

## Linfossarcoma de células B multicêntrico em uma ovelha

Multicentric B-cell lymphosarcoma in an Ewe

Bruno Leite dos Anjos<sup>1</sup>, Maria Elisa Trost<sup>1</sup>, Aline Diefenbach<sup>1</sup>, Letícia Trevisan Gressler<sup>2</sup> & Luiz Francisco Irigoyen<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Lymphosarcoma is a malignant tumor from tumoral cells similar to lymphocytes and its spontaneous development in small ruminants is unusual in Brazil. In cattle, the lymphosarcomas are often associated with infection by bovine leukemia virus (BLV), although sheep are considered as a very susceptible specie to BLV. Spontaneously lymphosarcoma is rare and in most cases it is observed in apparently healthy animals in slaughterhouses. There is no report of this tumor in sheep in southern Brazil. We describe a case of spontaneous multicentric B-cells lymphosarcoma in an ewe.

**Case:** In June 2007, a 4-years-old mixed breed ewe was necropsied after clinical signs as anorexia, weight loss and death in few weeks. This ewe was purchased in September 2006 with another 44 sheep, most females of the same age. Dairy cattle were also raised together with sheep at the same farm. Fragments of liver, lung, spleen, kidneys, brain and parotid lymph node were sent to the Veterinary Pathology Laboratory - Universidade Federal de Santa Maria, Brazil, for histopathological evaluation. Multiply white to yellow nodules, with 0.5 to 2 cm of diameter, were observed in the liver, kidneys, and the parotid lymph node. The nodules were soft and some coalesced and infiltrating the hepatic parenchyma. The kidneys nodules were similar to those of the liver but prominent in the capsule. They were observed infiltrating more intensely the cortical region. The parotid lymph node was 6 x 4 x 3.5 cm size, whitish, multilobulated and the cut surface was totally obliterated by the tumor mass. Histologically, the neoplasm showed intense proliferation of neoplastic lymphoid cells arranged in sheets and a poor fibrovascular stroma, with round small and hyperchromatic nuclei, and scarce eosinophilic cytoplasm compressing the adjacent parenchyma. Immunohistochemistrily, neoplastic cells were strongly positive for anti-CD79a antibody and negative for anti-CD3 antibody, indicating neoplastic cells derived from B lymphocytes.

**Discussion:** The diagnostic of multicentric B-cell lymphosarcoma was made based on gross, histological, and immunohistochemical findings. Spontaneous development of this tumor is uncommon in sheep in Brazil. The multicentric presentation seen in this case is the most common form of lymphosarcoma in sheep, although the thymic and cutaneous forms also occur. Sheep affected by multicentric lymphosarcomas may have symmetrical lymphadenopathy, not observed in this case, and involvement of various organs including liver, kidney, spleen, intestine, skeletal muscle and heart. However, under experimental conditions, these tumors are easily induced after inoculation of bovine retrovirus (BLV) in sheep, by its high sensitivity. Possibly, the spontaneous transmission of BLV from cattle developing the disease in sheep may occur in Brazil as well as in other countries. Epidemiological factors of the disease are not established yet. Despite this, some correlation must exist for the low occurrence of this disease in sheep in properties of southern Brazil, where cattle and sheep are commonly raised together, and the frequency of lymphosarcoma in sheep is low. In this case, the association of BLV with development of the neoplasm could not be confirmed. This is the first report of multicentric B-cell lymphosarcoma in sheep diagnosed in southern Brazil.

**Keywords:** diseases of sheep, lymphosarcoma, immunohistochemistry, B lymphocytes.

**Descritores:** doença de ovinos, linfossarcoma, imuno-histoquímica, linfócitos B.

## INTRODUÇÃO

Linfossarcomas (linfomas) são neoplasmas do sistema hemolinfático relatados em diversas espécies de animais domésticos [6]. São caracterizados por proliferação de linfócitos neoplásicos que comumente atingem o fígado, baço, rins, linfonodos, coração, pele, timo e sistema nervoso central [1,4]. Testes de imunofenotipagem apontam o envolvimento de linfócitos T e B na formação desses tumores [3,8].

Em bovinos, o linfossarcoma é, na maioria dos casos, associado à infecção pelo vírus da leucemia bovina (VLB) [6]. Os ovinos, embora tidos como uma espécie bastante susceptível ao VLB, raramente desenvolvem linfossarcoma espontaneamente [8] e grande parte dos casos já observados se refere a animais aparentemente saudáveis, inspecionados em abatedouros [6]. É descrito que cerca de 30-60% dos ovinos jovens infectados desenvolvem linfossarcomas de células B [13]. Casos da doença em ovinos não são descritos na região sul do Brasil. O objetivo deste relato é descrever um caso de linfossarcoma multicêntrico de células B espontâneo em uma ovelha no Rio Grande do Sul, no intuito de alertar sobre a ocorrência dessa doença no rebanho ovino, semelhante à observada nos bovinos.

## RELATO DE CASO

No mês de junho de 2007, uma ovelha sem raça definida, com 4 anos de idade, integrante de um rebanho de 160 ovinos criados de forma semi-extensiva no município de Formigueiro, Rio Grande do Sul, apresentou sinais clínicos que incluíam falta de apetite, emagrecimento progressivo e morte. A ovelha havia sido adquirida em setembro de 2006 juntamente com outros 44 ovinos, a maioria deles fêmeas da mesma idade. Bovinos de leite também eram criados na propriedade junto com os ovinos. Outra fêmea do mesmo lote morreu após apresentar sinais clínicos semelhantes. Fragmentos de fígado, pulmão, baço, rins, linfonodo parotídeo e encéfalo foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria - RS para exame histopatológico.

Macroscopicamente, o fígado estava aumentado de volume, com arredondamento dos bordos de todos os lobos e apresentava múltiplos nódulos com 0,5 a 2 cm de diâmetro, amarelo-esbranquiçados e firmes na superfície. Os nódulos eram macios ao

corte e alguns deles coalesciam e se infiltravam no parênquima hepático, restando pequenas áreas de tecido com aspecto normal (Figura 1). Nos rins, os nódulos apresentavam o mesmo aspecto descrito para o fígado; eram salientes na cápsula (Figura 2) e infiltravam o parênquima da região cortical e, com menor frequência, a região medular. O linfonodo parotídeo mediu 6 x 4 x 3,5 cm, era brancacento, multilobulado e sua superfície de corte era totalmente obliterada pela massa tumoral. O baço estava aumentado e ao corte o parênquima protrua. O pulmão estava moderadamente congestionado e brilhoso. Não foram observadas alterações no encéfalo.



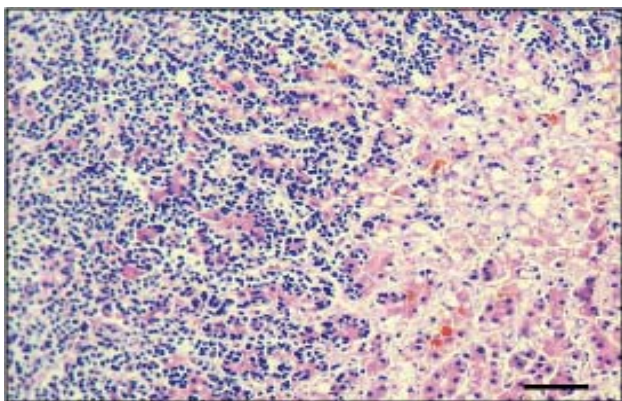
**Figura 1.** Linfoma multicêntrico de células B em uma ovelha. Fígado. Superfície de corte com múltiplas áreas amarelo-esbranquiçadas, aleatórias, que invadem o parênquima.



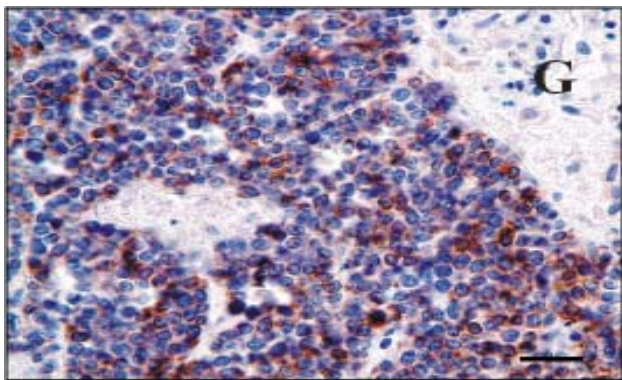
**Figura 2.** Rim. Observam-se múltiplos nódulos salientes e brancacentos, distribuídos pela superfície natural do órgão.

Fragmentos desses órgãos foram processados rotineiramente para histopatologia e corados com hematoxilina e eosina. Os nódulos do fígado eram formados por intensa proliferação de células neoplásicas arranjadas em mantos, sustentadas por

um fino estroma fibrovascular, com núcleo redondo, pequeno, hiper cromático e citoplasma eosinofílico e escasso. Extensas áreas do parênquima hepático foram substituídas pelas células neoplásicas. Observou-se ainda, discreta vacuolização de hepatócitos adjacentes aos infiltrados tumorais (Figura 3). Nos rins, as células neoplásicas infiltravam o interstício e formavam áreas multifocais que se estendiam do córtex até regiões medulares mais profundas. Todo o parênquima do linfonodo parotídeo direito foi substituído pelas células neoplásicas com o mesmo padrão infiltrativo descrito nos demais órgãos. Cortes histológicos de tecido renal, contendo invasão de células tumorais, foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) utilizando anticorpos primários, policlonal anti-CD3<sup>1</sup> e monoclonal anti-CD79a<sup>2</sup> segundo procedimento realizado anteriormente [11]. As células neoplásicas foram fortemente positivas para CD79a, apresentando marcação finamente granular moderada na membrana citoplasmática de aproximadamente 70% das células neoplásicas (Figura 4) e negativas para CD3.



**Figura 3.** Células neoplásicas obliteram quase completamente o parênquima hepático. Observe a vacuolização do citoplasma de hepatócitos. Hematoxilina e eosina. (Barra = 100  $\mu$ m).



**Figura 4.** Rim. Glomérulo (G) em meio a linfócitos B neoplásicos com imunomarcção citoplasmática para CD79a. (Barra = 50  $\mu$ m).

## DISCUSSÃO

Com base nos achados macroscópicos, histológicos e imuno-histoquímicos, o diagnóstico de linfossarcoma multicêntrico com origem em linfócitos B foi confirmado [2,3,6]. Em ovinos, linfossarcomas espontâneos são raros e ocorrem em animais com dois a quatro anos e, ocasionalmente, em animais com menos de um ano [6,7]. A apresentação multicêntrica, vista neste caso, é predominante nessa espécie [7], embora as formas cutânea e tímica também ocorram [6]. Ovinos afetados pela forma multicêntrica apresentam, em alguns casos, linfadenomegalia simétrica [6,10] e envolvimento de vários órgãos como fígado, rins, linfonodos, baço, trato alimentar, músculo esquelético e coração. Em caprinos, além das apresentações clínicas descritas para os ovinos, é observada ainda, e com maior frequência, linfadenomegalia de linfonodos internos [6] e, em raros casos, há comprometimento da mandíbula, ovário [2,6] e canal medular, com sinais nervosos secundários à compressão da medula e raízes nervosas [12]. A invasão massiva das células neoplásicas no fígado e no rim e consequente compressão das células do parênquima desses órgãos, possivelmente, foram responsáveis pelo quadro de caquexia e morte dessa ovelha [6].

Estudos da doença descrevem que, em condições experimentais, linfossarcomas em ovinos inoculados com o retrovírus dos bovinos são facilmente reproduzidos em decorrência da alta susceptibilidade da espécie ovina ao vírus [5,8]. Embora não completamente elucidada, a patogênese dessa doença está relacionada a produtos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e glicoproteínas expressas na superfície das células B receptoras em decorrência da ação viral, ligadas a peptídeos presentes em células T apresentadoras de antígenos [9]. Demonstrou-se também que ovinos inoculados com VLB apresentam quadros de linfocitose, com alto número de linfócitos do tipo B e linfossarcomas com este mesmo tipo celular em curtos períodos de tempo, o que viabiliza estudos de patogênese dessa doença, tanto em ovinos como bovinos [8,10].

Baseado na escassez de dados sobre este neoplasma na espécie ovina no Brasil, pode-se afirmar que pouco se conhece acerca dessa doença e sobre um possível envolvimento do VLB na sua patogênese. Acreditamos que sua transmissão para ovinos é baixa quan-

do comparada com a dos bovinos. A forma de transmissão mais comum do retrovírus entre os bovinos é a horizontal, por inoculação de linfócitos B infectados através de agulhas e instrumental contaminado por sangue ou contato direto com secreções, como saliva e fluidos respiratórios, de bovinos portadores do vírus [6]. Possivelmente, a transmissão espontânea do VLB de bovinos para ovinos, com desenvolvimento da doença nos ovinos, pode ocorrer no Brasil assim como em outros países [5]. Porém, fatores epidemiológicos e ambientais, ainda não estabelecidos, podem contribuir para sua baixa ocorrência em propriedades, especialmente da região sul, onde a criação de bovinos e ovinos em consórcio é bastante difundida e a frequência de linfossarcomas nos ovinos é baixa quando comparada com a dos bovinos [1,8].

Embora não represente uma importante causa de perdas econômicas como observado no continente

africano [5], no Brasil o linfossarcoma deve ser considerado como diagnóstico diferencial para doenças caquetizantes em ovinos. A associação do VLB com o presente caso não pôde ser confirmada, no entanto, esse é o primeiro caso de linfossarcoma de células B multicêntrico em ovinos diagnosticado no sul do país. A ocorrência dessa doença alerta para que estudos epidemiológicos do VLB no rebanho ovino devam ser realizados, especialmente em áreas onde a doença é endêmica no rebanho bovino e ovinos são criados em consórcio nas propriedades.

**Agradecimentos.** Os autores agradecem à Ingeborg M. Langohr do Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, USA, pela realização das técnicas de imuno-histoquímica.

#### NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup>DakoCytomation - A0452, Carpinteria, California, USA.

<sup>2</sup>DakoCytomation - M7051, Carpinteria, California, USA.

#### REFERÊNCIAS

- 1 Barros C.S.L. & Flores E. 1989. Leucosis bovina. In: *XVII Jornadas Uruguayas de Buiatria* (Paysandú, UR). pp.67-73.
- 2 Digrassie W.A., Wallace M.A. & Sponenberg D.P. 1997. Multicentric lymphosarcoma with ovarian involvement in a Nubian goat. *Canadian Veterinary Journal*. 38(6): 383-384.
- 3 Dixon R.J., Moriarty K.M. & Johnstone A.C. 1984. An immunological classification of ovine lymphomas. *Journal of Comparative Pathology*. 94(1): 107-113.
- 4 Figuera R. & Barros C. 2004. Linfossarcoma intracerebral em bovino. *Ciência Rural*. 34(5): 943-945.
- 5 Green J.R., Herbst I.A. & Schneider D.J. 1988. An outbreak of lymphosarcoma in merino sheep in the South Western Cape. *Journal of the South African Veterinary Association*. 59(1): 27-29.
- 6 Jacobs R.M., Messick J.B. & Valli V.E. 2002. Tumors of the hemolymphatic system. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. 4th edn. Iowa: Iowa State Press, pp.119-198.
- 7 Johnstone A.C. & Manktelow B.W. 1978. Pathology of Spontaneously Occurring Malignant-Lymphoma in Sheep. *Veterinary Pathology*. 15(3):301-312.
- 8 Murakami K., Okada K., Ikawa Y. & Aida Y. 1994. Bovine Leukemia-Virus Induces Cd5- B-Cell Lymphoma in Sheep Despite Temporarily Increasing Cd5+ B-Cells in asymptomatic stage. *Virology*. 202(1): 458-465.
- 9 Nagaoka Y., Kabeya H., Onuma M., Kasai N., Okada K. & Aida Y. 1999. Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. *Cancer Research*. 59(4): 975-981.
- 10 Olson C. & Baungartener L.E. 1976. Pathology of lymphosarcoma in sheep induced with bovine leukemia virus. *Cancer Research*. 36(7 PT 1): 2365-2373.
- 11 Ramos-Vara J.A. & Beissenherz M.E. 2000. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12(4): 307-311.
- 12 Riet-Correa F., Tabosa I.M., Azevedo E.O., Medeiros R.M.T. & Simões S.V.D. 2003. Semi-árido em Foco - Revista de Educação Continuada. Patos: Gráfica da UFCG, 116p.
- 13 Valli V.E.O. 2007. Hematopoietic system. In: Maxie M.G. (Ed.) *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. v.3. 5th edn. Philadelphia: Elsevier, pp.107-324.