfoma renale del gatto:
rilievi anatomopatologici, immunofenotipizzazione delle
popolazioni linfocitarie ed espressione tissutale
dell'antigene virale FeLV gp70.**

**Feline renal lymphoma:
pathological findings, lymphocytes phenotyping and
FeLV gp70 viral antigen tissue expression**

**Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Franco Brindani**

**Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa Anna Maria Cantoni**

**Dottorando:
Dr. Simone Voccia**

**Matricola:
237664**

2014-2015

Sommario

5. INTRODUZIONE	6
1.1. CLASSIFICAZIONI ANATOMICHE ED ISTOLOGICHE DEL LINFOMA DEL GATTO	22
2. PATOGENESI DEL LINFOMA DEL GATTO.....	27
2.1 Virus della leucemia felina (FeLV).....	27
2.2 Diagnosi di Linfoma	36
3. MATERIALI E METODI	39
3.1. Anticorpi e protocollo di immunistochemica	41
4. RISULTATI.....	48
6. DISCUSSIONE e CONCLUSIONI	53
7. TABELLE e GRAFICI	56
8. IMMAGINI.....	59

Riassunto

Il linfoma è una delle neoplasie più diffuse nel gatto. Questa neoplasia è stata classificata in base alla localizzazione anatomica nella forma Mediastinica (che interessa il timo e/o i linfonodi mediastinici), Alimentare, Multicentrica (che interessa diversi linfonodi e/o la milza e/o il fegato, Extranodale (che coinvolge i reni, SNC o la cute). Le cellule neoplastiche sono caratterizzate da diverse sottopopolazioni, che sono definite tramite immunofenotipizzazione ottenuta mediante tecniche immunohistochimiche (IHC), così che possano essere classificate come cellule B o T o non B/non T.

I gatti infetti dal virus della leucemia felina (FeLV, Gammaretrovirus) presentano elevata incidenza di linfomi rispetto ai gatti non infetti. I meccanismi proposti di sviluppo neoplastico sono mutagenesi inserzionali o stimolazione persistente delle cellule immunitarie dell'ospite da parte di antigeni virali, i quali possono promuovere la trasformazione in senso maligno dei linfociti.

Lo scopo di questo lavoro è stato esaminare i rilievi patologici, l'espressione di FeLV e l'immunofenotipo (B, T, nonB/nonT) nei reni felini affetti da linfoma. Abbiamo effettuato colorazione Ematossilina-Eosina ed Immunohistochimica per FeLV gp70, CD3 e CD79. Nello studio sono stati inclusi i tessuti di 49 gatti presentati all'Unità Operativa di Anatomia Patologica e Patologia Generale del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università degli studi di Parma.

Il 39% dei casi (19/49) sono caratterizzati dalla presenza di lesioni linfomatose a livello renale. Questa popolazione è costituita dal 52,6%

(10/19) maschi e dal 47,4% (9/19) femmine. L'età è compresa tra 8 mesi e 17 anni ed in particolare 26,6% (5/19) sono giovani (0-2 anni), 47,4% (9/19) sono adulti (2-10 anni) e 26,3% (5/19) sono anziani (>10 anni). Per quanto riguarda la classificazione anatomica la forma renale appare primitiva in 5 casi (25%), in 8 casi (42%) appare secondaria a linfomi multicentrici, in 3 casi (15,7%) a linfomi mediastinici e in altri 3 casi (15,7%) a linfomi gastrici e intestinali.

Per quanto riguarda l'immunofenotipizzazione sono risultati CD3 positivi il 73,7% (14/19) e CD3 negativi il 27,3% (5/19); CD79 alpha positivi il 26,3% (5/19) e CD79 alpha negativi il 73,7% (14/19); l'espressione della proteina gp70 è stata individuata nel 78,9% (15/19) delle neoplasie renali, mentre il 21,1% (4/19) non presentava espressione della proteina.

Nei 4 anni presi in considerazione nello studio si evince un'elevata incidenza della localizzazione anatomica renale sul totale di linfomi osservati. Non si è notata correlazione statistica tra linfomi renali, età e sesso dei soggetti presi in esame ma vi è un'elevata percentuale di animali adulti ed anziani affetti dalla patologia. Nella valutazione fenotipica dell'infiltrato neoplastico si è osservata l'elevata espressione di CD3, caratterizzando i linfociti come appartenenti alla sottopopolazione T. Inoltre si è evidenziato come un elevato numero di cellule neoplastiche esprimano gp70; ciò permette di affermare che i linfociti neoplastici sono infettati dal virus FeLV, il quale inoltre è in attiva replicazione. I marker CD3 e gp70 sono risultati fortemente correlati statisticamente; si può affermare perciò che l'espansione clonale dei linfociti T è correlata alla presenza e replicazione del virus.

Abstract

Lymphoma is one of the most common neoplasms in cats. Lymphomas have been classified according to their anatomical location into different forms: Mediastinal (affecting the thymus and/or lymph nodes), Alimentary, Multicentric (affecting different lymph nodes and/or spleen and/or liver), Extranodal (affecting the kidneys, CNS or skin). The Neoplastic cells are characterized by different subsets, that are determined by immunophenotyping, using immunohistochemistry (IHC), so can be classified as B- or T-cell or non-B/non-T cell.

Cats infected with feline leukemia virus (FeLV, Gammaretrovirus) have a higher incidence of lymphoma than uninfected cats. The proposed mechanisms of tumoral development are insertional mutagenesis or persistent stimulation of host immune cells by viral.

The aim of this work was to examine the pathological findings, the FeLV expression and the immunophenotype (B, T, nonB-nonT) in feline kidney affected by malignant lymphomas. We performed hematoxylin-eosin stain, IHC for FeLV gp70, CD3 and CD79. Tissues of 49 cats presented to the Operative Unit of Pathological Anatomy and General Pathology of Department of Veterinary Medical Science of Parma were included in this study.

The 39% of lymphomas (19/49) were characterized by renal location. This population was composed by 52,6% (10/19) male and 47,4% (9/19) female. The age range from 8 months to 17 years: 26,6% (5/19) young (0-2 years), 47,4% (9/19) adult (2-10 years) and 26,3% (5/19) were aged (>10 years).

As it regards the anatomical classification renal lymphoma appears primitive in 5 cases (25 %), in 8 cases (42 %) appears secondary to lymphomas multicenter, in 3 cases (15.7%) in mediastinal lymphomas and other 3 cases (15.7 %) in gastric and intestinal lymphomas.

In the immunophenotyping, 73,7% (14/19) were CD3 positive and the 27,3% (5/19) were negative; 26,3% (5/19) were CD 79 alpha positive and 73,7% (14/19) were CD79 alpha negative; expression of gp70 protein were detected in the 78,9% (15/19) of renal neoplasia, while the 21,1% (4/19) were negative.

In the 4 years in which was performed this study we detected an elevate incidence of the renal anatomical localization. There was no statistical correlation between the renal lymphomas, age and sex but there was an elevate percentage of adult and aged affected. The neoplastic population has an elevate expression of CD3, characterizing the lymphocytes as belonging to the T subset. Moreover, there is an elevate amount of neoplastic cells that express gp70; this allows that neoplastic lymphocytes are infected by FeLV virus, which is even in active replication in neoplastic cells. The CD3 and gp70 markers are strong statistically correlated; thus the clonal expansion of T lymphocytes was correlated with the presence and active replication of the virus.

5. INTRODUZIONE

Il linfoma rappresenta la neoplasia emolinfopoietica più comune nel gatto ed è caratterizzato dalla proliferazione neoplastica primitiva degli organi linfatici, con eventuale coinvolgimento secondario del midollo osseo e del sangue periferico ⁵³.

Il linfoma del gatto è una patologia linfoproliferativa con aspetti topografici e citomorfologici simili ai linfomi di altri animali domestici ed i linfomi non-Hodgking dell'uomo (NHL), per cui le classificazioni proposte in medicina veterinaria sono basate su criteri utilizzati in medicina umana.

Valli nel 2000 ha applicato la classificazione Working Formulation del National Cancer Institute a 602 casi di malattie linfoproliferative del gatto, evidenziando correlazioni tra le caratteristiche morfologiche cellulari, l'architettura del tessuto, l'indice mitotico delle cellule linfoidi proliferanti con la naturale progressione della malattia neoplastica. Nella classificazione NCI WF sono stati definiti tre gradi di progressione: basso, intermedio ed alto grado di malignità. Nel lavoro di Valli il 30% dei linfomi felini appaiono di grado intermedio e il 50% di alto grado di malignità (linfomi mediastinici); gli Autori rilevano inoltre correlazioni significative tra localizzazione anatomica del linfoma ed età (i linfomi alimentari e cutanei si osservano in prevalenza negli animali anziani, mentre i linfomi mediastinici, multicentrici e del SNC si evidenziano in gatti giovani) e tra il numero delle mitosi ed altre variabili come il comportamento biologico, la positività al

virus FeLV e presenza di necrosi⁵⁴.

Anche la classificazione di Kiel è utilizzata in campo medico veterinario in quanto differenzia i tipi cellulari non solo dal punto di vista istopatologico ma anche citomorfologico, ma i lavori scientifici in cui si applica appaiono scarsi. La valutazione immunofenotipica e morfologica di 76 linfomi felini seguendo la classificazione di Kiel ha evidenziato che il 49% dei casi sono linfomi a cellule T, il 25% sono linfomi a cellule B mentre il restante 26% non presenta positività ai marker linfocitari utilizzati (linfomi nonB/nonT); inoltre il 64% dei linfomi mostra un alto grado di malignità e il 36% un basso grado di malignità.

Gabor in un lavoro sui quadri clinici e sulla distribuzione delle lesioni nel linfoma felino, ha sottolineato la complessità e l'eterogeneità delle neoplasie linfoidi del gatto e le differenze rilevate in diversi lavori sulla classificazione anatomica, pertanto Gabor ha sviluppato una classificazione suddivisa in 5 forme anatomiche, in cui sono previste dei sottogruppi (tabella n°2, capitolo 4): linfoma mediastinico, linfoma addominale (suddiviso in alimentare, renale, epatico e splenico,), linfoma linfonodale (solitario, regionale, multinodale), linfoma atipico (SNC, cutaneo, nasolaringeo ecc.), linfoma misto (con coinvolgimento di più organi sia della cavità addominale, sia della cavità toracica); in questo studio su 118 casi si sono evidenziati 36 linfomi (31%) con interessamento renale bilaterale: in 6 casi si rilevano linfomi renali primitivi, in 13 casi il linfoma renale si presenta associato a lesioni a livello addominale (intestino e linfonodi mesenterici), in 17 casi

si osserva il coinvolgimento del rene in un contesto di linfoma definito misto¹⁰.

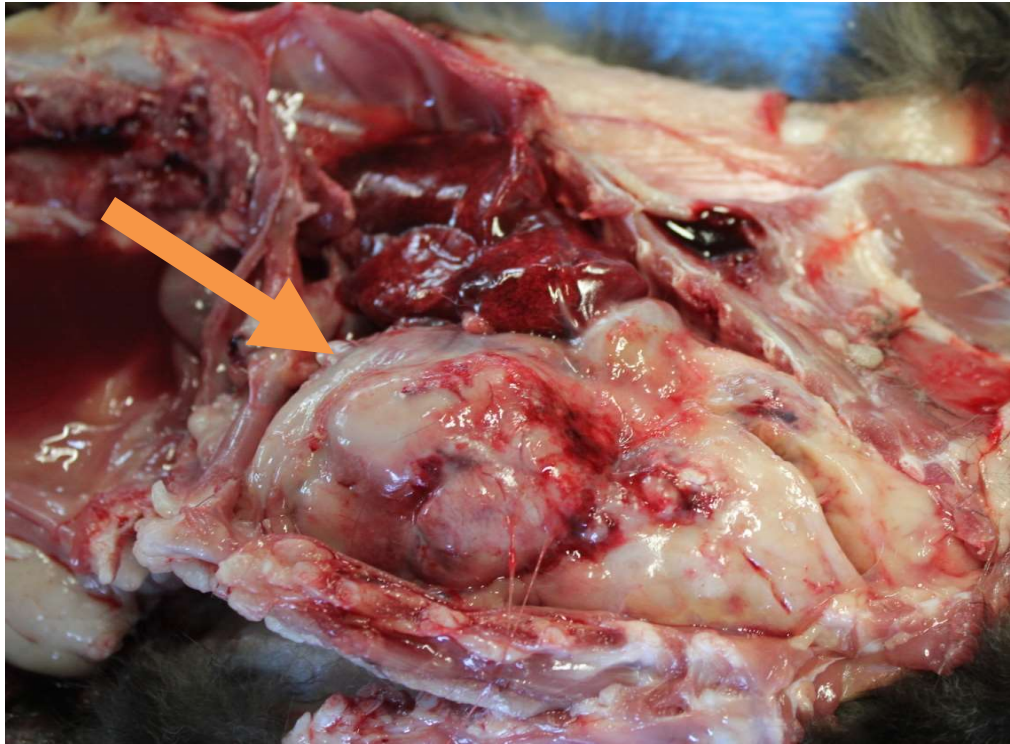
La classificazione anatomica maggiormente utilizzata nel linfoma del gatto presenta quattro forme: mediastinica (o timica), alimentare, multicentrica ed extranodale.

Il linfoma felino si sviluppa più frequentemente a livello gastroenterico o mediastinico, mentre il linfoma multicentrico è meno rappresentato.

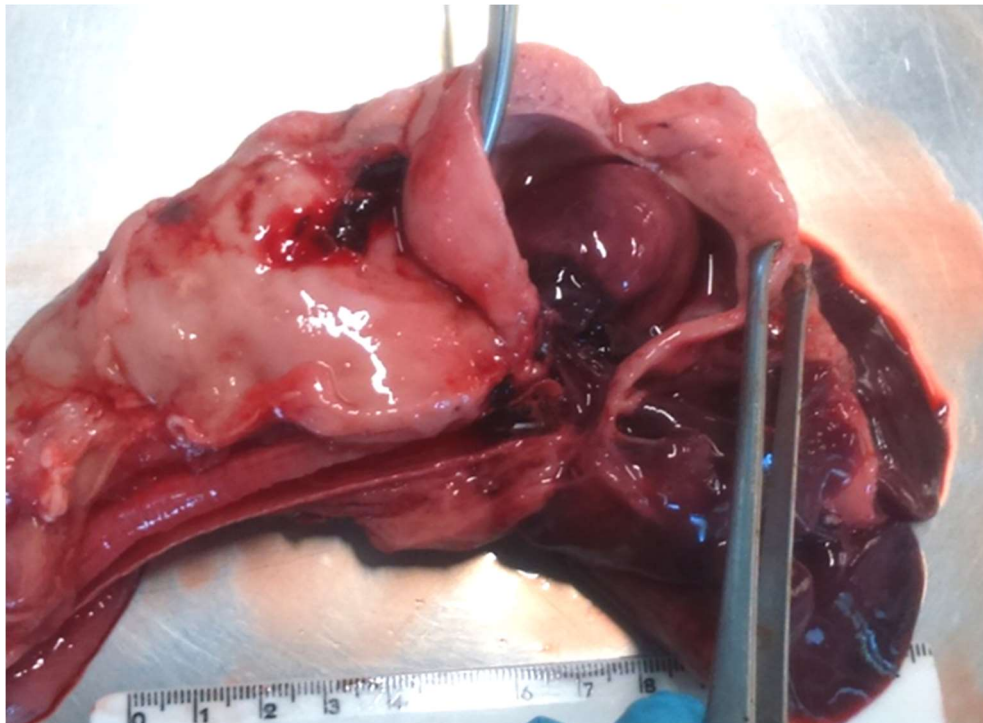
Con il termine multicentrico nella classificazione anatomica del linfoma felino non si indica il coinvolgimento neoplastico generalizzato dei centri linfonodali, bensì si evidenzia il coinvolgimento di più organi (milza, fegato) e/o di gruppi linfonodali (linfonodi periferici e mesenterici)³².

In particolare il linfoma multicentrico nel gatto interessa più frequentemente i linfonodi mediastinici e mesenterici e gli organi addominali, rispetto ai linfonodi esplorabili: la linfadenomegalia periferica a differenza del cane è poco comune.

È stato rilevato come i linfomi alimentari siano spesso a piccole cellule, ben differenziati, a basso grado di malignità, mentre a livello mediastinico i linfomi sono caratterizzati da piccole cellule non indentate. Un ulteriore criterio di classificazione è la frequenza delle mitosi, presenti in numero minore nei linfomi a basso o intermedio grado di malignità. Situazione opposta è stata riscontrata nelle forme ad alto grado di malignità.



IMG. 1 : Gatto Felv+. Linfoma mediastinico, voluminosa massa neoplastica comprime gli organi contenuti nella cavità toracica



IMG.2 : linfoma mediastinico: ispessimento e infiltrazione del pericardio
(nec 90/2015)

La forma mediastinica (o timica) è quella maggiormente associata ad infezione da FeLV (90% dei casi). Sono interessati gatti di 1-3 anni di età che evidenziano segni clinici quali tosse, dispnea, intolleranza all'esercizio, rigurgito, disfagia, anoressia e, occasionalmente, sindrome di Horner mono o bilaterale. Questa forma è caratterizzata da linfadenomegalia mediastinica eventualmente associata a versamento pleurico (chiloso o emorragico), con o senza infiltrazione midollare. I polmoni risultano compressi dalla voluminosa massa neoplastica ma raramente sono infiltrati. È frequente il riscontro di megalia a carico dei linfonodi della testa, del collo ed ascellari. È inoltre possibile evidenziare edema sottomandibolare, del collo e degli arti toracici, dispnea e cianosi correlati alla sindrome della vena cava, secondaria all'infiltrazione neoplastica intracavitaria.

La forma alimentare, coinvolge per lo più animali anziani e FeLV negativi (70% dei casi), si differenzia in tre ulteriori forme: il linfoma associato a MALT, il linfoma a grandi linfociti granulosi ed il linfoma intestinale a cellule T. Il linfoma associato al MALT (la più frequente delle forme) deriva dalle cellule B ed è caratterizzato dall'infiltrazione solitaria, diffusa o multifocale del tratto gastroenterico, con o senza linfadenomegalia mesenterica e coinvolgimento epatico. In ordine decrescente sono interessati intestino tenue, stomaco, valvola ileocecale e colon. I gatti sono portati alla visita per dimagrimento, anoressia, vomito e diarrea anche emorragica. Occasionalmente sono presenti sintomi ascrivibili ad ostruzione intestinale o a peritonite secondaria alla perforazione intestinale. Alla palpazione addominale si evidenzia

una massa o ispessimento della parete intestinale. In uno studio condotto su 163 gatti i linfomi alimentari appaiono più frequenti e mostrano un tempo di sopravvivenza inferiore rispetto ai linfomi mediastinici e nasali; dal punto di vista citomorfologico si evidenziano linfomi immunoblastici (18%), centroblastici (16%), a linfociti granulosi (15%), linfocitici (12%), linfoblastici (12%), pleomorfi a medie-grandi cellule (10%) e anaplastici a grandi cellule³³.



IMG.3 : linfoma gastrico (nec 161/2014)

Il linfoma a grandi linfociti granulosi (feline LGL lymphoma) rappresenta circa il 10% dei linfomi alimentari e deriva dalla proliferazione dei linfociti T citotossici o cellule NK. Interessa principalmente ileo, digiuno e linfonodi mesenterici, mentre solo occasionalmente vi può essere estensione a stomaco, grosso

intestino e fegato ³³. Il linfoma intestinale a cellule T (CD3⁺) è raro e caratterizzato da infiltrazione estesa dell'epitelio intestinale e della mucosa di cellule linfoidi neoplastiche (epiteliotropismo), che in alcuni punti formano piccoli aggregati.



IMG.4 : linfoma intestinale-voluminosa massa a livello di piccolo intestino
che (nec 231/12)



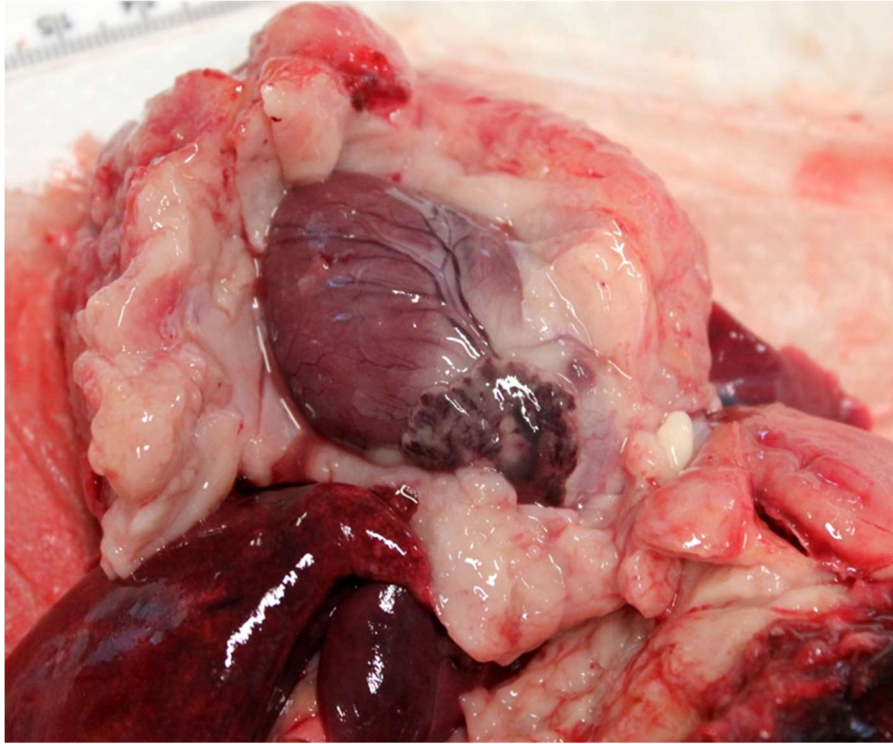
IMG.5 : linfoma intestinale con interessamento dei linfonodi mesenterici
(nec 231/12)

La forma multicentrica è caratterizzata da linfadenomegalia solitaria o generalizzata, con o senza coinvolgimento splenico, midollare ed extranodale. La sola linfadenomegalia periferica senza organomegalia è riscontro molto raro nel gatto a differenza del cane e con l'avanzare della malattia il processo neoplastico interessa anche il fegato, la milza e il midollo osseo. I gatti sono per lo più giovani e FeLV positivi (80% dei casi), normocalcemici e presentano sintomi aspecifici come dimagrimento, letargia, anoressia e febbre. La tosse può essere presente, se i linfonodi sottomandibolari sono voluminosi e comprimono le prime vie respiratorie. L'anemia è un riscontro molto frequente. La diagnosi differenziale deve essere posta con la linfadenopatia idiopatica reattiva (iperplastica) che interessa gatti giovani, attraverso l'esame citologico. La linfadenopatia iperplastica reattiva appare correlata all'esposizione virale ed è associata alla risposta immunitaria dell'ospite, tendendo nella maggior parte dei casi a regredire spontaneamente³³.

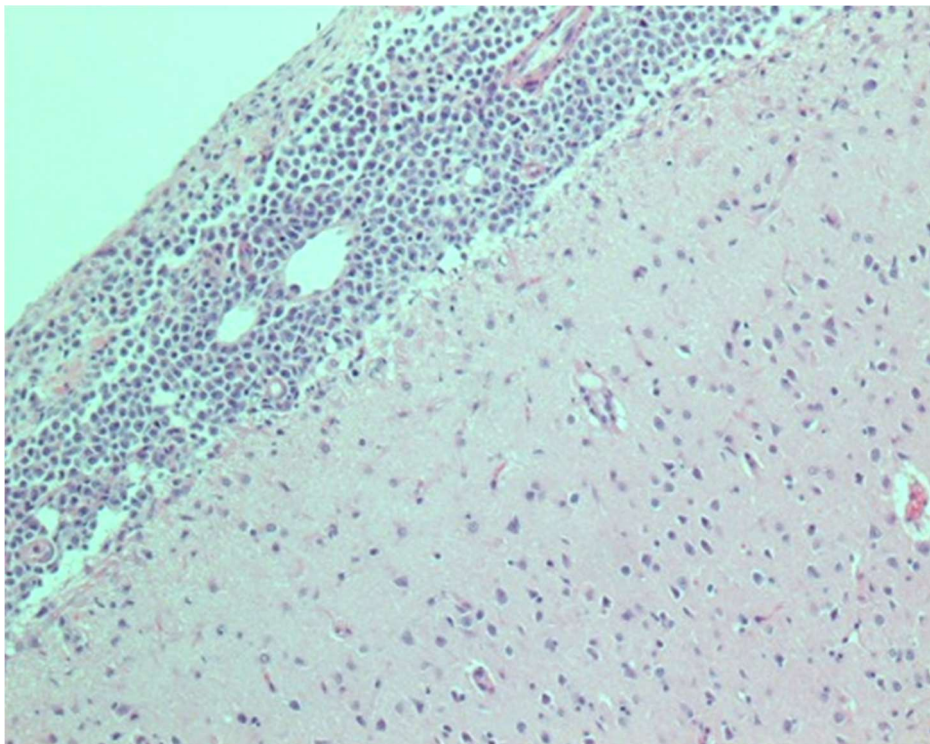
Il linfoma extranodale riconosce diverse forme: nervosa, renale, nasale e nasofaringea oculare ecc.

La forma nervosa è caratterizzata dal coinvolgimento centrale (encefalico o spinale) o periferico e può essere primitiva, oppure far parte del linfoma multicentrico. È importante sottolineare che gatti con linfoma renale nel 40-50% dei casi possono presentare anche un concomitante interessamento cerebrale. In particolare, si riconoscono il linfoma solitario epidurale, il linfoma spinale

(soprattutto solitario extradurale), il linfoma intracranico ed il linfoma dei nervi periferici. I primi 2 sono in assoluto i più frequenti, sono comuni l'interessamento del tratto T2-L4 e l'estensione del processo neoplastico alle vertebre contigue. Il linfoma spinale interessa in genere gatti giovani di 3-4 anni, soprattutto maschi e FeLV positivi (> 80% dei casi), mentre il linfoma cerebrale è più comune nei gatti anziani e FeLV negativi e l'immunofenotipo è spesso B. I sintomi evolvono rapidamente e sono spesso multifocali: crisi epilettiche o convulsive (molto frequenti), atassia progressiva, paresi flaccida o spastica spesso bilaterale e, in caso di linfoma cerebrale, anche cecità e disorientamento. Alcuni gatti sono portati alla visita per una neuropatia periferica craniale, caratterizzata da dilatazione pupillare in assenza di movimenti oculari. L'esame del midollo osseo mostra infiltrazione neoplastica nel 70% circa dei casi. La diagnosi differenziale deve essere posta con traumi, ernia del disco, mielopatia ed altri tumori spinali o encefalici primitivi ³³.



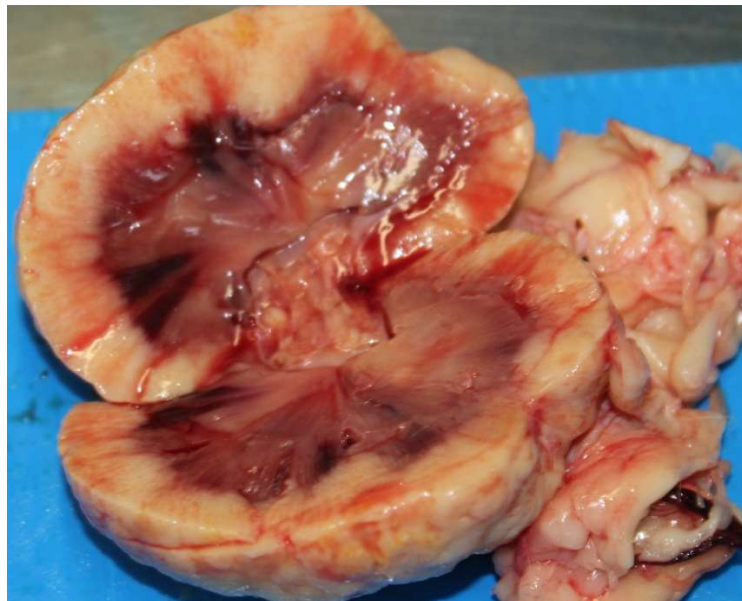
IMG.6 : linfoma mediastinico con infiltrazione di pericardio e cuore (nec 166/2015)



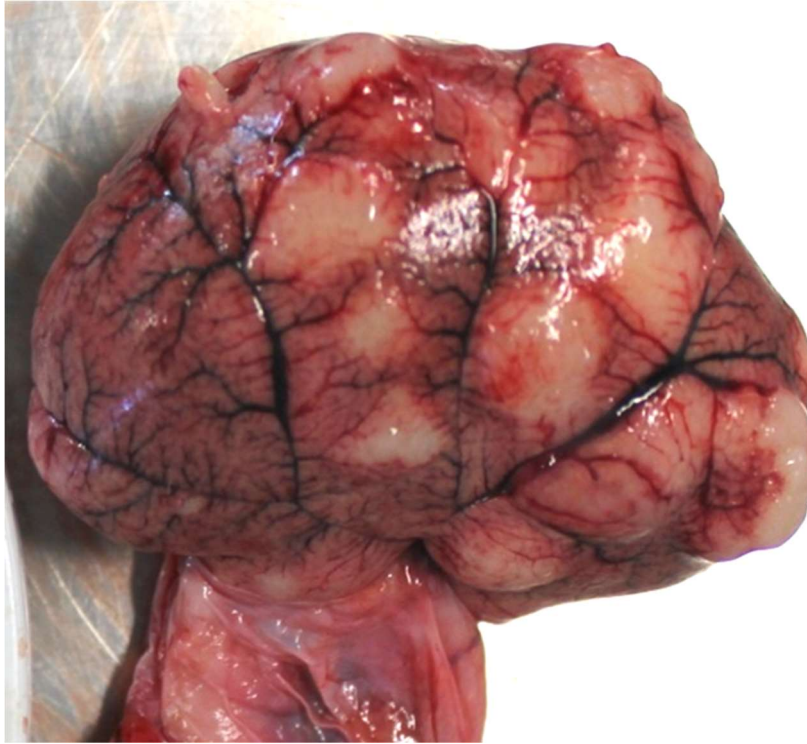
IMG. 7: Linfoma cerebrale: infiltrazione metastatica di cellule linfocitarie neoplastiche a livello sub meningeo. E-E 10x

Il linfoma renale interessa prevalentemente gatti adulti, FeLV positivi. Può essere primitivo o far parte della forma alimentare o multicentrica.

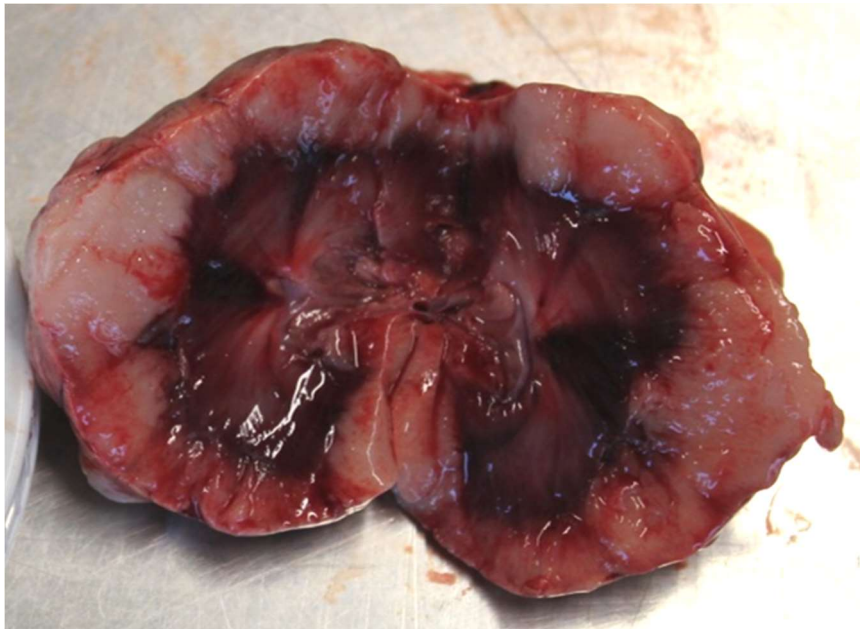
Il gatto è portato alla visita con sintomi correlati all'insufficienza renale, come anoressia, vomito, disidratazione ed aspetto emaciato. Spesso il linfoma renale si accompagna a coinvolgimento cerebrale (50% dei casi): pertanto possono essere presenti sintomi quali irritabilità, cambio di personalità, debolezza, mancata coordinazione e deficit propriocettivi. Alla palpazione, uno e, più frequentemente, entrambi i reni appaiono aumentati di volume, duri e irregolari. Gli esami di laboratorio permettono di riscontrare anemia, aumento dell'azotemia, della creatinina e del fosforo. La diagnosi differenziale deve essere posta con la malattia policistica renale, insufficienza renale ed altri tumori renali primitivi ³³.



IMG.8: linfoma renale con infiltrazione diffusa della corticale. (nec 20/13)



IMG.9: linfoma renale:forma focale con lesioni nodulari di colore bianco-grigiastro.(nec37/15)



IMG. 10: Linfoma renale: in sezione si osservano lesioni nodulari di diverse dimensioni che si approfondano nella corticale (nec37/15)



IMG.11: infiltrazione metastatica a livello tracheale (nec37/15)

La forma oculare è piuttosto comune e può essere primitiva, oppure far parte della forma multicentrica. I gatti sono portati alla visita per fotofobia, blefarospasmo, epifora, ifema, ipopion, presenza di masse oculari o retrorbitali, uveite o distacco retinico. È abbastanza frequente l'associazione con FeLV. È stato recentemente descritto un linfoma congiuntivale bilaterale con immunofenotipo B in un gatto ³³.

La forma nasale e nasofaringea è frequente ed i sintomi sono simili alle infezioni del primo tratto respiratorio: dispnea, scolo nasale mucopurulento o emorragico monolaterale o bilaterale, deformazione facciale, starnuti ed esoftalmo. I gatti con linfoma nasale sono adulti o anziani e FeLV negativi, l'immunofenotipo è spesso B. La forma nasale, che invece interessa i gatti FeLV positivi, evolve spesso a linfoma multicentrico e risponde alla chemioterapia.

I linfomi nasale e nasofaringeo, esempi tipici di linfoma extranodale, sono le forme più comuni di tumore a livello delle vie aeree superiori, seguiti da tumori di origine epiteliale. I dati epidemiologici evidenziano come il linfoma nasale si riscontri maggiormente in gatti anziani e FIV-FeLV negativi, senza una significativa predisposizione di sesso o razza.

La forma cutanea è rara nella specie felina e generalmente interessa gatti anziani e FeLV negativi (>90% dei casi). Le lesioni sono generalizzate oppure focali ed includono noduli, placche, ulcere e dermatite esfoliativa. È inoltre possibile la comparsa di prurito, alopecia e lesioni crostose. Altre forme extranodali riportate in letteratura sono la tracheale, laringea, cardiaca, ossea e polmonare, di cui esistono solo sporadiche segnalazioni³³. Recentemente sono stati descritti casi di

linfomi pericardici primitivi nel gatto ¹ e un linfoma a cellule T a livello della bolla timpanica in un gatto FeLV negativo.

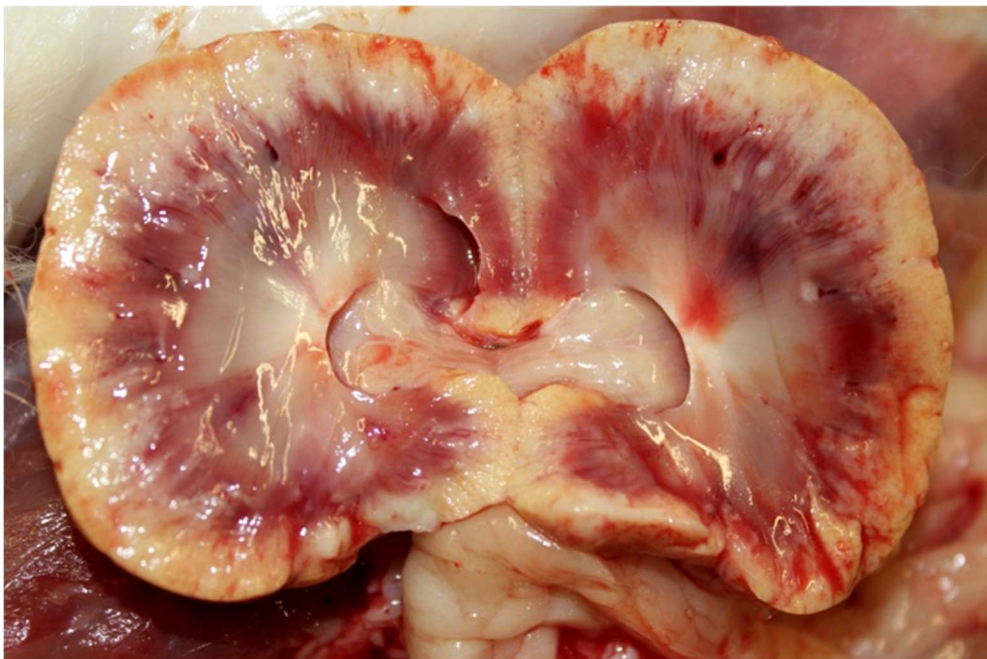
Le sindromi paraneoplastiche che si accompagnano al linfoma felino sono l'eosinofilia (secondaria alla produzione da parte delle cellule neoplastiche di interleuchina-5), la necrosi simmetrica cutanea (descritta in un gatto a livello delle estremità distali degli arti), la mioclonia e, raramente l'ipercalcemia maligna ³³



IMG.12: linfoma mediastinico con megalia dei linfonodi sottomandibolari (nec 90-2015)



IMG.13: linfoma epatico(nec 167-2015)



IMG.14: linfoma renale diffuso (nec 167-2015)

1.1. CLASSIFICAZIONI ANATOMICHE ED ISTOLOGICHE DEL LINFOMA DEL GATTO

Classificazione anatomica del linfoma nel gatto secondo Working Formulation (NCI. National Cancer Institute)³⁴

Forme	Localizzazione anatomica
Multicentrico	Coinvolgimento di linfonodi, milza, fegato e rene. Sia singolo che qualsiasi combinazione di questi siti
Timico o mediastinico	Coinvolgimento del timo e/o linfonodi mediastinici
Alimentare	Coinvolgimento di organi del tratto gastrointestinale dallo stomaco al colon e/o dei linfonodi mesenterici
Miscelaneo o extranodale	Coinvolgimento dell'occhio o del sistema nervoso centrale e/o altri tessuti non linfoidi

Morfologia cellulare	
Linfoma a piccoli linfociti (diffuso, talvolta con differenziazione plasmocitoide)	
Linfoma a cellule medio-piccole incise e/o grandi incise e non incise (follicolare o diffuso)	
Linfoma a cellule medio-piccole non incise (diffuso)	linfoblastico
	a cellule con nuclei circonvoluti
Linfoma a grandi cellule di tipo immunoblastico non incise	
Linfoma a grandi cellule di tipo immunoblastico	

Classificazione isto-citologica di Kiel(1974)

Linfoma linfocitico	a cellule B a cellule T
Linfoma a cellule di centro germinativo	(a cellule B) (follicolare o diffuso) <ul style="list-style-type: none">• centrocitico• centroblastico-centrocitico• centroblastico
Linfoma linfoblastico	<ul style="list-style-type: none">• a cellule B• a cellule T• non classificabile
Linfoma immunoblastico	<ul style="list-style-type: none">• a cellule B (con differenziazione plasmoblastica)• a cellule T (senza differenziazione)
Linfoma a cellule immunopoietiche (immunocitoma)	<ul style="list-style-type: none">• linfoplasmocitico• plasmocitico (plasmocitoma)

Classificazione REAL (Revised European American Lymphoma system) in WHO-IHCTDA (2002)

<i>Neoplasie linfoidi a cellule B</i>	Neoplasie a cellule B precursori	Leucemia/Linfoma a cellule B linfoblastiche	
	Neoplasie a cellule B precursori	Leucemia/Linfoma cronico a cellule B linfocitiche	
		Linfoma di tipo intermedio a cellule B linfocitiche (LLI)	
		Linfoma linfoplasmocitico (LPL)	
		Linfoma follicolare	
		Linfoma extranodale a cellule B della zona marginale del tessuto linfoide associato alle mucose (MALToma)	
		Leucemie a cellule "capellute"	
		Tumori plasmocitici	
		Linfomi a grandi cellule B	Linfoma a cellule B ricco di cellule T
			Linfoma immunoblastico a grandi cellule
			Linfoma diffuso a grandi cellule B (incise, non incise)
	Linfoma mediastinico a cellule B		
	Linfoma intravasale a grandi cellule B		
	Linfoma tipo Burkitt a cellule "capellute"	Linfoma ad alto grado a cellule B, Burkitt-simile	

<i>Neoplasie linfoidi a cellule T e a cellule NK</i>	Neoplasie a cellule T precursori	Leucemia/Linfoma a cellule T linfoblastiche	
	Neoplasie a cellule mature T e NK	Neoplasie a grandi linfociti granulosi (LGL)	Leucemia linfocitica cronica a cellule T
			Linfoma/Leucemia LGL a cellule T
			Leucemia linfocitica cronica a cellule NK
		Neoplasie cutanee a cellule T	Linfoma cutaneo epiteliotropo (CEL)
			Linfoma cutaneo non epiteliotropo
		Linfoma extranodale/periferico a cellule T (PTCL)	
	Linfoma /Leucemia a cellule adulte simili a cellule T		
	Linfoma angioimmunoblastico		
	Linfoma angiotropico		
Linfoma intestinale a cellule T			
Linfoma anaplastico a grandi cellule			

Stadiazione clinica del linfoma felino (Milner 2005)

STADIO	DESCRIZIONE
STADIO I	un singolo linfonodo coinvolto o un singolo organo (esclusione del midollo osseo).
STADIO II	linfoma extranodale con coinvolgimento dei linfonodi regionali; due o più linfonodi dallo stesso lato del diaframma; due linfomi extranodali dallo stesso lato del diaframma, con o senza coinvolgimento linfonodale regionale; un linfoma del tratto gastroenterico asportabile chirurgicamente, con o senza coinvolgimento dei linfonodi mesenterici corrispondenti
STADIO III	due linfomi extranodali posti ai lati opposti del diaframma; 2 o più linfonodi sui lati opposti del diaframma; linfomi primari gastroenterici diffusi, non asportabili chirurgicamente, linfomi paraspinali o epidurali, associati o meno ad altre localizzazioni.
STADIO IV	Stadio I, II o III con coinvolgimento di fegato e/o milza.
STADIO V	Stadio I, II, III o IV con coinvolgimento: iniziale del sistema nervoso centrale, del midollo emopoietico o di entrambi

2. PATOGENESI DEL LINFOMA DEL GATTO

Dal punto di vista patogenetico è stata da tempo dimostrata l'associazione tra malattie linfo-mieloproliferative e l'infezione dal virus della leucemia felina (FeLV).

2.1 Virus della leucemia felina (FeLV)

FeLV è un gammaretrovirus della famiglia dei *Retroviridae*, sottofamiglia degli *Oncovirinae*.

Il patrimonio genetico dei retrovirus è codificato da una molecola di RNA. La prima fase della replicazione del virus consiste nella creazione di una copia di DNA sullo stampo del RNA virale. Ciò è possibile grazie all'enzima "trascrittasi inversa". Questo è pertanto oggetto di numerosi studi volti a sviluppare protocolli terapeutici per fermare o quantomeno arrestare la replicazione virale nell'ospite infetto.

La trascrittasi è in grado di produrre una molecola di DNA copia sulla base del RNA virale. La molecola di DNA è quindi integrata nel genoma della cellula ospite, grazie all'enzima "integrasi" anch'esso di derivazione virale.

Si forma così il provirus che rimarrà integrato al DNA dell'ospite anche durante la replicazione cellulare. Questa particolarità, unica dei retrovirus, determina il fenomeno della latenza, cioè la presenza del virus nonostante l'assenza di segni clinici rilevabili⁵².

Il virus della leucemia felina FeLV è caratterizzato da vari antigeni:

- l'*envelope* è costituito dalla glicoproteina 70 (*gp70*) e dalla

proteina 15 (*p15e*). Entrambe sono il target degli anticorpi neutralizzanti e, pertanto fungono da componenti strutturali di diversi tipi di vaccini.

- Il *core* presenta varie proteine che unite insieme formano il “*pr65gag*” (group antigen): la *p15MA* (matrix); la *pp12*; la *p27CA* (capsid) è abbondante nel plasma dei gatti viremici e viene ricercata nei test diagnostici (snap test), *p10 NC* (nucleocapsid)

In base alla variazione della *gp70* sono stati riconosciuti 3 sierotipi del virus FeLV:

- FeLV A: ubiquitario, l'unico responsabile della trasmissione dell'infezione²⁷. In seguito ad alterazione della replicazione virale si incrocia il DNA virale con tratti del genoma cellulare denominati “endogenous FeLV”. Questi sono tratti di DNA della cellula ospite geneticamente molto simili al genoma virale, si pensa possano derivare da mutazioni genetiche dovute a continue infezioni latenti nel corso dei secoli. Si formano così nuovi sierotipi del virus il cui DNA non si integra nel genoma della cellula ospite.
- FeLV B (o FeSV): si genera dalla ricombinazione tra FeLV A e sequenze di DNA endogeno. La concomitante presenza di FeLV A e FeLV B determina una maggiore probabilità di deviazione oncogenetica.
- FeLV C: si sviluppa nei gatti infetti da FeLV A, induce anemia emolitica.

- FeLV T: associato alla sindrome da immunodeficienza.

La diffusione del virus può avvenire per via verticale oppure per via orizzontale.

La trasmissione verticale si ha solamente quando la gatta partoriente presenta alti livelli di viremia necessari affinché avvenga il passaggio della barriera placentare e l'infezione dei feti.

La via orizzontale è più frequente e avviene attraverso un contatto diretto tra animali benché FeLV sia piuttosto labile nell'ambiente, quindi non in grado di sopravvivere a lungo.

I gatti viremici concentrano il virus nelle secrezioni oronasali, quindi la lotta, la condivisione di ciotole oppure la pulizia reciproca sono considerati comportamenti a rischio che possono favorire la trasmissione virale.

Studi più recenti hanno dimostrato che i virus presenti a livello di feci e di urine mantengono un certo potenziale d'infettività, si pensa quindi che la diffusione del virus possa avvenire anche attraverso il contatto con feci o urine emesse recentemente da animali infetti ¹².

Gatti che presentano alti livelli di viremia hanno una probabilità maggiore di diffondere il virus, pertanto animali con viremia progressiva sono maggiormente infettivi rispetto ad altri con cicli viremici periodici.

FeLV si replica a livello di orofaringe poi invade il letto vascolare. L'infezione può avere, secondo i casi, sviluppi differenti. Il fattore discriminante, oltre alla carica infettante, può essere la risposta del sistema immunitario all'infezione.

Nel gatto giovane questo non è ancora completamente sviluppato, l'età del soggetto al momento dell'infezione può favorire lo sviluppo della patologia. L'85% dei gatti che entrano in contatto con FeLV tra le 2 e le 8 settimane sviluppa viremia persistente, mentre l'85% dei gatti che incontrano FeLV tra i 4 e i 12 mesi sviluppa infezione latente ²².

Inoltre, in caso di terapie prolungate a base di corticosteroidi, questa resistenza indotta dall'età si altera perché si induce immunodepressione ⁴⁶.

I quadri che si possono determinare sono:

- infezione di tipo abortivo. Dopo un'iniziale replicazione a livello di orofaringe avviene la risposta umorale e cellulo-mediata che blocca la replicazione virale. Questi gatti non diventano viremici, nel sangue si nota la presenza di anticorpi neutralizzanti in assenza di antigeni virali. Generalmente l'infezione abortiva si sviluppa quando la carica infettante è scarsa e l'animale è immunocompetente. Tuttavia, è una definizione che sta diventando obsoleta poiché l'utilizzo di metodiche diagnostiche molto sensibili, come PCR e rtPCR, ha permesso di trovare tratti genomici virali in latenza nel midollo osseo;
- infezione di tipo latente o regressivo. Dopo la replicazione a livello di orofaringe il virus invade il torrente circolatorio, il gatto risulta positivo ai test ELISA diretti ed è in grado di infettare altri individui. Dopo circa tre settimane avviene la risposta del sistema immunitario, umorale e cellulo-

mediata, che riduce la viremia fino quasi ad azzerarla. L'organismo resta comunque infetto dato che il virus è presente a livello di midollo osseo come provirus nel genoma cellulare di cellule staminali. La ricerca di antigeni virali nel sangue (ELISA) da risultati negativi, mentre tecniche più sensibili come PCR e rtPCR possono dare risultati positivi. Il 10% dei gatti ELISA negativi risultano PCR positivi per la ricerca di provirus nel sangue ²¹;

- infezione di tipo progressivo. Quando il sistema immunitario non è in grado di dare una risposta adeguata all'infezione, il virus replica nel tessuto linfoide, poi nelle cellule progenitrici del midollo osseo e infine nel tessuto epiteliale ghiandolare e mucosale. Il gatto raggiunge lo stato di viremia persistente e risulta costantemente infettante verso gli altri gatti. Sopraggiungono varie patologie FeLV-associate che riducono notevolmente l'aspettativa di vita nei gatti infetti. Per differenziare un'infezione latente da una viremia progressiva è necessario ripetere il test ELISA a distanza di sedici settimane, tempo necessario per l'abbattimento della viremia. Oppure attraverso la Real Time PCR è possibile misurare la carica virale nel sangue che risulta essere elevata in caso di infezione progressiva e bassa in caso di infezione latente ⁵²;
- infezione atipica. È piuttosto rara, caratterizzata da persistente replicazione virale atipica a livello di ghiandola mammaria, vescica o occhi. Porta ad una viremia intermittente o scarsa. La ricerca di antigeni virali nel sangue

porta a risultati discordanti ²⁹.

La vaccinazione svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'infezione. Nei gatti vaccinati la carica anticorpale permette di neutralizzare la carica infettante. Tuttavia, nella maggior parte dei gatti vaccinati non si ha l'eliminazione del virus, ma la regressione della viremia con deviazione a infezione latente.

La carica anticorpale elevata impedisce la replicazione del virus. È stato dimostrato si possa avere una completa eliminazione del virus: in un gruppo di gatti vaccinati che albergavano il virus in fase latente solo l'8% a distanza di 3 anni presenta ancora il DNA virale a livello di midollo osseo ³⁷.

L'infezione latente non si rileva solo negli animali vaccinati, ma si riscontra frequentemente nei gatti immunocompetenti che entrano in contatto con il virus. La differenza principale è che la vaccinazione impedisce la replicazione virale andando lentamente ad eliminare il virus, mentre nei soggetti non vaccinati il virus è in grado di replicare.

La replicazione porta a un innalzamento della viremia che viene, però contrastato dal sistema immunitario, si creano quindi dei periodici cicli viremici. Una caduta dell'immunità, dovuta a terapie a base di corticosteroidi, infezioni secondarie (tra cui FIV), oppure semplicemente all'invecchiamento, può portare ad un progressivo aumento della frequenza e dell'intensità dei cicli viremici. Si assiste, quindi all'evoluzione da un'infezione latente a un'infezione progressiva, la viremia è sempre presente e in continuo aumento. Si creano quindi le condizioni necessarie allo sviluppo di lesioni,

microscopiche e macroscopiche, da FeLV e la sintomatologia clinica.

Il meccanismo patogenetico oncogenetico di FeLV è l'inserimento nel genoma vicino ad un oncogene cellulare, più frequentemente il myc, che determina l'attivazione e l'iperespressione di quel gene. Questo effetto determina un'eccessiva e incontrollata proliferazione cellulare. In assenza di un'appropriata risposta immunitaria ne deriva una malignità monoclonale.

Un gatto FeLV positivo presenta una probabilità di sviluppare un linfoma 60 volte maggiore rispetto ad un negativo; un gatto FIV positivo risulta, invece circa 5 volte più sensibile. Questo perché FeLV ha un ruolo diretto nella oncogenesi, mentre FIV agisce in modo indiretto. Il tumore di più frequente rilievo in gatti infetti da retrovirus è il linfoma. Questo, però varia a seconda dell'agente infettante in quanto FeLV sviluppa con maggiore probabilità un processo neoplastico a carico dei linfociti T, mentre nei gatti FIV positivi si rilevano linfomi a cellule B ⁴¹.

FeLV è un importante oncogene in grado di indurre diversi tumori. Tra questi, i principali sono sicuramente il linfoma e la leucemia. Meno frequentemente possiamo trovare altri tumori ematopoietici e più raramente neuroblastomi, osteocondromi ed altri. L'associazione tra la positività a FeLV e presenza di linfoma è stata ampiamente dimostrata in vari studi:

- queste neoplasie possono essere indotte nei gattini in seguito ad infezione sperimentale ⁴³.
- i gatti con infezione naturale hanno un rischio maggiore di sviluppare un linfoma rispetto ai non infetti ¹⁵.

- la maggior parte dei gatti con linfoma sono risultati, quando la prevalenza di FeLV era molto elevata, positivi ai test per la ricerca di virus o suoi antigeni. In passato, circa l'80% dei linfomi e delle leucemie nel gatto era correlato ad infezione da FeLV ¹⁷.

Tuttavia, a partire dagli anni '80 si è registrata una riduzione della prevalenza della viremia in gatti con linfoma ¹⁸. Questi dati indicano come, negli ultimi anni, l'eziologia delle neoplasie emolinfopoietiche nel gatto non sia più strettamente correlata all'infezione da FeLV. In Germania, per dimostrare ciò, sono stati eseguiti due studi successivi dove si è registrato un calo della prevalenza di oltre il 30%. Nel primo, in un periodo che va dal 1980 al 1995, sono stati analizzati numerosi gatti con linfoma o leucemia e di questi circa il 59% sono risultati positivi per FeLV. Il secondo studio, eseguito nello stesso ospedale veterinario universitario utilizzando le medesime tecniche diagnostiche dal 1996 al 1999, ha registrato una prevalenza del 20% di positività per FeLV ¹⁸. Inoltre, recentemente in Olanda solo 4 gatti su 71, con linfoma, sono risultati FeLV positivi, nonostante 22 di questi presentassero linfoma mediastinico considerato da sempre strettamente associato a FeLV ⁵¹.

Attualmente si rileva un aumento della prevalenza di linfomi in gatti anziani. La ragione principale della riduzione della correlazione tra FeLV e il linfoma è da attribuire alla minor prevalenza di FeLV nella popolazione, grazie alla vaccinazione ed all'eliminazione dei gatti infetti. Tuttavia, questi dati non sono esaustivi se si utilizza come unica tecnica diagnostica la ricerca di

antigeni virali nel sangue, perché questa può avere un elevato numero di falsi negativi ²³. È stato dimostrato come gatti risultati negativi ai test antigenici, che non sono entrati successivamente in contatto con animali infetti, mantengono comunque un'elevata probabilità di sviluppare un linfoma. Inoltre, in seguito ad inoculazione del virus alcuni gatti possono risultare negativi ai test antigenici, ma mantenere un tasso di sensibilità al linfoma circa 40 volte più alto ⁴⁶. La tecnica della PCR ha permesso di amplificare tratti di DNA provirale in neoplasie linfoidi in gatti negativi ai test antigenici. Si pensa, quindi che il virus possa essere associato ad un numero di neoplasie più ampio rispetto a quanto presunto ⁴⁶. È da considerare il ruolo dell'infezione latente, cioè la sola presenza del provirus nelle cellule infette. Questo può ricombinarsi con geni cellulari alterando così il genoma della cellula e favorendo, la deviazione oncogenetica ⁴⁶.

È ancora da definire una chiara associazione tra l'infezione latente e lo sviluppo di linfoma in quanto diversi studi hanno portato a risultati discordanti. In un primo studio, il DNA provirale, in tessuti tumorali fissati in formalina ed inclusi in paraffina, era presente in 7 gatti su 11 ²³, un secondo studio ha rilevato una positività su 22 casi 44, ed in un lavoro in cui si sono valutati tessuti neoplastici di 50 gatti negativi ai test antigenici, è risultato positivo per il DNA provirale⁴⁹. In uno studio condotto presso la Vetsuisse Faculty of Zurich è stata valutata la possibilità che gatti donatori di sangue possano trasmettere il provirus nei gatti trasfusi e la capacità del provirus di evolversi in virus circolante se inoculato in ospiti non immunocompetenti ³⁶.

2.2 Diagnosi di Linfoma

Il sospetto diagnostico di linfoma renale si può avere all'esame obiettivo generale attraverso la palpazione dei reni, confermato poi dalle tecniche di diagnostica per immagini e successivamente dall'esame citologico attraverso agoaspirazione eco guidata o prelievo di un campione bioptico renale.

L'esame citologico rappresenta il primo approccio diagnostico nelle neoplasie linfoidi dei carnivori domestici; i metodi di prelievo appaiono poco invasivi e spesso non è necessaria la sedazione dell'animale, è una tecnica rapida ed ha buona sensibilità e specificità ⁶.

Per l'esame citologico si effettua il prelievo con la tecnica dell'agoaspirazione o con aghi tru-cut da tessuti linfoidi o altri organi interessati dal processo neoplastico. I campioni sono asciugati all'aria e colorati con la colorazione May-Grünwald-Giemsa.

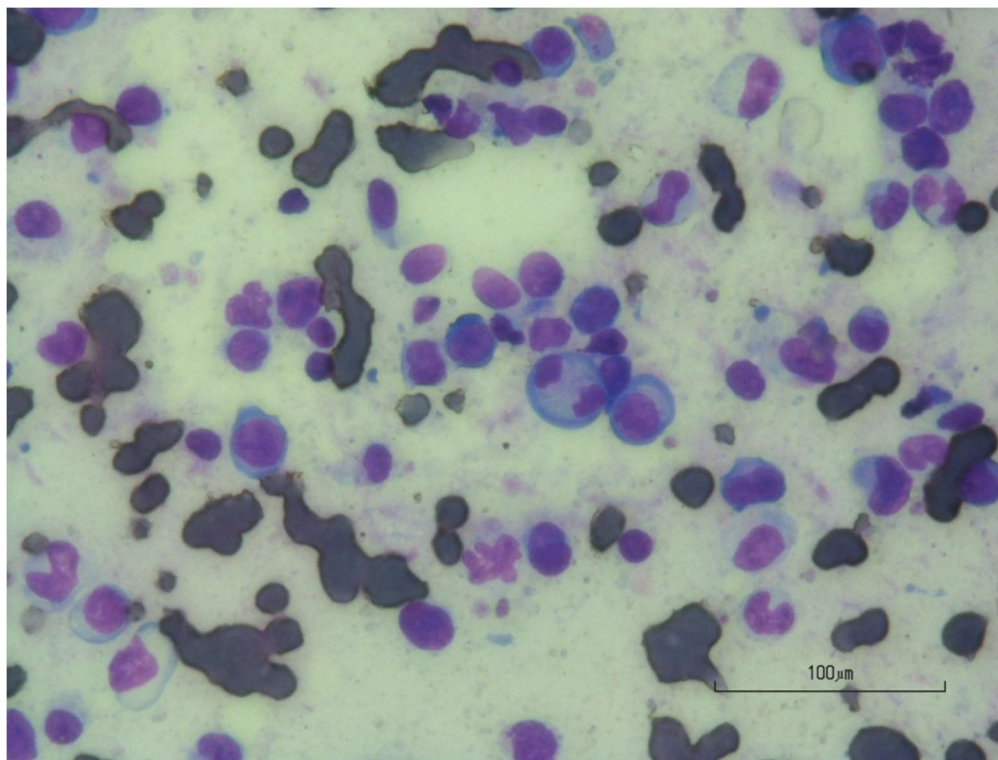
Attraverso l'analisi citologica si valuta:

- il volume cellulare (linfociti piccoli, medi o grandi), determinato da un confronto tra il nucleo delle cellule linfoidi e il diametro dei globuli rossi. I nuclei piccoli hanno diametro pari a quello di 1-1,5 globuli rossi, mentre i nuclei grandi hanno diametri uguali o più grandi del diametro di due globuli rossi;
- i dettagli morfologici del nucleo (rotondo, clivato, indentato, lobato); numero, dimensioni e distribuzione dei nucleoli; multipli, centrali o vicini alla membrana cellulare; aspetto

della cromatina (dispersa, reticolare, addensata)

- estensione del citoplasma (scarso o abbondante); basofilia e quantità di citoplasma; presenza di vacuoli o granuli citoplasmatici;
- rapporto nucleo-citoplasma;
- indice mitotico, parametro citocinetico in grado di fornire informazioni sulla malignità. Le figure mitotiche si contano in base al loro numero osservato per campo al microscopio con ingrandimento 100x; basso grado, una mitosi o meno per campo, grado intermedio 2-4 mitosi x campo; alto grado 5 o più mitosi per campo;
- presenza di tingibile body macrophages (aspetto a starry sky)⁵.

La diagnosi di certezza di linfoma è ottenuta mediante citologia e/o istologia e quando possibile con l'uso di tecniche come la citofluorimetria a flusso e la Polymerase Chain Reaction.



IMG.15: Linfoma renale- preparato per agoaspirazione eco guidata; presenza di elementi linfocitari di grandi dimensioni a morfologia immunoblastica. (100x MGG)

3. MATERIALI E METODI

Nel lavoro di tesi si sono valutati i quadri anatomopatologici prevalentemente necroscopici di gatti pervenuti all'Unità Operativa di Patologia Generale e Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università degli Studi di Parma, con sospetto clinico di patologie neoplastiche FeLV correlate.

Nel periodo 2012-2015 sono state eseguite nell'U.O oltre 250 necroscopie di gatti; 49 evidenziavano lesioni anatomopatologiche riferibili a linfoma e di questi 19 soggetti mostravano alterazioni macroscopiche indicative di linfoma renale.

Il linfoma renale sia primitivo sia secondario ad altre forme anatomiche di linfoma, è la lesione neoplastica renale più frequente nel gatto ¹⁹. In particolare la forma renale, a differenza del cane, si rileva in corso di linfomi multicentrici e mediastinici spesso correlati a positività al virus FeLV.

Con questo lavoro si sono approfondite le indagini istopatologiche e immunofenotipiche soprattutto su questa forma definita spesso extranodale o atipica di neoplasia linfoide, anche per la scarsa presenza di studi sulle caratteristiche morfologiche e fenotipiche del linfoma renale nel gatto.

Per ogni caso sono stati raccolti dati anamnestici quali età, razza, sesso, sintomi clinici, eventuale diagnosi citologica, esami ematologici ed ematochimici e la ricerca sierologica di patogeni virali quali FIV e FeLV.

I campioni tissutali provenienti prevalentemente da indagini necroscopiche sono stati fissati in formalina tamponata al 4%, inclusi in paraffina e le sezioni ottenute sono state colorate con Ematossilina-Eosina e con colorazioni immunoistochimiche.

Dopo la diagnosi istologica di linfoma renale, sono stati applicati marker per fenotipizzare le popolazioni linfocitarie neoplastiche (linfociti T o B) e per rilevare l'espressione antigenica tissutale di FeLV (gp70).

I processi linfoproliferativi renali sono stati classificati adottando gli schemi proposti dal Working Formulation (WF) del National Cancer Institute ³⁴ e dalla classificazione REAL-WHO in cui si prendono in esame oltre alla morfologia cellulare anche l'immunofenotipo (B/T, non B non T).

3.1. Anticorpi e protocollo di immunoistochimica

Per la caratterizzazione immunofenotipica sono stati utilizzati anticorpi monoclonali specie-specifici la cui reattività è stata valutata a livello internazionale (*Workshop* leucocitari) e che vengono utilizzati in numerosi lavori e nei laboratori di istopatologia per fenotipizzare le popolazioni linfocitarie del cane e del gatto. Questo ha permesso di raggiungere una nomenclatura comune dei diversi antigeni ed anticorpi. Ad ogni antigene è stato assegnato un *cluster* di differenziazione (CD). Attualmente sono riconosciuti oltre 100 CD utilizzati in campo umano, tuttavia solo pochi CD sono utilizzabili per l'immunofenotipizzazione delle popolazioni linfocitarie del gatto.

CD79

È una glicoproteina con peso molecolare di 32-33 kD, espressa come CD79 $\alpha\alpha$ (omodimero) oppure come CD79 $\alpha\beta$ (eterodimero). Appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline, sequenza ITAM nella coda citoplasmatica ed è presente sui linfociti B maturi e plasmacellule o in via di maturazione ed è necessaria per l'espressione di membrana e la trasduzione del segnale del complesso BCR (complesso multiproteico, espresso sulla superficie dei linfociti B, in grado di riconoscere e di trasdurre all'interno della cellula un segnale di attivazione. La sequenza del CD79a è conservata e può essere utilizzata in tessuti fissati. È utilizzato comunemente come *marker* di linfomi B e di plasmocitomi cutanei.

CD3

La molecola CD3, associata in modo non covalente al recettore TCR, è un complesso proteico monomorfo formato da almeno cinque catene polipeptidiche glicosilate (CD3 δ CD3 ϵ ; CD3 γ CD3 ϵ) fortemente legate tra loro da legami non covalenti. Appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline, sequenza ITAM nella coda citoplasmatica. A livello cellulare viene espressa unicamente nei linfociti T. Le unità componenti la molecola CD3 sembrano essere sintetizzate contemporaneamente ed espresse sulla membrana della cellula. Presenta funzioni di espressione di superficie e trasduzione del segnale del complesso TCR.

Gp70 (FeLV)

FeLV-gp85/70, Clone C11D8, 1:200 IgG2B Monoclonale Topo, (Custom Monoclonals Int., Sacramento, CA, U.S.A.) l'anticorpo riconosce la glicoproteina gp85/gp70 dell'envelope del virus della leucemia felina. L'anticorpo riconosce l'epitopo definito dagli aminoacidi 214-218 della gp70. È possibile il verificarsi di alcune cross-reattività con le sequenze MGPLL della proteina di membrana p15 di FeLV.

PROTOCOLLO

L'indagine immunohistochimica per fenotipizzare le popolazioni linfocitarie e valutare l'espressione della proteina gp70, ha seguito il seguente protocollo:

- sparaffinatura e reidratazione delle sezioni, seguendo una scala decrescente di alcoli fino all'acqua distillata;
- trattamento termico delle sezioni istologiche al forno a microonde (3 cicli di 5 minuti a 400W) previa immersione in tampone citrato, 10mM, pH 6 e in tampone EDTA a pH 9, per smascherare i siti antigenici altrimenti non accessibili agli anticorpi dopo fissazione in formalina;
- raffreddamento delle sezioni per 20 minuti in bagno d'acqua fredda;
- lavaggi in DW;
- lavaggi in tampone PBS pH 7,4;
- inibizione delle perossidasi endogene con H₂O₂ al 3% in PBS pH 7.4 per 12 minuti;
- lavaggi in tampone PBS pH 7.4;
- incubazione per un'ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi primari: Mouse anti-Human CD79 α clone HM57 (Diagnostic BioSystem Pleasantome CAL 1: 60); Mouse anti-Human CD3epsilon (1:100) clone 7-2-38 ricostituiti in BSA (1:100 DAKO Glostrup, Germany); Mouse anti Gp70 (FeLV), clone C11D8 (Custom Monoclonals Int., Sacramento, CA, U.S.A 1:200) ricostituito in BSA;

- lavaggi in PBS per eliminare l'eccesso di Ab primario;
- anticorpo secondario;
- applicazione del sistema di rivelazione Avidina-Biotina-Perossidasi (ABC, Vector);
- lavaggi in tampone PBS pH 7,4;
- applicazione della soluzione cromogena DAB (DAKO) per 2-3 minuti;
- lavaggio in DW;
- controcolorazione con ematossilina di Mayer per 3 minuti;
- lavaggio in H₂O di fonte;
- disidratazione con scala ascendente alcoli (70%, 90%,100%);
- chiarificazione in xilene;
- montaggio con balsamo (Biomount, Bio-Optica).

	CD79 a	CD3	Gp70 (FeLV)
Produttore	Diagnostic BioSystem	Diagnostic BioSystem	Custom monoclonals international
Tampone	Tampone citrato pH 6±0,2	Tampone citrato pH 6±0,2	Tampone citrato pH 6±0,2
Smascheramento antigene	3 cicli di 5' 400Watt MW	3 cicli di 5' 400Watt MW	3 cicli di 5' 400Watt MW
Blocco delle perossidasi	3% H2O2 in acqua distillata 12'	3% H2O2 in acqua distillata 12'	3% H2O2 in acqua distillata 12'
Anticorpo primario	-Ab monoclonale - Mouse -Diluizione 1:60	-Ab monoclonale - Mouse -Diluizione 1:100	-Ab monoclonale - Mouse -Diluizione 1:200
Incubazione	1 ora temperatura ambiente	1 ora temperatura ambiente	1 ora temperatura ambiente
Anticorpo secondario+ ABC	Ab anti-mouse-biotinilato ABC	Ab anti-mouse biotinilato ABC	Ab anti-mouse biotinilato ABC

Per provare la specificità del risultato tutte le colorazioni hanno previsto l'introduzione di controlli negativi (eliminando la sequenza dell'anticorpo primario) e quando possibile di controlli positivi (realizzati utilizzando campioni tissutali sicuramente positivi per l'antigene in esame).

I preparati istologici e immunoistochimici sono stati esaminati con un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon Corporation, Japan) utilizzando obiettivi Nikon PLAN APO.

Le sezioni immunoistochimiche sono state osservate e fotografate a 10x, 20 e 40x (obiettivi Nikon PLAN APO) con una Camera DIGITAL SIGHT DS-Fi1 (Nikon Corporation, Made in Japan); le immagini sono state acquisite con una DS Camera Control Unit DS-L2 (Nikon Corporation, Japan) e trasferite in una USB drive. La valutazione della positività alla colorazione immunoistochimica è stata effettuata utilizzando una valutazione semi-quantitativa o qualitativa.

CD79a e CD3: è stata valutata la positività attraverso una valutazione semi quantitativa-qualitativa degli elementi linfocitari che presentano un'immunocolorazione citoplasmatica e di membrana, segni di reattività aspecifica sono stati considerati negativi.

Gp70 (FeLV): è stata effettuata una valutazione semi quantitativa-qualitativa degli elementi cellulari con immunocolorazione della membrana cellulare.

3.2 Analisi statistica

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati due test diversi:

- Test esatto di Fischer (Test esatto del chi) per valutare l'eventuale correlazione tra localizzazione renale, età e sesso.
- Indice di correlazione di Pearson per valutare la correlazione tra espressione di CD3 e gp70.

4. RISULTATI

La popolazione felina presa in considerazione nel nostro studio si compone di 49 gatti in cui si sono evidenziate lesioni macroscopiche ed istopatologiche di linfoma; in 47 casi i campioni tissutali sono stati prelevati in sede necroscopica e in 2 casi da prelievi bioptici renali. La popolazione felina è rappresentata dal 14,3% (7/49) di animali giovani (0-2 anni), dal 53,1% (26/49) di animali adulti (2-10 anni) e dal 32,6% (16/49) di animali anziani (>10 anni).

I maschi rappresentano il 59,2% (29/49) mentre le femmine il 40,8% (20/49) della popolazione felina.

Le razze sono rappresentate in maggioranza da gatti meticci europei a pelo corto e lungo, eccetto un gatto norvegese.

Il 39% dei casi (19/49) sono caratterizzati dalla presenza di lesioni linfomatose a livello renale. Questa popolazione è costituita dal 52,6% (10/19) di gatti maschi e dal 47,4% (9/19) di femmine.

L'età è compresa tra 8 mesi e 17 anni ed in particolare il 26,6% (5/19) sono giovani (0-2 anni), il 47,4% (9/19) sono adulti (2-10 anni) e il 26,6% (5/19) sono anziani (>10 anni).

Per quanto riguarda la forma anatomica la forma renale appare primitiva in 5/19 casi (26,6%), in 9/19 casi (47,4%) si presenta secondaria a linfomi multicentrici, in 2/19 casi (10,5%) a linfomi mediastinici e in altri 3/19 casi (15,7%) a linfomi gastrici e intestinali.

Non si è osservata significatività statistica al Test Chi quadrato di Fischer per le correlazioni tra le diverse localizzazioni anatomiche, l'età ed il sesso della popolazione felina presa in esame.

Macroscopicamente si è osservato un coinvolgimento renale bilaterale e l'infiltrazione neoplastica si è presentata in forma diffusa, con superficie renale granulosa e di colore biancastro, o in forma focale, con lesioni nodulari di colore bianco-grigiastro e di diverse dimensioni, sporgenti sulla superficie esterna del rene. In sezione sia le lesioni diffuse sia quelle a carattere focale interessavano soprattutto la corticale del rene.

L'esame istopatologico delle lesioni renali ha permesso di differenziare i quadri di infiltrazione linfocitaria neoplastica da fenomeni di infiammazione renale interstiziale o piogranulomatosa correlati sia all'infezione da FeLV o FIV sia alla peritonite infettiva felina (FIP).

Le caratteristiche anatomiche, morfologiche e immunofenotipiche dei 19 linfomi renali in esame sono riassunti nella tabella n. 2 del Capitolo 4.

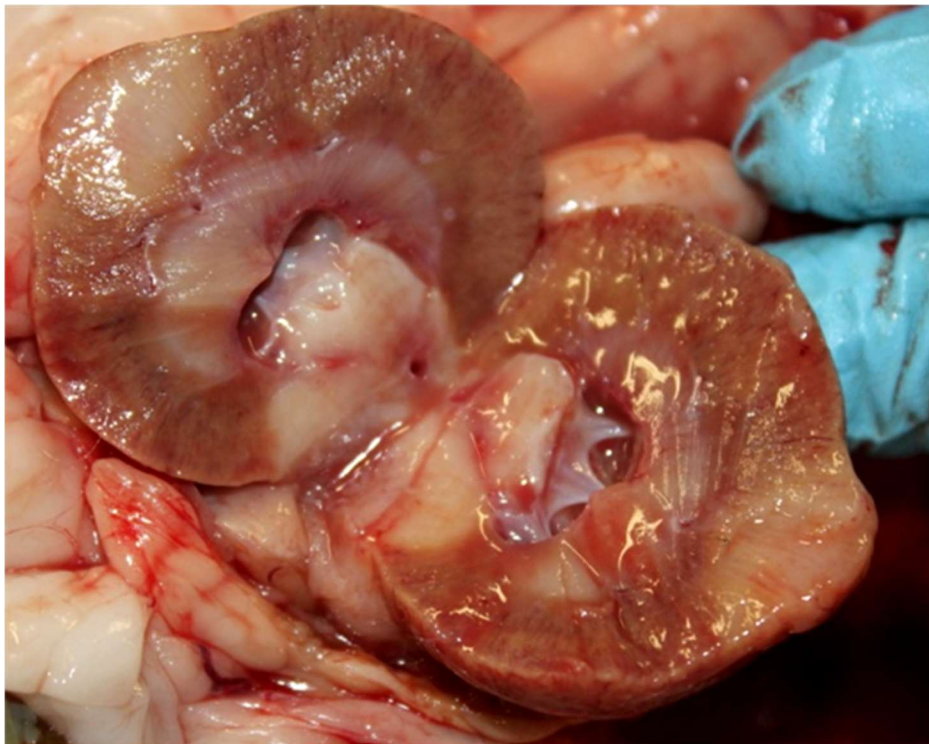
Per quanto riguarda la morfologia dei linfociti neoplastici nel 26,3% (5/19) dei casi si rileva una popolazione di linfociti di grandi dimensioni con nucleo rotondo vescicoloso e grande nucleolo centrale assimilabili ad immunoblasti, in cui si osserva anche un indice mitotico medio-alto; il 36,8% (7/19) dei casi sono caratterizzati da elementi neoplastici di medie /grandi dimensioni con nucleo inciso o non inciso; i restanti casi, 47,3% (9/12), mostrano una popolazione linfocitaria pleomorfa di piccole/medie

dimensioni, con nucleo inciso o non inciso ed indice mitotico basso o medio.

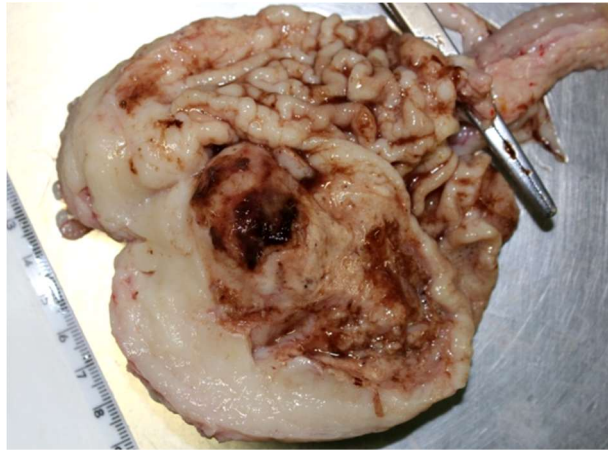
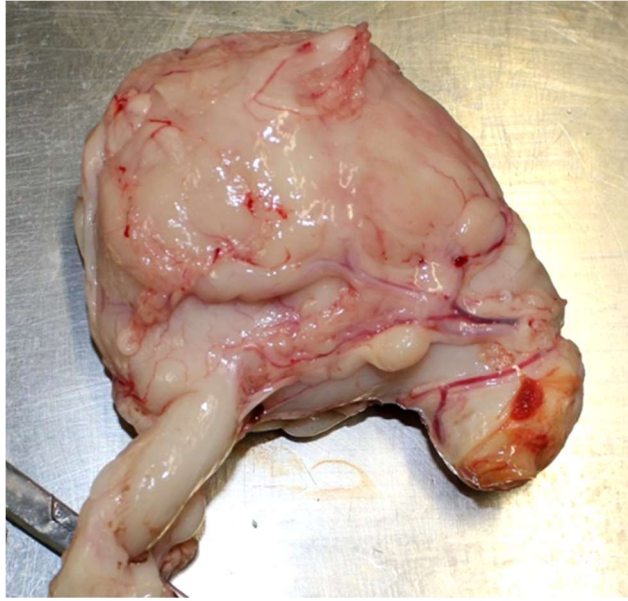
In un caso si sono osservati frammisti alle cellule linfoidi neoplastiche elementi plurinucleati gigantocellulari, mentre in un linfoma renale secondario ad un linfoma gastrico, si sono rilevati elementi gigantocellulari e un aspetto a “starry sky” per la presenza di numerosi macrofagi (nec 161/2014).

I linfomi renali immunoblastici hanno evidenziato un elevato indice mitotico, fenomeni di necrosi ed un comportamento biologico ad alto grado di malignità.

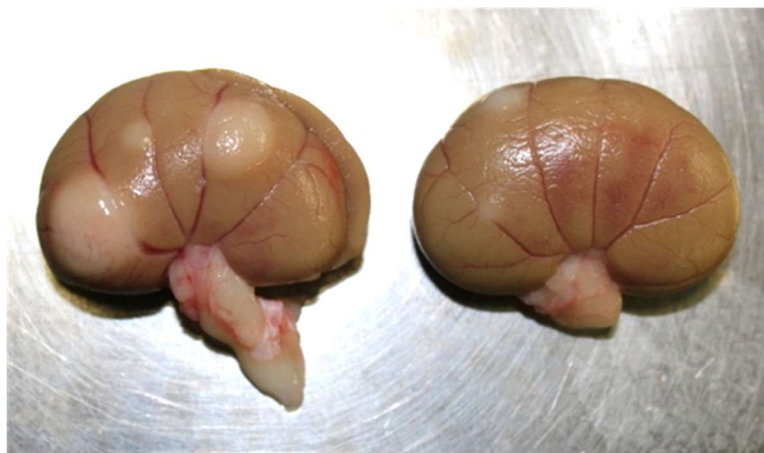
Le colorazioni immunoistochimiche hanno evidenziato una prevalenza dei linfomi a cellule T: sono risultati CD3 positivi il 73,7% (14/19) dei casi e CD3 negativi il restante 27,3% (5/19) con colorazione prevalentemente della membrana cellulare; hanno espresso positività citoplasmatica all’immunocolorazione per il marker CD79alpha il 26,3% (5/19) dei campioni di linfoma renale e appaiono CD79alpha negativi il 73,7% (14/19); l’espressione della proteina gp70 è stata rilevata nel 78,9% (15/19) dei linfomi, mentre il 21,1% (4/19) dei casi appare negativo.



IMG.16-17: Linfoma renale primario. Presenza di lesioni nodulari che infiltrano prevalentemente la corticale renale (Nec 104/2013)



IMG.18-19: linfoma gastrico- lo stomaco appare megalico, di colore biancastro con la parete diffusamente ispessita; all'apertura la mucosa presenta un aspetto cerebroide e lardaceo ed appare ulcerata



IMG.20: coinvolgimento renale nel corso di linfoma gastrico. Sulla superficie renale si evidenziano alcune formazioni nodulari bianco-grigiastre. (nec 161/2014)

6. DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Nel nostro studio si evidenzia un'elevata percentuale di linfomi renali sul numero totale dei casi di linfoma rilevati nel periodo 2012-2015 nell'U.O. di Anatomia Patologica e Patologia Veterinaria dell'Università degli studi di Parma.

La forma renale appare primitiva in 5/19 casi (26,6%), in 9/19 casi (47,4%) si presenta secondaria a linfomi multicentrici, in 2/19 casi (10,5%) a linfomi mediastinici e in altri 3/19 casi (15,7%) a linfomi gastrici e intestinali e questi dati concordano con quanto riportato nei lavori bibliografici. In uno studio su 118 casi di linfoma felino si sono evidenziati 36 linfomi (31%) con interessamento renale bilaterale: in 6 casi si rilevano linfomi renali primitivi, in 13 casi il linfoma renale si presenta associato a lesioni dell'apparato gastroenterico, in 17 casi si osserva il coinvolgimento del rene e di più organi contenuti nella cavità addominale e toracica.

Anche se non emergono correlazioni statistiche tra linfoma renale, età e sesso, si evidenzia nel nostro lavoro come la forma renale si presenti soprattutto nei gatti adulti o anziani (> 70%) e nel 73,7 % dei casi mostri un fenotipo T con elevata espressione del marker CD 3. Questi riscontri concordano con i dati rilevati in letteratura.

Nel 79,8% dei casi si osserva anche l'espressione dell'antigene gp70 (FeLV), questo risultato permette di supporre che i linfociti neoplastici siano infettati dal virus FeLV, il quale inoltre è in attiva replicazione. Questo dato contrasta con numerosi lavori internazionali in cui si sottolinea come nell'era post-vaccinazione la maggior parte dei linfomi diagnosticati nella pratica clinica non siano

associati a Retrovirus. Bibliograficamente viene riportata una diminuzione dell'incidenza di soggetti FeLV positivi con conseguente riduzione dei linfomi FeLV associati ed un 'aumento dell'incidenza dei linfomi non associati a Retrovirus. Indagini molecolari quali PCR hanno evidenziato come gatti affetti da linfoma, ma sierologicamente negativi per FeLV, siano positivi alla ricerca del DNA provirale, introducendo nuove ipotesi patogenetiche quali infezioni latenti, infezioni non produttive o incompleto assemblamento virale ^{32; 50}. L'impatto della sola presenza del provirus senza riscontro antigenico è fortemente dibattuto e sembrerebbe che le proteine virali possano essere presenti negli stadi iniziali di linfoma senza essere poi riscontrabili in stadi avanzati della patologia.

Applicando l'indice di correlazione di Pearson si è evidenziata una forte correlazione statistica ($P < 0,0001$) tra l'espressione da parte delle cellule neoplastiche del recettore CD3 (tipico della sottopopolazione linfocitaria T) e l'espressione di gp70. Ciò permette di affermare che in un contesto renale linfomatoso l'espansione clonale neoplastica caratterizzata dal recettore tipico della sottopopolazione T è correlata alla presenza del virus all'interno delle cellule; inoltre il virus è in attiva replicazione, poiché l'espressione di una proteina dell'envelope, gp70, all'interno delle cellule neoplastiche è associata all'assemblaggio dei nuovi virioni che gemmeranno per infettare nuove cellule.

Indipendentemente dall'associazione virale, il lavoro evidenzia un sostanziale aumento dell'incidenza di linfomi nella specie felina e le spiegazioni possibili per questo aumento sono due:

- L'aumento delle aspettative di vita del gatto, che rispetto ai dati delle prime pubblicazioni è drasticamente aumentata, con conseguente aumento della prevalenza di casi di linfoma, comune negli animali in età adulto-anziana (età media 11 anni).
- Maggiore attenzione da parte dei proprietari alla cura degli animali da compagnia e propensione al trattamento di patologie neoplastiche, che determinano il riscontro di una maggiore incidenza di neoplasie da parte dei medici veterinari.

7. TABELLE e GRAFICI

	FEGATO	MILZA	RENE	SNC	ALIM	MEDIAS	LN	ETA'	SESSO	RAZZA	FeLV ELISA
2011											
NEC 190-11	X		X					8 m	F	EUROPEO	Nt
2012											
NEC 5-12	X	X						10 AA	FS	EUROPEO	Nt
NEC 16-12	X	X						12 AA	FS	EUROPEO	+
NEC 29-12	X							ADULTO	F	EUROPEO	-
NEC 43-12	X	X	X			X	X	ADULTO	MC	EUROPEO	+
NEC 113-12	X	X					X	ADULTO	MC	EUROPEO	+
NEC 133-12			X			X		ADULTO	MC	EUROPEO	Nt
NEC 136-12					X			ADULTO	MC	EUROPEO	+
NEC 141-12							X	7 AA	F	EUROPEO	Nt
NEC 184-12	X	X					X	2 AA	MC	SIAMESE	+
NEC 200-12					X			3 AA	MC	EUROPEO	+
NEC 231-12					X			ADULTO	MC	EUROPEO	-
NEC 171-12							X	ANZIANO	M	EUROPEO	FIV+
NEC 176-12						X		11 AA	F	EUROPEO	Nt
2013											
NEC 12-13							X	ADULTO	FS	EUROPEO	Nt
NEC 20-13			X					ADULTO	MC	EUROPEO	+
NEC 42-13	X	X					X	ANZIANO	FS	EUROPEO	Nt
NEC 65-13					X			12 AA	MC	EUROPEO	Nt
NEC 104-13			X					16 AA	MC	NORVEGESE	Nt
NEC 112-13							X	14 AA	MC	EUROPEO	Nt
NEC 127-13				X				4 AA	MC	EUROPEO	Nt
2014											
NEC 48-14				X				ADULTO	MC	EUROPEO	Nt
NEC 70-14	X	X						8 AA	MC	EUROPEO	Nt
NEC 110-14	X	X	X					10 MM	F	EUROPEO	Nt
NEC 161-14			X		X			ADULTO	FS	EUROPEO	Nt
NEC 166-14		X	X					ADULTO	MC	EUROPEO	+
NEC 159-14							X	6 AA	MC	EUROPEO	+
NEC 3-14	X	X					X	6 AA	M	EUROPEO	-
NEC 101-14	X	X					X	14 AA	M	EUROPEO	Nt
NEC 43-14						X		ADULTO	F	EUROPEO	Nt
2015											
NEC 4-15	X						X	7 AA	FS	EUROPEO	Nt
NEC 24-15					X			13 AA	MC	EUROPEO	Nt
NEC 31-15	X		X					18 MM	FS	EUROPEO	+

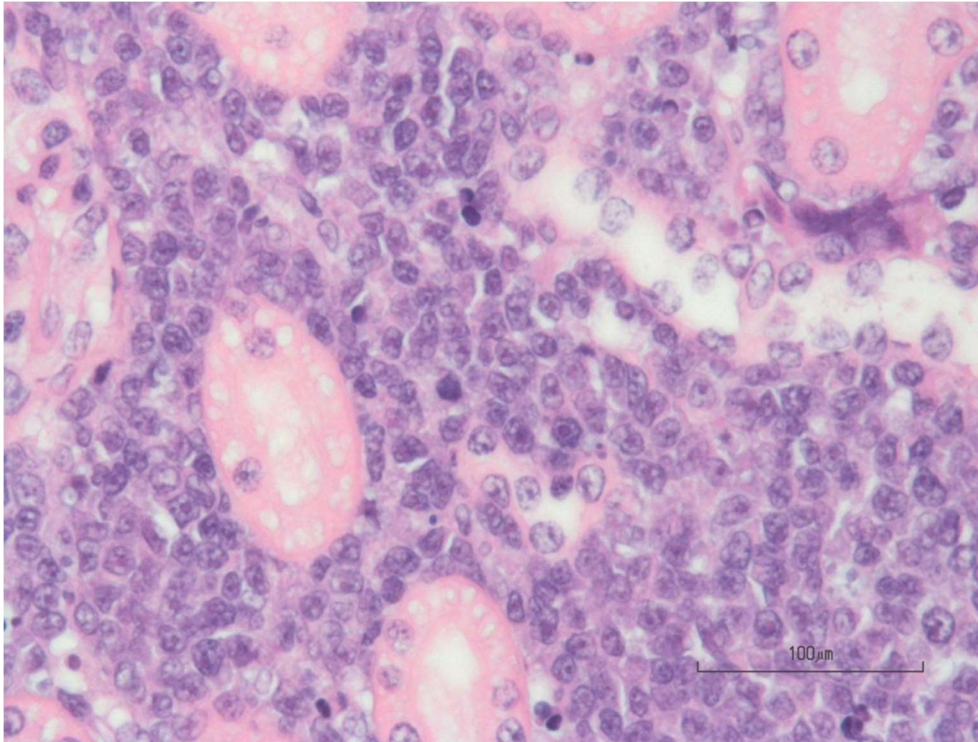
NEC 37-15			X			X		16 AA	FS	EUROPEO	Nt
NEC 46-15			X			X		9 AA	MC	EUROPEO	Nt
NEC 76-15							X	13 AA	F	EUROPEO	Nt
NEC 90-15			X			X		18 MM	M	EUROPEO	+
NEC 94-15	X	X						ANZIANO	MC	EUROPEO	Nt
NEC 114-15							X	2 AA	FS	EUROPEO	+
NEC 122-15			X		X			17 AA	MC	EUROPEO	+
NEC 134-15						X	X	2 AA	F	EUROPEO	Nt
NEC 158-15			X					10 AA	FS	EUROPEO	+
NEC 162-15						X		15 AA	FS	EUROPEO	Nt
NEC 166-15			X		X	X		2 AA	MC	EUROPEO	+
NEC 167-15	X	X	X					2,5 AA	MC	EUROPEO	+
NEC 202-15					X			15 AA	MC	EUROPEO	Nt
IST 319-15	X		X					15 AA	MC	EUROPEO	+
IST 361-15			X					5 AA	F	EUROPEO	-
NEC 120-15			X					10 AA	FS	EUROPEO	FeLV+

TAB. 1: Casi di linfoma nel gatto dal 2012 al 2015, sono riportati la localizzazione anatomica delle lesioni neoplastiche, l'età, il sesso, la razza ed i risultati del test ELISA per FeLV.

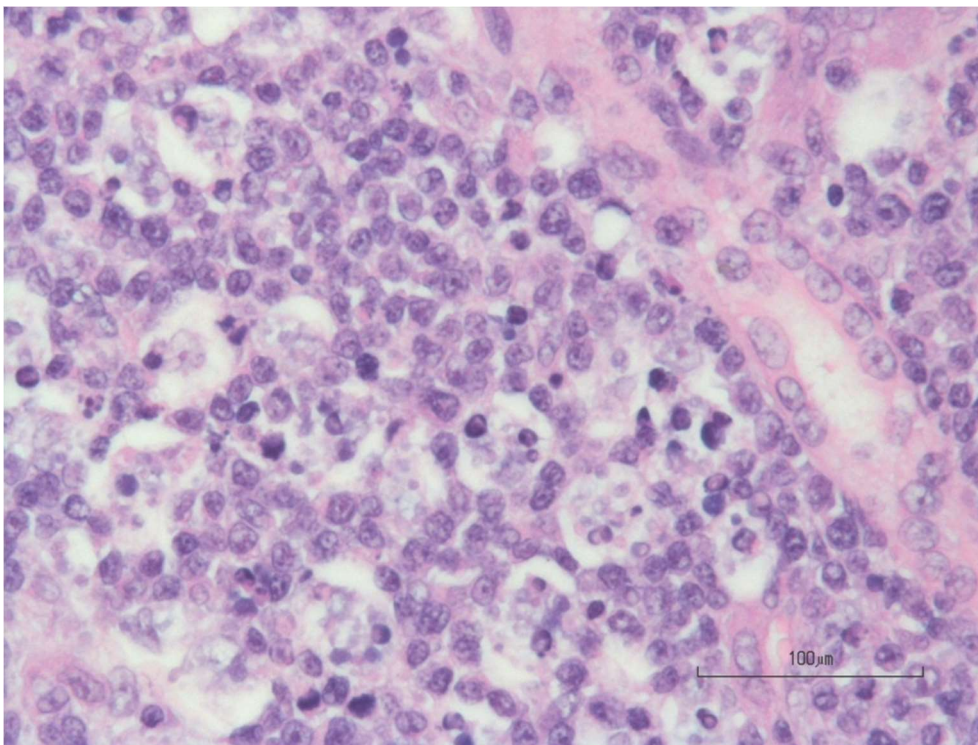
N°	ETÀ	SESSO	CLASSIFICAZIONE ANATOMICA	MORFOLOGIA CELLULARE	CD3	CD79	GP70	FELV ELISA	NEC
1	8 m	FS	Multicentrico/Renale	L piccoli/ medi linfociti	++	-	+	Nt	190-11
2	12a	MC	Mediastinico/ renale	L.medi/grandi linfociti	+-	+	+	Nt	133-12
3	Adulto	MC	Renale	L. piccolo linfociti incisi	+	+-	+	+	20-13
4	16a	MC	Renale	L.medi/grandi linfociti incisi	++	-	+	Nt	104-13
5	Adulto	F	Multicentrico/renale	L. piccoli/medi	++	-	+	+	43-12
6	10m	F	Multicentrico/renale	L. medi/grandi	++	-	+	Nt	110-14
7	Adulto	FS	Gastrico/ renale	L.medi/grandi linfociti incisi	++	-	+	Nt	161-14
8	Adulto	MC	Multicentrico/ renale	L. medi/grandi linfociti incisi	+	-	+	+	166-14
9	18m	FS	Multicentrico/renale	L. immunoblastico	-	++	+	+	31-15
10	16a	FS	Multicentrico/renale	L piccole /medie cellule	-	+	-	Nt	37-15
11	9a	MC	Multicentrico/renale	L.immunoblastico	++	-	+-	Nt	46-15
12	10a	FS	Renale	L.piccoli/grandi linfociti	++	+-	+	+	158-15
13	2a	MC	Alimentare/renale	L. medi/grandi linfociti	++	+-	+	+	166-15
14	2.5a	MC	Multicentrico/renale	L.piccoli/medi linfociti	++	+-	+	+	167-15
15	15a	MC	Multicentrico/renale	L.immunoblastico	++	-	+	+	319-15
16	5a	FS	Renale	L.immunoblastico	++	-	+	Nt	361-15
17	17a	MC	Alimentare/renale	L.piccoli/grandi linfociti incisi	-	+	-	+	122-15
18	10a	FS	renale	L. medi/grandi	++	+-	+	Nt	120-15
19	18m	M	Mediastinico/renale	L. immunoblastico	+	++	+	+	90-15

TAB. 2: Casi di linfoma renale, classificati secondo la localizzazione anatomica, la morfologia cellulare, l'immunofenotipo, l'espressione di gp70 e il risultato al test ELISA per FelV.

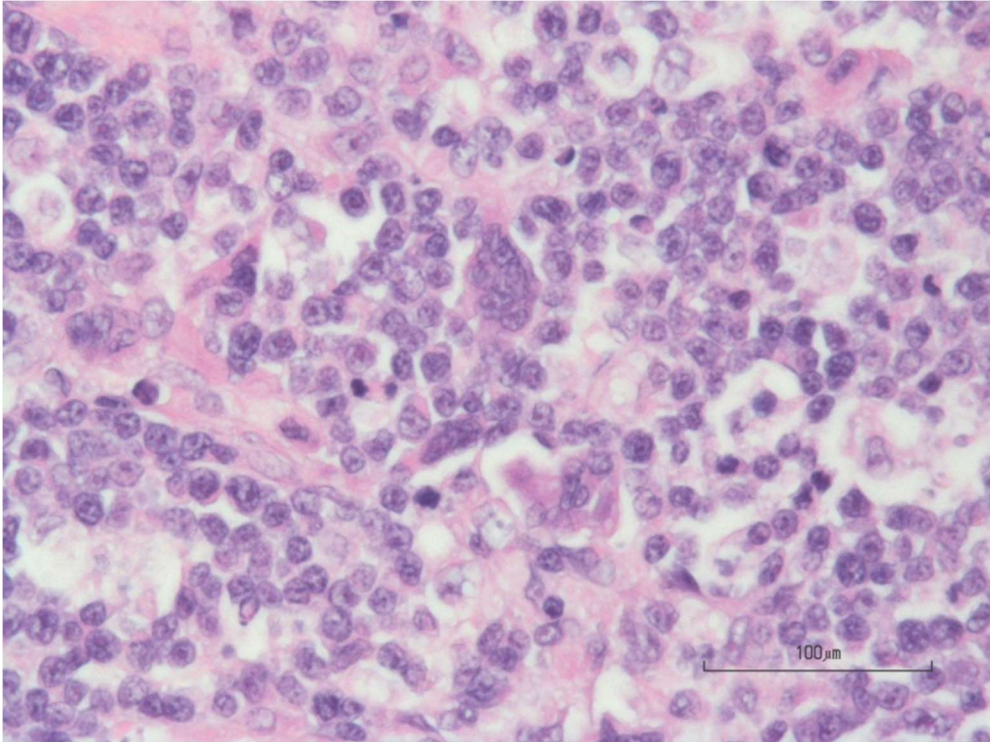
8. IMMAGINI



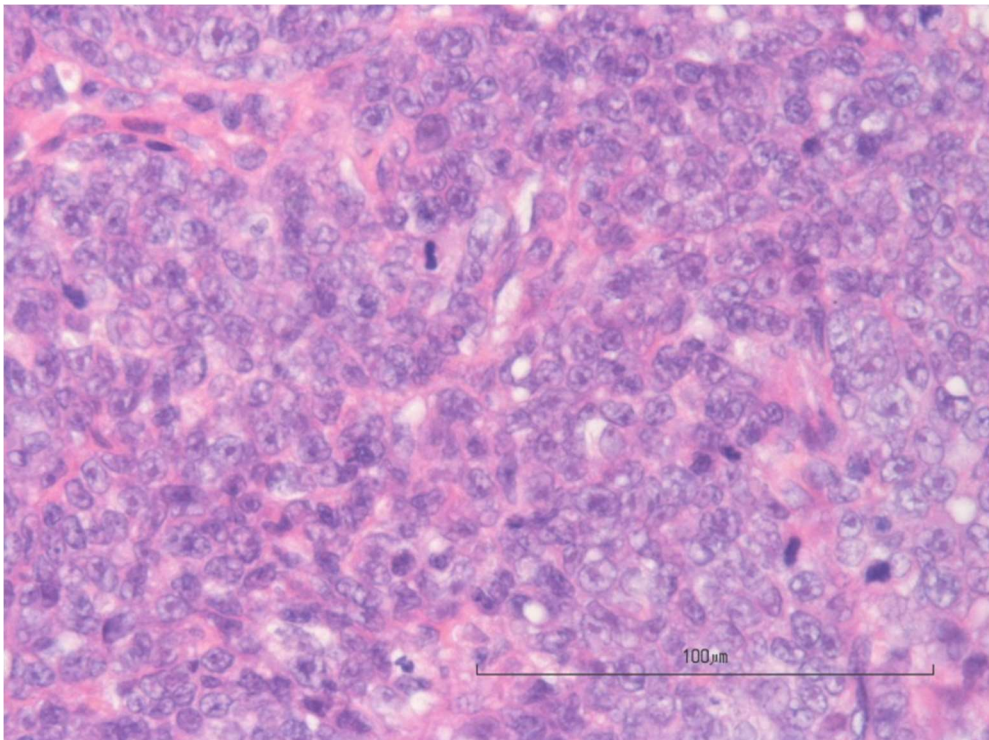
IMG. 21: Linfoma renale a medie/grandi cellule. 40X EE (nec 161-14)



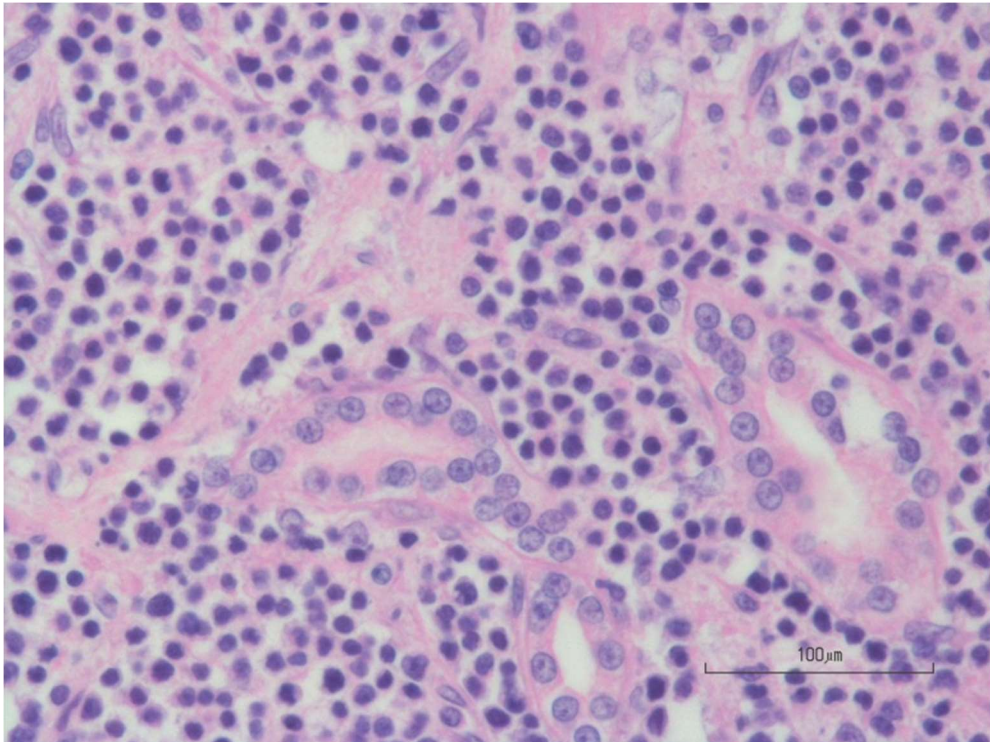
IMG.22: Linfoma renale. a medie/grandi cellule con nucleo vescicoso. La presenza di macrofagi che fagocitano detriti nucleari determina un aspetto a "cielo stellato". 40X EE (nec 161-14)



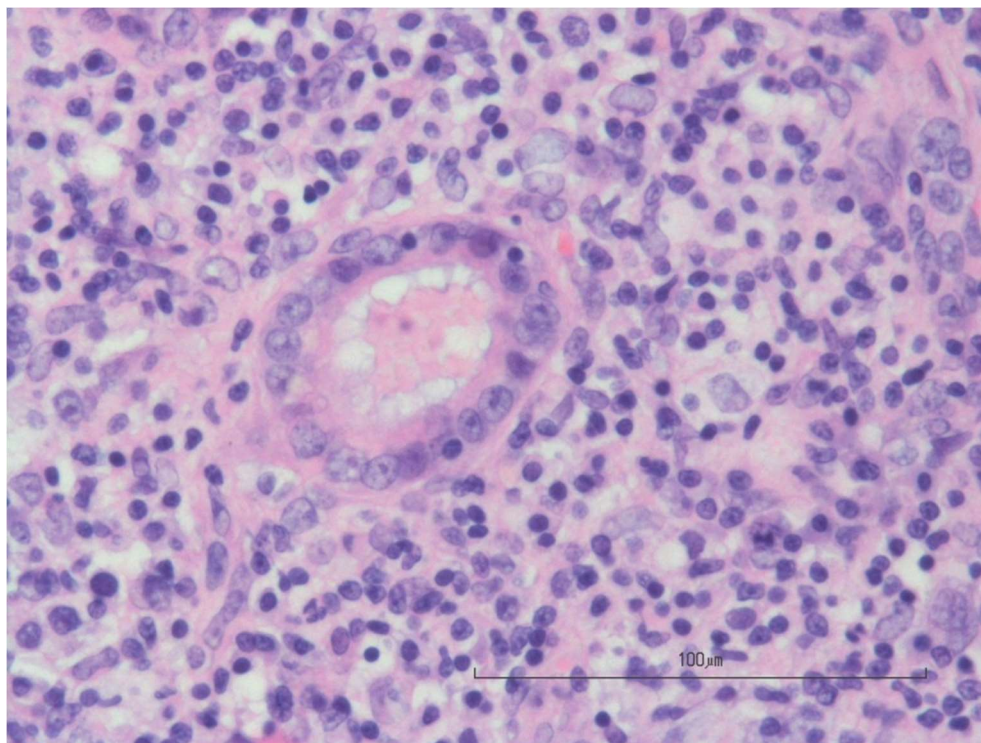
IMG. 23: Linfoma renale a medie/grandi cellule, presenza di diversi elementi giganti plurinucleati. 40X EE (nec 161-14)



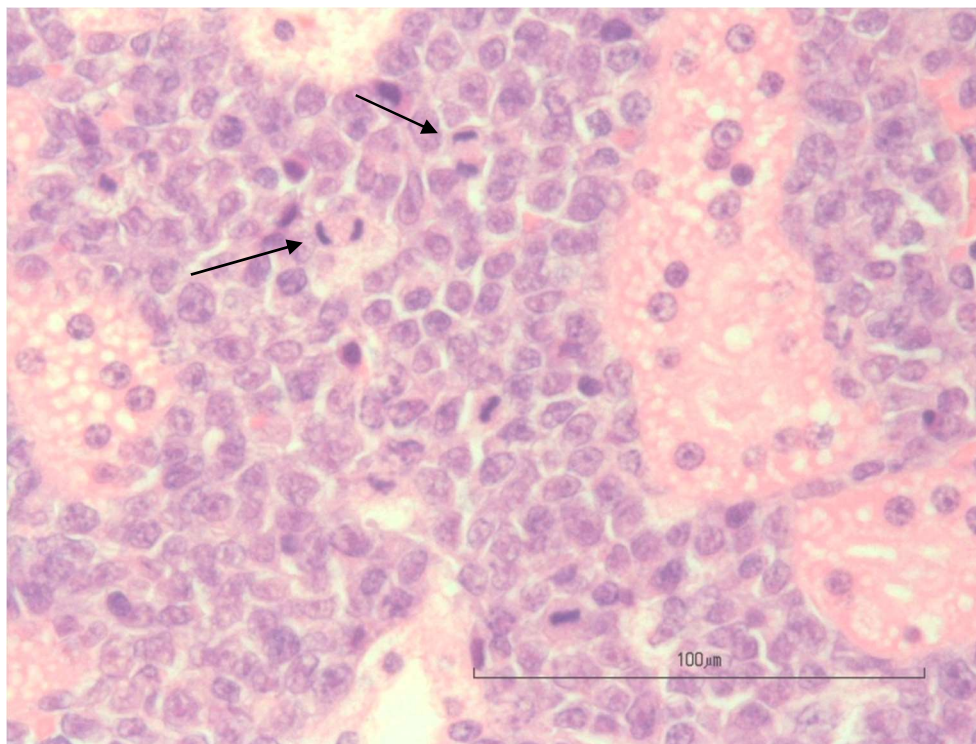
IMG. 24: Linfoma renale immunoblastico, ad elevato indice mitotico. 40x EE (nec 361-15)



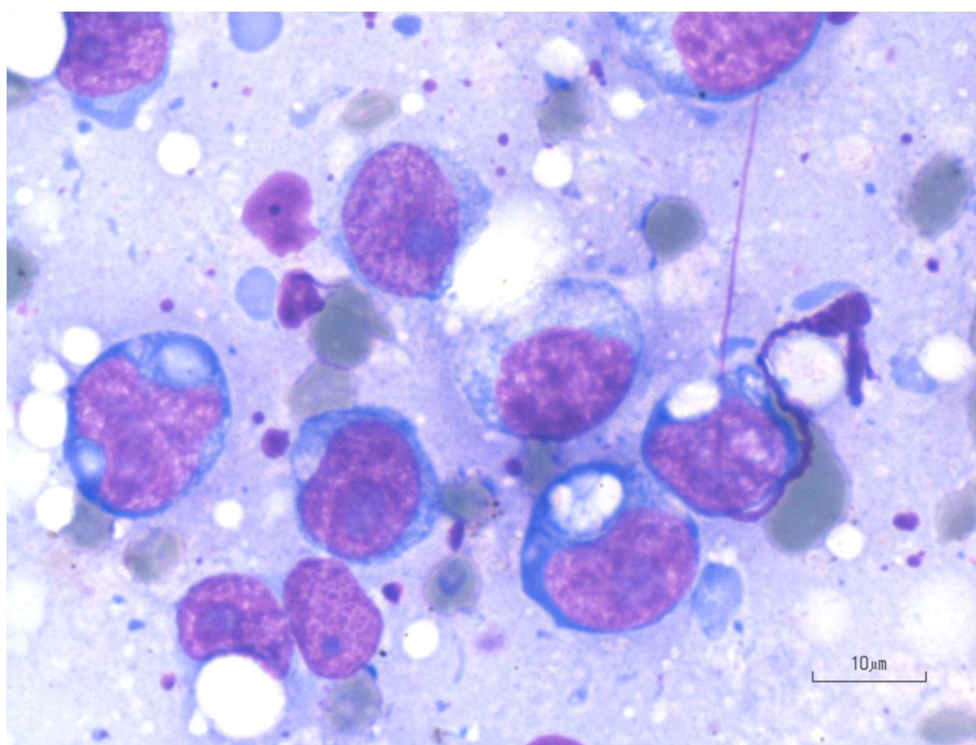
IMG.25: Linfoma renale a piccole/medie cellule con cromatina addensata e scarso citoplasma. IM basso. 40X EE (nec 20-13)



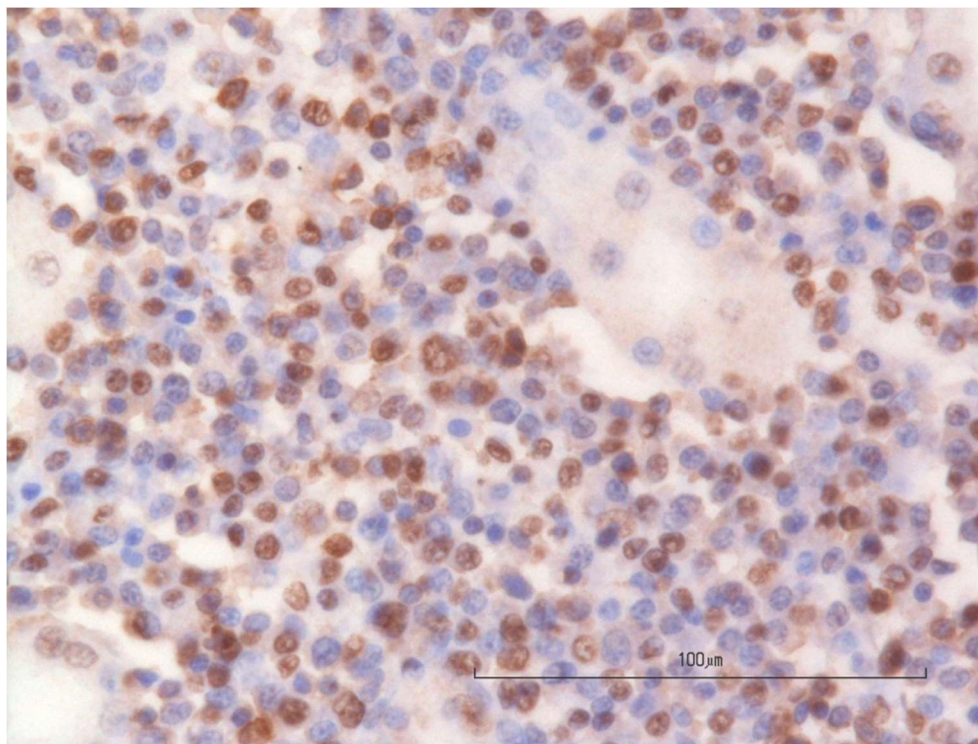
IMG. 26: Linfoma renale a piccole/grandi cellule. 40X EE (nec 122-15)



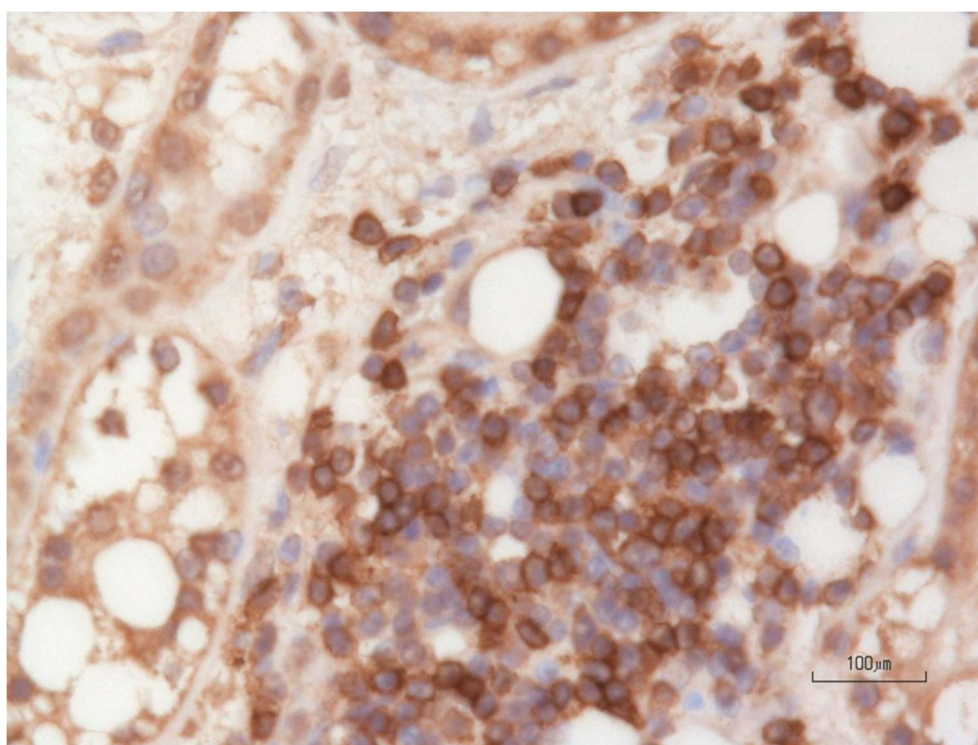
IMG.27: Linfoma renale a grandi cellule immunoblastiche con nucleo inciso, nucleolo centrale ed elevato indice mitotico. 40X EE (nec 31-15)



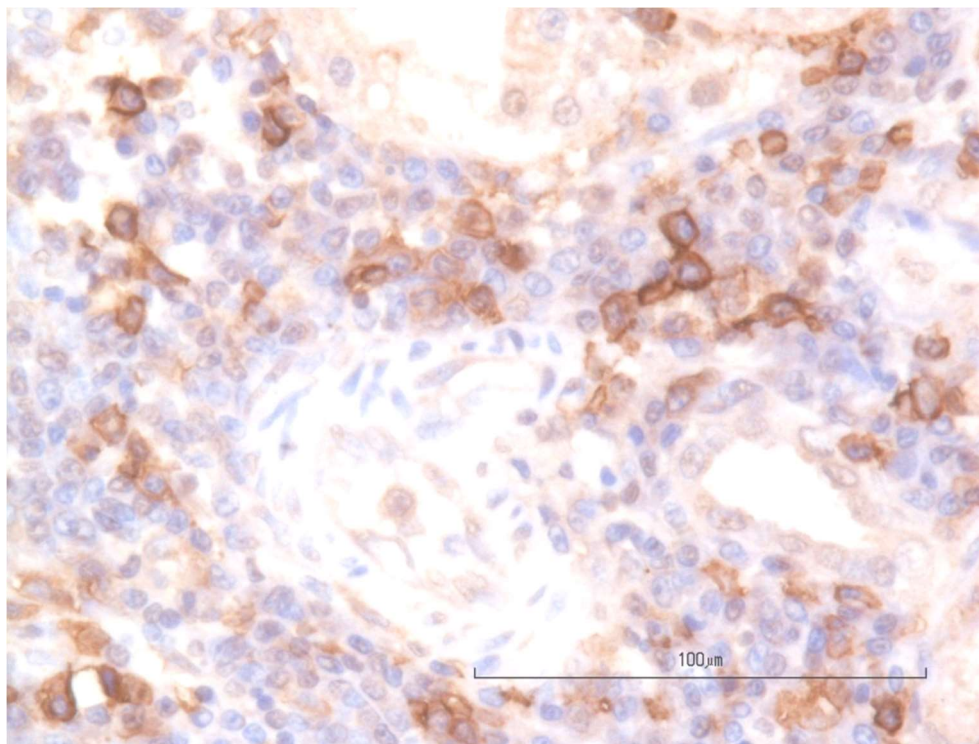
IMG. 28: Linfoma renale immunoblastico, preparato citologico per agoaspirazione. Si osservano elementi linfocitari di grandi dimensioni con uno o più nucleoli prominenti e nucleo inciso, il citoplasma intensamente basofilo presenta dei macrovacuoli. 100X MGG (isto 319-15)



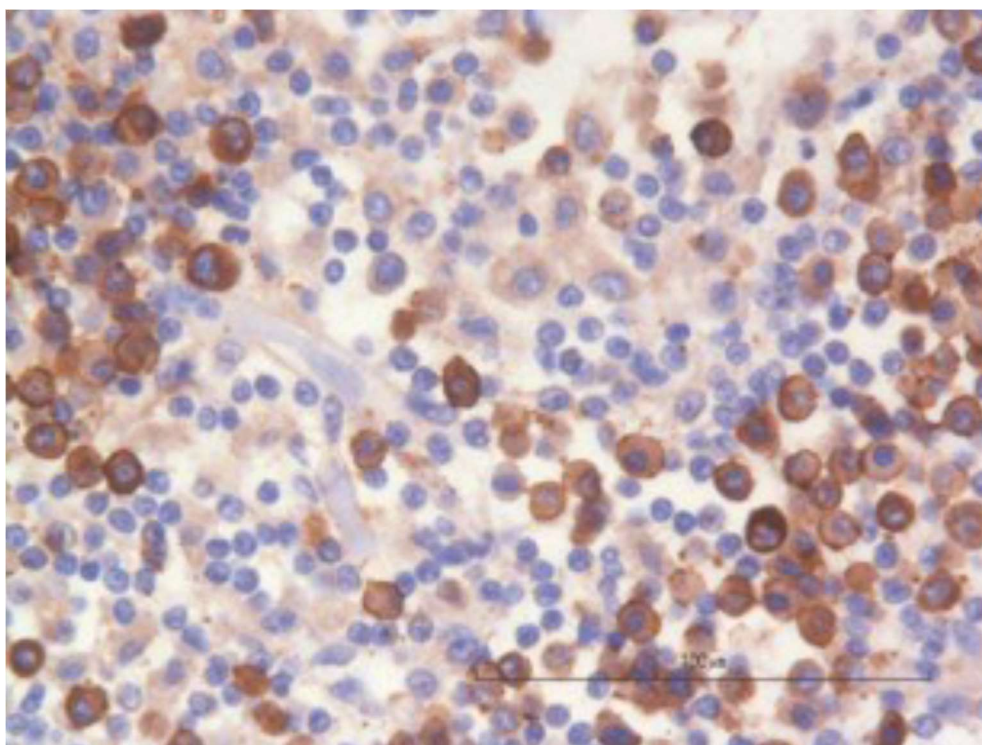
IMG.29: linfoma a piccole-medie cellule; si rileva la positività al CD3 nel 50% delle cellule neoplastiche. 40x IHC CD3 (nec 190-11)



IMG. 30: linfoma a medie/grandi cellule
Si evidenzia la positività al CD3 nel 70% circa delle cellule neoplastiche.
40x IHC CD3 (nec 167-15)



IMG.31: Linfoma renale. Espressione di gp70 (FeLV) nelle cellule linfocitarie neoplastiche. 40x IHC gp70 (nec 161-14)



IMG.32: Linfoma renale. Espressione di gp70 (FeLV) nelle cellule linfocitarie neoplastiche. 40x IHC gp70 (nec 158-15)

BIBLIOGRAFIA

1. Amati M, Venco L, Roccabianca P, Santagostino SF, Bertazzolo W. Pericardial lymphoma in seven cats. *J Feline Med Surg* (2014) 16(6): 507-512.
2. Bertone ER, Snyder LA, Moore AS. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *Am J Epidemiol* (2002) 156: 268-273.
3. Brown MR, Rogers KS, Mansell KJ, et al. Primary intratracheal lymphosarcoma in four cats. *J Am Anim Hosp Assoc* (2003) 39:468-472.
4. Carreas JK, Goldschmidt M, Lamb M, et al. Feline epitheliotropic intestinal malignant lymphoma: 10 cases (1997–2000). *J Vet Intern Med* (2003) 17: 326-331.
5. Chino J, Fujino Y, Kobayashi T, Kariya K, Goto-Koshino Y, Ohno K, Nakayama H, Tsujimoto H. Cytomorphological and Immunological Classification of Feline Lymphomas: Clinicopathological Features of 76 Cases. *J Vet Med Sci* (2013) 75: 701-707.
6. Comazzi S, Gelain ME, Bonfanti U, Roccabianca P. Acute megakarioblastic leukemia in dogs: a report of three cases and a review of the literature. *J Am Anim Hosp Assoc* (2010) 46 (5): 327-335.
7. Court EA, Watson AD, Peaston AE. Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. *Aust Vet J* (1997) 75: 424-427.
8. Day MJ, Henderson SM, Belshaw Z, et al. An immunohistochemical investigation of 18 cases of feline nasal lymphoma. *J Comp Pathol* (2004) 130:152-161.

9. Dorn CR, Taylor DO, Hibbard HH. Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am J Vet Res* (1967) 28:993-1001.
10. Gabor L, Malik R, Canfield P. Clinical and anatomical features of lymphosarcoma in 118 cats. *Aust Vet J* (1998) 76:725-732.
11. Gabor LJ, Jackson ML, Trask B, Malik R., Canfield PJ Feline leukaemia virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* (2001) 79(7): 476-481.
12. Gomes-Keller MA, Gonczi E, Grenacher B, Tandon R, Hofman-Lehamann R, Lutz H. *Vet microbiol* (2009) 134 (3-4): 208-217.
13. Granum L, Gorman E, Ruaux C, Vernau W. Biphenotypic B-cell lymphoma in 2 cats. *Vet Clin Pathol* (2015) 44(2):320-5.
14. Hardy WD Jr, Hirshaut Y, Hess P. Detection of the Feline Leukemia Virus and Other Mammalian Oncornaviruses by Immunofluorescence. *Bibl Haematol* (1973):778-799.
15. Hardy WD Jr. Feline Oncoretroviruses. *Plenum Press ed., New York* (1993):109-180.
16. Hardy WD Jr. Hematopoietic tumors of cats. *J Am Anim Hosp Assoc* (1981) 17:921-940.
17. Harrus S, Klement E, Aroch I, Stein T, Bark H, Lavy E, Mazaki-Tovi M, Baneth G. Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationship with Felv and FIV infections. *Vet Rec* (2002) 151: 82-85.
18. Hartmann K, Gerle K, Leutenegger C. Feline leukemia virus-most important oncogene in cats? In *Abstract from the 4th*

international Feline Retrovirus Research Symposium, Glasgow, Scotland, UK (1998).

19. Henry CJ, Turnquist SE, Smith A, et al. Primary renal tumors in cats: 19 cases (1992–1998). *J Feline Med Surg* (1999) 1: 165-170.
20. Hirofumi S, Fujino Y, Chino J, Takahashi M, Fukushima K, Yoto-Koshino G, Uchida K, Ohno K, Tsujimoto H. Prognostic Analyses on Anatomical and Morphological Classification of Feline Lymphoma. *J Vet Med Sci* (2014) 76(6): 807-811.
21. Hofmann-Lehmann R, Huder JB, Gruber S, Boretti F, Sigrist B, Lutz H. Feline leukemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J Gen Vir* (2001) 82: 1589-1596.
22. Hoover EA, Olsen RG, Hardy WD, Schaller JP, Mathes LE. Feline leukemia virus infection: Age-related variation in response of cats to experimental infection. *J Natl Cancer Inst* (1976) 57: 365-369.
23. Jackson ML, Haines DM, Meric SM, Misra V. Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can J Vet Res* (1993) 57: 269-276.
24. Jackson ML, Woody SL, Misra V, Haines DM. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: relation to feline leukemia virus status, tumor sites and patient age. *Can J Vet Res* (1996) 60: 199-204.

25. Jarrett WFH, Crawford EM, Martin WB, David F. A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). *Nature* (1964) 202: 567-569.
26. Jarrett WFH, Crichton G, Dalton R. Leukemia and lymphosarcoma in animals and man. *Vet Rec* (1966) 79: 693-699.
27. Jarrett WFH, Russel PH. Differential growth and transmission in cats of feline leukemia viruses of subgroups A and B. *Int J Cancer* (1978) 21: 466-472.
28. Kronic M, Ertl R, Hagen B, Sedlazeck FJ, Hofmann-Lehmann R, von Haeseler A, Klein D. Decreased expression of endogenous feline leukemia virus in cat lymphomas: a case control study. *BMC Vet Res* (2015) 11: 90.
29. Levy LS. Advances in understanding molecular determinants in FeLV pathology. *Vet Immunol Immunopath* (2008) 123: 14-22.
30. Lorimer H. Hereditary lymphosarcoma in Oriental Shorthair cats. *Feline Pract* (1999) suppl:29.
31. Louwerens M, London CA, Pedersen NC, Lyons LA. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J Vet Intern Med* (2005) 19: 329-335.
32. Lutz H, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline leukemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* (2009) 11(7): 565-574.
33. Marconato L, Amadori D. *Oncologia medica veterinaria comparata. Poletto ed.* (2012).

34. National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* (1982) 49: 2112-2135.
35. Neil JC, Fulton R, Rigby M, Stewart M. Feline leukemia virus: generation of pathogenic and oncogenic variants. *Curr Top Microbiol Immunol* (1991) 171: 67-93.
36. Nesina S, Helfer-Hungerbuehler A, Riond B, Boretti FS, Willi B, Meli ML, Grest P, Hofmann-Lehmann R. Retroviral DNA-the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. *Retrovirology* (2015) 21; 12(1):10.
37. Pacitti AM, Jarrett O. Duration of the latent state in feline leukemia virus infection. *Vet Rec* (1985) 117: 472-474.
38. Patterson-Kane JC, Kugler BP, Francis K. The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: A pilot study. *J Comp Pathol* (2004) 130:220-222.
39. Pedersen NC. Feline Immunodeficiency Virus. Plenum Press New York (1993):181–228.
40. Pohlman LM, Higginbotham ML, Welles EG, Johnson CM. Immunophenotypic and Histologic Classification of 50 Cases of Feline Gastrointestinal Lymphoma. *Vet Pathol* (2009) 46: 259-268.
41. Poli A, Abramo F, Baldinotti F, Pistello M, Da Prato L, Bendinelli M. Malignant lymphoma associated with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* (1993) 6: 758-771.
42. Richter KP. Feline gastrointestinal lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* (2003) 33: 1083-1098.

43. Rickard CG, Post JE, Noronha F, Barr LM. A transmissible virus-induced lymphocytic leukemia of the cat. *J Natl Cancer Inst* (1969) 42: 987-1014.
44. Rohn JL, Linenberger ML, Hoover EA, Overbaugh J. Evolution of feline leukemia virus variant genomes with insertion, deletions, and defective envelope genes in infected cats with tumors. *J Virol* (1994) 68: 2458-2467.
45. Santagostino SF, Mortellaro CM, Boracchi P, Avallone G., Caniatti M, Forlani A, Roccabianca P. Feline Upper Respiratory Tract Lymphoma: Site, Cyto-histology, Phenotype, FeLV Expression, and Prognosis. *Vet Path* (2015) 52(2): 250-259.
46. Schaller JP, Mathes LE, Hoover EA, Koestner A, Olsen RG. Increased susceptibility to feline leukemia virus infection in cats exposed to methylnitrourea. *Cancer res* (1978) 38: 996-998.
47. Sheets RL, Pandey R, Jen WC, Roy-Burman P. recombinant feline leukemia virus genes detected in naturally occurring feline lymphosarcomas. *J Virol* (1993) 67: 3118-3125.
48. Shelton GH, Grant CK, Cotter SM, Gardner MB, Hardy WD, Di Giacomo RF. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: A retrospective study (1968–1988). *J Acquir Immune Defic Syndr* (1990) 3: 623-630.
49. Stutzer B, Simon K, Lutz H, Majzoub M, Hermanns W, Hirschberger, Sauter-Louis C., Hartmann K. Incidence of persistent viraemia and latent feline leukemia virus infection in cats with lymphoma. *J Feline Med Surg* (2011) 13: 81-87.

50. Suntz M, Failing K, Hecht W, Schwartz D, Reinacher M. High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. *Vet Immunol Immunopathol* (2010) 136: 71-78.
51. Teske E, van Straten G, van Noort R, Rutteman GR. Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and prednisolone (cop) in cats with malignant lymphoma: new results with an old protocol. *J Vet Intern Med* (2002) 16: 179-186.
52. Torres AN, Mathiason CK, Hoover EA. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology* (2005) 332: 272-283.
53. 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* (1998) 12: 349-354.
54. Valli VE, Jacobs RM, Norris A, Couto GC, Morrison WB et al. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Invest* (2000) 12(4):295-306.
55. Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, Durham A, Ehrhart EJ, et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol* (2011) 48(1):198-211.
56. Waly NE, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR, Day MJ. Immunoistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *Comp. Path.* (2005) 133, 253-260.