
Limfomul canin, epidemiologie și diagnostic

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand Roxana Cora (Popa)

Conducător de doctorat Prof. univ. dr. Cornel Cătoi



INTRODUCERE

Limfomul este o tumoră malignă cu origine în celulele limforeticulare. Acest neoplasm a fost definit ca fiind o tumoră solidă a sistemului imun (MORRISON, 2004; PETROV și colab., 2009). Limfoamele la câine reprezintă între 7% și 24% din totalul tumorilor și aproximativ 83% din toate tumorile maligne ale sistemului hematopoetic (KAISER, 1981; MOULTON și HARVEY, 1990; VAIL și colab., 2013). Cei mai predispuși sunt câinii de vârstă medie și cei bătrâni, observându-se o incidență mai mare a acestei tumori la cei cu vârste cuprinse între 5.5 și 9 ani (BABA și CĂTOI, 2007). Unele studii mai recente arată că femelele prezintă un risc mai scăzut de a dezvolta limfom, în comparație cu masculii (VILLAMIL și colab., 2010; VAIL și colab., 2013). O predispoziție mai crescută pentru limfom s-a identificat la următoarele rase de câini: Boxer, Chow Chow, Ciobănesc German, Saint Bernard, Scottish Terrier, Basset Hound, Airedale Terrier, Bulldog Englez, Beagle, Golden Retriever, Pudel (VONDERHAAR și MORRISON, 2002; MORRISON, 2004). Limfomului canin are o etiologie multifactorială și în mare parte necunoscută (VAIL și colab., 2013). Printre posibilele cauze ale acestui neoplasm se numără: erbicide, respectiv (2,4-D) acid fenoxiacetic, câmpurile magnetice de joasă frecvență, deșeurile toxice și radioactive, fumul de țigară, unele anomalii genetice, precum anumite virusuri (HAYES și colab., 1991; HAHN și colab., 1994; REIF și colab., 1995; MORRISON, 2004; MARCONATO și colab., 2009; PASTOR și colab., 2009; MILMAN și colab., 2011). Limfoamele canine se clasifică în funcție de localizarea anatomică, criteriile histologice și caracteristicile imunofenotipice. Aproximativ 80-84% dintre câinii cu limfom dezvoltă forma multicentrică, care se caracterizează prin limfadenopatie periferică generalizată (MADEWELL și THESEN, 1987; VAIL și colab., 2010; VAIL și colab., 2013). Organizația Mondială a Sănătății a conceput un sistem de stadializare clinică a limfoamelor, în funcție de extinderea leziunilor și de absența sau prezența simptomatologiei (VAIL, 2003). Pentru diagnosticul acestei tumori se poate recurge la următoarele examene: imagistic, citologic, histologic, imunohistochimic, molecular (SÖZMEN și colab., 2005; KINNS și MAI, 2007; VAIL și colab., 2010; VAIL și colab., 2013; VALLI și colab., 2017). Prognosticul câinilor diagnosticați cu limfom este foarte variabil și depinde de o multitudine de factori care influențează răspunsul la terapie. Spre exemplu, a fost confirmat faptul că indivizii cu limfom de tip T, au avut o remisie și durată de supraviețuire mai scurte, decât cei cu limfom cu fenotip B (RUSLANDER și colab., 1997). Având în vedere faptul că limfomul este de obicei o boală sistemică, este necesară o abordare terapeutică sistemică (chimioterapie). Majoritatea protocoalelor chimioterapeutice combinate folosite în tratamentul câinilor cu limfom, au fost dezvoltate în ultimii 15-20 de ani (MacEWEN și colab., 1977; VAIL, 2011).

STRUCTURA LUCRĂRII

În literatura de specialitate din România, există date puține sau incomplete referitoare la limfomul canin. Astfel, având în vedere faptul că este o tumoră cu o incidență ridicată la această specie și de cele mai multe ori diagnosticul se stabilește printr-un simplu examen citologic, am ales să realizăm un studiu mai amănunțit al acestui neoplasm.

Lucrarea intitulată "Limfomul canin, epidemiologie și diagnostic" conține 145 de pagini și este redactată conform normelor în vigoare, fiind structurată în două părți.

Prima parte, respectiv cea bibliografică, este structurată în 5 capitole și cuprinde 26 de pagini. În această parte a tezei am sintetizat cadrul general actual al cunoașterii legat de aspecte epidemiologice ale limfoamelor la câine, etiologia acestui grup de neoplasme, clasificarea anatomică și histologică a limfoamelor, diagnosticul, prognosticul și tratamentele folosite în acest neoplasm.

În cea de-a doua parte, extinsă pe 74 de pagini și structurată tot în 5 capitole, am detaliat cercetările personale realizate în perioada 2013 – 2017. Fiecare capitol este împărțit în subcapitole ce prezintă scopul și obiectivele, materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute cu discuții asupra noutății acestora comparativ cu alte studii efectuate și concluziile parțiale aduse în urma efectuării fiecărui studiu în parte. Rezultatele cercetării au fost ilustrate într-un număr de 36 de figuri și sintetizate în 11 tabele. Lucrarea se încheie cu bibliografia citată (286 titluri).

REZULTATELE CERCETĂRII

În partea a doua a prezentei lucrări, am studiat limfoamele la câine ce au fost diagnosticate în cadrul disciplinei de Anatomie Patologică, Diagnostic Necropsic și Medicină Legală Veterinară a Facultății de Medicină Veterinară, Cluj-Napoca (România) și ne-am propus în acest sens următoarele scopuri:

- realizarea un studiu epidemiologic al limfoamelor canine, pe o perioadă de 12 ani
- investigarea unor cazuri de limfom din punct de vedere al aspectelor macroscopice, citologice și histopatologice
- evaluarea acestui neoplasm folosind metode moderne de diagnostic, precum examenul imunohistochimic și cel molecular (PCR-PARR)
- clasificarea limfoamelor la câine conform sistemului propus de Organizația Mondială a Sănătății

- evaluarea unor markeri de predicție precum indicele mitotic, indicele de proliferare celulară Ki67, dimensiunea nucleară (diametrul mare, perimetrul și aria) și stadiul clinic.

Capitolul 7, intitulat "Limfomul canin - epidemiologie și morfologie" a avut ca și scop realizarea unui studiu epidemiologic pe o perioadă de 12 ani și evaluarea din punct de vedere macroscopic și histopatologic ale principalelor leziuni întâlnite în cazul limfoamelor diagnosticate. Pentru realizarea acestei lucrări au fost analizate 139 de cazuri de limfom canin cu diferite forme anatomoclinice, masculi și femele de diferite rase, cu vârste cuprinse între 1 și 15 ani. Astfel, aceste cazuri au fost diagnosticate fie histopatologic (în cazul formațiunilor și a cadavrelor), fie citologic (în cazul aspiratelor). Datele epidemiologice au fost obținute din registrele disciplinei de Anatomie Patologică, Diagnostic Necropsic și Medicină Legală Veterinară din cadrul Facultății de Medicină Veterinară, Cluj-Napoca. În timpul examenului necropsic s-au pus în evidență principalele leziuni specifice limfomului, iar apoi au fost recoltate probe în formol 10% (pH 7) din țesuturile cu modificări, care au fost apoi fixate timp de 24 de ore. Țesuturile au fost apoi prelucrate în vederea efectuării examenului histopatologic, fiind incluse la parafină și colorate prin tehnica uzuală Hematoxilină-Eozină. În urma examinării macroscopice și histopatologice, am remarcat faptul că limfomul la câine este o tumoră foarte agresivă, cu un grad ridicat de metastazare, afectând diferite organe din cavitatea toracică și abdominală, dar și alte țesuturi și organe. Limfonodurile, splina, tonsilele, ficatul, vezicula biliară, pancreasul, intestinul, rinichii, pulmonii, miocardul, organele și țesuturile cele mai afectate de acest neoplasm. În cei 12 ani luați în studiu (perioada 2005-2016), limfomul a avut o incidență de 8.03% din totalul patologiei tumorale la câine, astfel că poate fi considerat unul dintre cele mai importante neoplasme hematopoetice la această specie. Aproximativ 80% dintre limfoamele canine au fost reprezentate de forma multicentrică, iar restul au fost clasificate în ordine descrescătoare după cum urmează: forma cutanată (7.91%), digestivă (6.47%), mediastinală (5.04%) și cea extranodală (3.6%). Majoritatea câinilor cu limfom multicentric au fost diagnosticați cu stadiile III, (39.25%), IV (43%) și V (17.75%), iar cea mai mare parte dintre ei au fost încadrați în substadiul clinic b (65.42%), deoarece au prezentat simptomatologie. Am observat o incidență ușor mai crescută a masculilor (55%), comparativ cu femelele (45%), iar în ceea ce privește vârsta câinilor, cei mai afectați au fost indivizii din grupa de vârstă 6-9 ani, cu o vârstă medie de aproximativ 8 ani. Printre rasele cele mai predispuse să dezvolte această tumoră se numără: rasa comună (21.05%), Rottweiler (15.79%), Ciobănesc German (8.27%), Boxer (4.51%) și Pechinez (4.51%).

Capitolul 8, intitulat "Diagnosticul citologic diferențial în limfomul canin" cuprinde evaluarea citologică a unor preparate obținute prin tehnica de aspirare cu ac

fin ce au fost prelevate de la câini diagnosticați cu diferite limfadenopatii, inclusiv limfom multicentric, dar și din diverse tumori cutanate cu celule rotunde (limfom, plasmocitom, mastocitom și histiocitom). În acest capitol am prezentat câteva dintre cele mai importante caracteristici citologice care diferențiază limfoamele canine față de alte leziuni limfonodale și cutanate. Pentru acest studiu au fost prelevate 75 de probe citologice limfonodale și din diferite tumori cutanate, de la câini de rase diferite, masculi și femele, cu vârste cuprinse între 7 luni și 14 ani. Preparatele citologice obținute prin tehnica de aspirare cu ac fin, au fost apoi colorate prin metodele Dia Quick Panoptic și Wright. În urma interpretării probelor citologice provenite din aspiratele limfonodale, acestea au fost clasificate după cum urmează: limfom, forma multicentrică 33.34%, reacție limfonodală 18.67, limfadenită purulentă 5.33%, reacție limfonodală asociată cu limfadenită eozinofilică 1.33%, diferite tumori metastazate în limfonoduri 10.67%. Tumorile cutanate cu celule rotunde au fost următoarele: limfom cutanat 1.33%, plasmocitom cutanat 1.33%, histiocitom cutanat 9.33% și mastocitom cutanat 18.67%. Metoda de aspirare cu ac fin s-a dovedit a fi o procedură de diagnostic simplă, precoce și rapidă, aceasta fiind extrem de utilă pentru a diferenția tumorile cutanate cu celule rotunde și diferitele limfadenopatii la câine, bazându-se pe caracteristicile citologice specifice fiecărui tip de leziune în parte.

Capitolul 9, intitulat "Clasificarea limfoamelor la câine după sistemul Organizației Mondiale a Sănătății" are ca scop clasificarea unor cazuri de limfoame canine, ce au fost diagnosticate în cadrul disciplinei de Anatomie Patologică, Diagnostic Necropsic și Medicină Legală Veterinară, conform sistemului propus de Organizația Mondială a Sănătății (OMS). Pentru realizarea acestui capitol am inclus în studiu 44 de cazuri de limfom canin cu diferite forme anatomice. Probele tisulare au fost incluse la parafină după protocolul standard și apoi au fost secționare și colorate prin metoda Hematoxilina-Eozină. De asemenea, am efectuat examenul imunohistochimic prin metoda automată pentru fiecare caz în parte, utilizând următorii anticorpi: antiCD3 (clona LN10), specific pentru limfocitele T și antiCD20 (clona MJ1), antiCD21 (clona 2G9), antiCD79a (clona 11E3), care sunt specifici pentru limfocitele de tip B. Pe baza localizării anatomice, a aspectelor histopatologice și a rezultatelor examenului imunohistochimic, s-a realizat clasificarea limfoamelor luate în studiu. Din totalul limfoamelor, 65.91% (29 cazuri) au avut fenotip B, 31.82% (14 cazuri) au fost diagnosticate cu imunofenotip T și 2.27% (1 caz) au fost cu fenotip nul (posibil cu origine în limfocitele natural killer - NK), rezultatele fiind similare cu cele obținute în alte studii de specialitate. Limfoamele canine cu imunofenotip B au predominat în cazul formei splenice (100%), multicentrice (80%), a celei mediastinale (60%) și a sistemului nervos central (100%), în timp ce limfoamele digestive (100%) și marea parte a celor cutanate (55.55%) au avut origine în limfocitele de tip T. Limfoamele cu imunofenotip nul au fost diagnosticate doar în forma multicentrică, cu o pondere de

4%. După stabilirea formei anatomice și a imunofenotipului fiecărui limfom în parte, pe baza caracteristicilor histopatologice (creștere tumorală cu aspect nodular sau difuz, dimensiunea nucleară, morfologia nucleară detaliată, indicele mitotic), limfoamele au fost clasificate conform sistemul OMS. Din totalul cazurilor, au predominat limfoamele difuze cu celule B mari (52.28%), fiind urmate de limfoamele periferice cu celule T neprecizate (9.1%). Restul de cazuri au fost încadrate în următoarele tipuri, după cum urmează: limfom de zonă marginală (6.82%), limfom limfoplasmocitic (2.27%), plasmocitom (4.54%), limfom limfoblastic T (4.54%), limfom intestinal cu celule T (6.82%), limfom cutanat epiteliotrop (6.82%) și non-epiteliotrop T (4.54%) și limfom agresiv cu celule NK (2.27%).

Capitolul 10, intitulat "Evaluarea predictibilității unor markeri morfologici în limfom la câine", cuprinde evaluarea unor markeri de predicție, precum indicele mitotic, expresia Ki67, stadiul clinic și morfometria nucleară (diametrul mare, perimetrul și aria), în diagnosticul limfoamele canine. Materialul biologic a constat în 25 de fragmente tisulare limfonodale, recoltate în timpul examenului necropsic de la câini cu limfom multicentric. În funcție de extinderea tumorii în diferite organe și țesuturi, s-a stabilit stadiul clinic (de la I la V, conform sistemului OMS), pentru fiecare caz de limfom în parte. Fragmentele de țesut au fost procesate prin tehnica standard la parafină, după care s-au obținut secțiuni tisulare care au fost colorate prin tehnica Hematoxilină-Eozină, iar altele au fost utilizate în vederea realizării examenului imunohistochimic folosind anticorpii anti Ki67 (clona ab15580), prin metoda automată. Examenul histopatologic a urmărit determinarea indicelui mitotic și evaluarea morfometriei nucleare. Evaluarea indicelui de proliferare Ki67 s-a realizat urmărind marcarea în brun de diferite intensități ai nucleilor celulelor tumorale. Datele obținute consecutiv evaluării markerilor predictivi menționați, au fost prelucrate statistic folosind testul de corelație Sperman. Limfoamele multicentrice incluse în studiu au fost stadializate după cum urmează: stadiul III (12%), stadiul IV (36%) și stadiul V (52%). Niciunul dintre câini nu a fost diagnosticat la debutul bolii, respectiv stadiile clinice I și II. În privința numărului de mitoze, 80% dintre cazuri au avut o medie a indicelui mitotic mai mică sau egală cu 9. Aproximativ jumătate dintre limfoame (48%) au avut o medie a expresiei Ki67 cuprinsă între 41% și 60%. La 32% dintre limfoame au fost observate valori medii ale expresiei Ki67 situate între 21% și 40%, iar restul de 20% au avut o valoare medie a indicelui Ki67 mai mare de 60%. Un procent de 44% dintre limfoame au avut nuclei cu o medie a diametrului mare mai mică de 6 μm , un perimetru mediu cuprins între 18 și 32 μm și o arie medie mai mică de 30 μm^2 . Restul de 56% dintre cazuri au avut nuclei cu o medie a diametrului mare cuprinsă între 6 și 11 μm , un perimetru mediu mai mic de 18 μm și respectiv o arie medie cuprinsă între 30 și 65 μm^2 . În prezentul studiu a existat o corelație moderată între expresia Ki67 și stadiul clinic al limfoamelor, dar am remarcat lipsa corelației

dintre parametrii morfometrici nucleari (diametrul mare nuclear, perimetru, arie) și indicele de proliferare celulară Ki67. De asemenea, am putut constata prezența unei corelații între indicele mitotic și stadiul clinic al cazurilor studiate. Parametrii morfometrici nucleari au avut valori mult mai mari în limfoamele cu indice mitotic crescut, decât în cele cu indice mitotic scăzut. Markerii predictivi ce au fost incluși în acest studiu (expresia Ki67, stadiul clinic, indicele mitotic, diametrul mare al nucleilor, aria și perimetrul nuclear), pot fi utilizați cu succes în vederea caracterizării și determinării gradului de agresivitate al limfoamelor canine, fiind de real folos în formularea unui prognostic și în luarea unei decizii terapeutice optime.

Capitolul 11, intitulat "Diagnosticul limfomul canin prin evidențierea rearanjării clonale a genei receptorului de antigen și a examenului imunohistochimic", a avut ca și scop evaluarea prin examen imunohistochimic și molecular a unor cazuri de limfoame canine. Prin intermediul examenului molecular, respectiv tehnica de reacție în lanț a polimerazei (PCR), am dorit să punem în evidență rearanjarea genei receptorului de antigen (PARR), respectiv clonalitatea limfocitelor tumorale și să determinăm fenotipul limfoamelor la câine. Prin examenul imunohistochimic (IHC) am stabilit imunofenotipul aceluiași cazuri de limfom, iar în final am corelat rezultatele celor două metode de diagnostic. În prezentul studiu au fost prelevate probe tisulare de la 24 de câini diagnosticați cu diferite forme anatomice de limfom, care au fost procesate prin tehnica standard de includere în parafină, după care s-au obținut preparate histopatologice colorate prin metoda Hematoxilină-Eozină. Pentru examenul PCR am inclus în plus 2 probe tisulare, considerate controale negative, provenite de la un câine diagnosticat cu melanom metastazat în limfonod și de la altul fără modificări. Examenul imunohistochimic a fost realizat prin metoda automată folosind anticorpii antiCD3 specific pentru limfocitele T și anticorpii antiCD20, antiCD21, antiCD79a pentru limfocitele de tip B. În cazul examenului PCR pentru detectarea rearanjării genei receptorului de antigen (PARR), ADN-ul a fost extras din cele 24 de limfoame și din cele 2 controale negative. Extracția s-a realizat din țesut proaspăt (7 cazuri de limfom și 2 controale negative) și din țesut inclus la parafină (17 cazuri de limfom). Pentru fiecare probă în parte a fost amplificată regiunea CDR3 a genelor receptorului de antigen: TCR γ pentru limfocitele T, IgH major și IgH minor, pentru limfocitele B. După realizarea examenului imunohistochimic, limfoamele au fost împărțite în funcție de imunofenotip după cum urmează: limfoame cu origine în limfocitele B (66.66%), limfoame cu imunofenotip T (29.18%) și limfoame cu fenotip nul (4.16%). Limfoamele cu imunofenotip B au predominat în forma multicentrică (84.62%), mediastinală (60%) și cea a sistemului nervos central (100%). Majoritatea limfoamelor cutanate (66.66%) și a celor cu localizare la nivelul tractului gastro-intestinal (100%), au avut origine în limfocitele de tip T. În ceea ce privește examenul PCR, reacția pentru detectarea rearanjării clonale a genei receptorului de antigen a fost pozitivă la 100%

dintre limfoamele de la care s-a analizat țesut proaspăt, însă pozitivitatea a fost de 41.18%, la probele de limfom canin de la care s-a utilizat pentru extracție țesut parafinat. La aproximativ o treime din totalul cazurilor analizate, a fost identificată rearanjarea clonală a genei imunoglobulină (29.17%), o altă treime dintre limfoame au prezentat rearanjare clonală încrucișată (atât pentru IgH, cât și pentru TCR γ) (29.17%), iar restul cazurilor de limfom au fost negative (41.66%). La aproape jumătate dintre limfoamele cu imunofenotip B (43.75%) și a celor cu fenotip nul (100%), a fost observată o corelație pozitivă între rezultatele examenului IHC și PARR. Reacția încrucișată la examenul PARR a fost identificată atât în limfoamele de tip T (42.86%), cât și în limfoamele cu imunofenotip B (25%).

BIBLIOGRAFIE SELECTATĂ

1. BABA A.I., C. CĂTOI, 2007. Comparative oncology, *The Publishing House of Romanian Academy, București*, 573-625.
2. HAHN K.A., R.C. RICHARDSON, E.A. HAHN, C.L. CHRISMAN, 1994. Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. *Veterinary Pathology*, 31, 528-540.
3. HAYES H.M., R.E. TARONE, K.P. CANTOR, C.R. JESSEN, D.M. MCCURNIN, R.C. RICHARDSON, 1991. Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner's use of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(17), 1226-1231.
4. KAISER H.E., 1981. Animal neoplasia: a systemic review. In Kaiser HE, editor: Neoplasms-comparative pathology in animals, plants and man, *Baltimore, Williams & Wilkins*.
5. KINNS J., W. MAI, 2007. Association between malignancy and sonographic heterogeneity in canine and feline abdominal lymph nodes. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 48, 565-569.
6. MACEWEN E.G., A.K. PATNAIK, R.J. WILKINS, 1977. Diagnosis and treatment of canine hematopoietic neoplasms. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 7, 105-118.
7. MADEWELL B.R., G.H. THESEN, 1987. Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. In THEILEN G.H., MADEWELL B.R., editors: *Veterinary cancer medicine, ed 2, Philadelphia, Lea and Febiger*.
8. MARCONATO L., C. LEO, R. GIRELLI, S. SALVI, F. ABRAMO, G. BETTINI, S. COMAZZI, P. NARDI, F. ALBANESE, E. ZINI, 2009. Association between waste management and cancer in companion animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 564-569.
9. MILMAN G., K.C. SMITH, K. ERLES, 2011. Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats. *Veterinary Microbiology*, 150, 15-20.
10. MORRISON W.B., 2004. Non-cutaneous lymphoma in the dog and cat, p. 3. In Morrison WB (Ed.). *Lymphoma in dogs and cats. CRC Press, Jackson, Wyoming: Teton NewMedia; USA, 1-88*.
11. MOULTON J.E., J.W. HARVEY, 1990. Tumors of lymphoid and hematopoietic tissue. In Moulton J.E., editor: *Tumors of domestic animals, ed 3, University of California Press*.
12. PASTOR M., K. CHALVET-MONFRAY, T. MARCHAL, G. KECK, J.P. MAGNOL, C. FOURNEL-FLEURY, F. PONCE, 2009. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: Breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(2), 301-310.
13. PETROV L., A. CUCUIANU, ANCA BOJAN, LAURA URIAN, 2009. Hematologie clinică, *Casa Cărtii de Știință, Cluj-Napoca*, 183-254.
14. REIF J.S., K.S. LOWER, G.K. OGILVIE, 1995. Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphosarcoma. *American Journal of Epidemiology*, 141, 352-359.

15. RUSLANDER D.A., D.H. GEBHARD, M.B. TOMPKINS, C.B. GRINDEM, R.L. PAGE, 1997. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In vivo (Athens, Greece)*, 11(2), 169-172.
16. SÖZMEN M., S. TASCA, E. CARLI, D.D. LORENZI, T. FURLANELLO, M. CALDIN, 2005. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(4), 323-329.
17. VAIL D., 2003. Lymphoproliferative and myeloproliferative disorders, cap.21a. In DOBSON, J.M., B.D.X. LASCELLES, BSAVA manual of canine and feline oncology. (Ed. 2). *British Small Animal Veterinary Association., UK*, 276-292.
18. VAIL D.M., 2011. Tumours of the haemopoietic system, cap. 19a. In DOBSON J.M., LASCELLES, B.D.X., BSAVA manual of canine and feline oncology. (Ed. 3). *British Small Animal Veterinary Association., UK*, 285-303.
19. VAIL D.M., G.M. MICHELS, C. KHANNA, K.A. SELTING, C.A. LONDON, 2010. Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0)–a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(1), 28-37.
20. VAIL D.M., MARIE E. PINKERTON, KAREN M. YOUNG, 2013. Hematopoietic Tumors, cap.32. In WITHROW S.J., R. PAGE, D.M. VAIL, Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. *Elsevier Health Sciences., Editia 5*, 608-678.
21. VALLI V.E.O., DOROTHEE BIENZLE, D.J. MEUTEN, 2017. Cap. 7, Tumors of the Hemolymphatic System, In MEUTEN D.J., Tumors in Domestic Animals, *Editia 5, John Wiley & Sons, Inc., Wiley Blackwell, Iowa, USA*, 203-321.
22. VILLAMIL J.A., C.J. HENRY, A.W. HAHN, J.N. BRYAN, J.W. TYLER, C.W. CALDWELL, 2010. Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2009:591753. Epub 2010 Mar 14.
23. VONDERHAAR M.A., W.B. MORRISON, 2002. Lymphosarcoma. In: MORRISON W.B. (ed). Cancer in Dogs and Cats : Medical and Surgical Management. *2nd ed. Jackson, WY: Teton NewMedia* 641-670.