

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Stella Maris Pereira de Melo

**ASPECTOS PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE
NEOPLASMAS EM OVINOS**

Santa Maria, RS
2021

Stella Maris Pereira de Melo

**ASPECTOS PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE NEOPLASMAS EM
OVINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof.^a PhD Glaucia Denise Kommers

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

de Melo, Stella Maris Pereira
Aspectos patológicos e imuno-histoquímicos de
neoplasmas em ovinos / Stella Maris Pereira de Melo.-
2021.
51 p.; 30 cm

Orientadora: Glaucia Denise Kommers
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Ruminante 2. Tumor 3. Necropsia 4. Histopatologia
5. Doenças de ovinos I. Kommers, Glaucia Denise II.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, STELLA MARIS PEREIRA DE MELO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Stella Maris Pereira de Melo

**ASPECTOS PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE NEOPLASMAS EM
OVINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovada em 12 de fevereiro de 2021:

Glaucia Denise Kimmers, PhD (UFSM)
(Presidente/ Orientadora)

Cristina Gevehr Fernandes, Dra. (UFPel)

Mariana Martins Flores, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha amada família, especialmente aos meus pais, por todo o apoio, amor incondicional, educação, incentivo e esforço que fizeram para a realização deste sonho. Eu amo vocês!

Ao meu avô Alfeu (*in memoriam*), quem me ensinou desde cedo a amar os animais e foi a minha inspiração para a escolha desta profissão. Sei que você se manteve ao meu lado durante todo esse tempo, me protegendo, acalmando e fazendo sempre seguir em frente.

A minha orientadora Gláucia, que me acolheu e me deu a oportunidade de fazer parte do LPV, por quem tenho profunda admiração. Muito obrigada por todo o aprendizado, confiança, amizade e dedicação.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, em especial, a professora Mariana Flores, a qual sempre estava disposta a ensinar e sanar minhas dúvidas. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos do LPV, especialmente aos pós-graduandos Alex, Taiara, Harlan, Éryca, Vanessa, Marcella, João, aos estagiários Nícolas, Morgana, Valentina, Luis, Luíza, Fabíola, e as minhas amigas Patrícia, Betina e Evelin. Agradeço imensamente por toda amizade, companheirismo, união, ajuda e conselhos. Todos vocês foram muito importantes para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao programa de Pós-Graduação pela oportunidade e ao CNPq pelos recursos financeiros disponibilizados.

A todos, meu sincero, muito obrigada!

*“Não deixe que seu medo seja maior do
que seus sonhos”.*

(Pamela Klebis Nogueira)

RESUMO

ASPECTOS PATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE NEOPLASMAS EM OVINOS

AUTORA: Stella Maris Pereira de Melo

ORIENTADORA: Glaucia Denise Kimmers

Neoplasmas em ovinos são infrequentes, e a prevalência dos diferentes subtipos histológicos de tumores pode variar bastante entre as diferentes regiões geográficas. Na literatura, há poucos estudos de caracterização que investiguem a prevalência e detalhem os aspectos patológicos e imuno-histoquímicos das doenças neoplásicas nesta espécie. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de neoplasmas em ovinos no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), durante 40 anos (1980-2019) e caracterizar os seus aspectos macroscópicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos. Informações referentes ao perfil dos animais (idade, raça e sexo), alterações clínicas, macroscópicas e histológicas foram coletadas dos laudos de necropsias e exames histopatológicos com diagnóstico de neoplasias. Durante este período, 35 ovinos (1,8%) foram acometidos por neoplasmas, sendo a maioria classificados como malignos (30/35). Em geral, o tumor mais prevalente foi o carcinoma de células escamosas (17/35) e afetou principalmente o sistema tegumentar (10/17). Outros tipos de neoplasmas ocorreram menos frequentemente, afetando diferentes sistemas orgânicos e compreenderam em ordem decrescente: linfoma (7/35), adenocarcinoma intestinal (3/35), fibroma (3/35), carcinoma hepatocelular (1/35), colangiocarcinoma (1/35), fibrossarcoma (1/35), papiloma (1/35) e fibropapiloma ruminal (1/35). Na histologia, os neoplasmas de origem epitelial se caracterizaram por células cúbicas ou poliédricas arranjadas em ilhas, fitas, cordões, ninhos, ácinos ou ductos. Tumores de origem mesenquimal ou de células redondas apresentaram células fusiformes ou redondas dispostas em feixes ou em manto. Alguns tipos histológicos, como o colangiocarcinoma e o fibrossarcoma, apresentaram alterações macroscópicas e histológicas particularmente incomuns. A técnica de imuno-histoquímica foi realizada principalmente em tumores malignos e permitiu determinar a origem das células neoplásicas em alguns casos, o que auxiliou na confirmação do diagnóstico. Por meio desse estudo, foi possível conhecer a prevalência de neoplasias em ovinos na rotina de um laboratório de patologia veterinária em 40 anos de diagnóstico. O estudo também permitiu caracterizar os aspectos anatomo-patológicos e imuno-histoquímicos desses neoplasmas, fornecendo informações novas e relevantes para o diagnóstico de neoplasias na espécie ovina.

Palavras-chave: Ruminante. Tumor. Necropsia. Histopatologia. Doenças de ovinos.

ABSTRACT

PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ASPECTS OF NEOPLASMS IN SHEEP

AUTHOR: Stella Maris Pereira de Melo
ADVISOR: Glauzia Denise Kommers

Neoplasms in sheep are uncommon, and the prevalence of different histological subtypes of tumours can vary widely between different geographic regions. In the literature, there are few characterization studies that investigate the prevalence, and detail the pathological and immunohistochemical aspects of neoplastic diseases in this species. Thus, the objective of this study was to determine the prevalence of neoplasms in sheep at the Veterinary Pathology Laboratory (LPV) of the Federal University of Santa Maria (UFSM), for 40 years (1980-2019), and to characterize its macroscopic, histopathological, and immunohistochemical aspects. Information regarding the profile of the animals (age, breed, and sex), clinical, macroscopic and histological changes were collected from the necropsy reports and histopathological exams with diagnosis of neoplasms. During this period, of a total of 1,945 exams performed, 35 sheep (1.8%) were affected by neoplasms, the majority being classified as malignant (30/35). In general, the most prevalent tumour was squamous cell carcinoma (17/35) and mainly affected the integumentary system (10/17). Other types of neoplasms occurred less frequently, affecting different organ systems and comprised, in decreasing order: lymphoma (7/35), intestinal adenocarcinoma (3/35), fibroma (3/35), hepatocellular carcinoma (1/35), cholangiocarcinoma (1/35), fibrosarcoma (1/35), papilloma (1/35) and ruminal fibropapilloma (1/35). Histologically, neoplasms of epithelial origin were characterized by cubic or polyhedral cells arranged in islands, ribbons, cords, nests, acini or ducts. Tumours of mesenchymal origin or of round cells, presented spindle or round cells arranged in bundles or in mantle. Some histological types, such as cholangiocarcinoma and fibrosarcoma, showed particularly unusual macroscopic and histological changes in this case series. The immunohistochemistry technique was performed mainly on malignant tumours and allowed to determine the origin of the neoplastic cells in some cases, which helped to confirm the diagnosis. Through this study, it was possible to know the prevalence of neoplasms in sheep in the routine of a veterinary pathology laboratory in 40 years of diagnosis. The study also made it possible to characterize the anatomo-pathological and immunohistochemical aspects of these neoplasms, providing new and relevant information for the diagnosis of neoplasms in the sheep species.

Keywords: Ruminant. Tumour. Necropsy. Histopathology. Sheep diseases.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 NEOPLASMAS EM OVINOS	9
2.1.1 Principais neoplasmas descritos em ovinos	10
2.1.1.1 Sistema tegumentar	10
2.1.1.2 Sistema respiratório	12
2.1.1.3 Sistema digestório	13
2.1.1.4 Sistema hematopoiético	14
2.1.1.5 Sistema hepatobiliar	15
2.1.1.6 Outros sistemas	17
2.1.2 Imuno-histoquímica	18
3 ARTIGO - PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ASPECTS OF NEOPLASMS IN SHEEP	35 19
4 CONCLUSÃO.....	49
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Doenças neoplásicas são consideradas incomuns em ovinos, principalmente quando comparado a outras espécies de animais de produção (ANDERSON; SANDISON, 1968; CARVALHO et al., 2014; HAMIR, 1985; PLUMMER, 1956; RAMOS et al., 2008). Por este motivo, a sua ocorrência normalmente não gera grandes perdas econômicas nesta espécie (FELDMAN, 1931). Exceto em algumas regiões do mundo, onde uma elevada incidência de neoplasias ocasionalmente é relatada (HAWKINS; SWAN; CHAPMAN, 1981; WEBSTER, 1966).

Apesar de haver descrição de uma grande variedade de neoplasmas em ovinos, a disponibilidade de dados precisos referentes à sua prevalência e distribuição é limitada (ELSE, 2007). Além disso, estas informações podem variar bastante devido a diversos fatores, como: diferença entre as raças; localização geográfica; sistema de criação; idade de abate; exposição a substâncias carcinógenas ou agentes infecciosos; e população de animais selecionada para cada estudo (ELSE, 2007; ROSS, 1984).

Na literatura, são poucos os artigos científicos que, além de investigar a prevalência de neoplasmas, também detalham a suas características patológicas nesta espécie e utilizam técnicas auxiliares como a imuno-histoquímica (IHQ) (ANDERSON; SANDISON, 1968; CARVALHO et al., 2014; CORDES; SHORTRIDGE, 1971; FELDMAN, 1931; HEAD, 1990; RAMOS et al., 2008; WEBSTER, 1966). Em razão disso, o objetivo deste estudo foi caracterizar a prevalência e aspectos macroscópicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos dos neoplasmas de ovinos submetidos à rotina diagnóstica do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) num período de 40 anos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NEOPLASMAS EM OVINOS

Neoplasma consiste em um tecido anormal, de crescimento incoordenado e que persiste mesmo depois de cessado o estímulo que o desencadeou (CULLEN; PAGE; MISDORP, 2002). Pode ser classificado como benigno, o qual é considerado curável, pois não invade tecidos adjacentes ou se dissemina para outros órgãos; ou como maligno, sendo geralmente invasivo e metastático, o que resulta no comprometimento das funções orgânicas e morte (NEWKIRK; BRANNICK; KUSEWITT, 2017). Esta alteração se desenvolve em consequência de mutações que podem ocorrer de forma espontânea ou ser induzidas por agentes infecciosos, substâncias químicas mutagênicas, radiação, entre outras causas (CULLEN; BREEN, 2017; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Em medicina veterinária, a área da oncologia vem se destacando cada vez mais, com estudos voltados especialmente para o diagnóstico e tratamento de neoplasmas em cães e gatos (NEWKIRK; BRANNICK; KUSEWITT, 2017). A sua ocorrência em animais de produção é considerada menos frequente (ELSE, 2007). No entanto, quando associado a agentes infecciosos ou fatores ambientais, pode haver o acometimento de vários animais do mesmo rebanho e gerar perdas econômicas significativas (NEWKIRK; BRANNICK; KUSEWITT, 2017).

Em ovinos, o desenvolvimento de neoplasmas é infrequente quando comparado a outras espécies de animais de produção (ANDERSON; SANDISON, 1968; CARVALHO et al., 2014; HAMIR, 1985; PLUMMER, 1956; RAMOS et al., 2008) e, por isso, geralmente não constitui um fator que gera grandes perdas financeiras na ovinocultura (FELDMAN, 1931). Entretanto, o contrário ocasionalmente é observado em algumas regiões do mundo, como ocorre na Austrália, onde há uma alta incidência de carcinoma de células escamosas (CCE) vulvares, sendo que nestes casos, o neoplasma tem importância econômica nesta espécie (HAWKINS; SWAN; CHAPMAN, 1981).

Por ocorrerem de forma esporádica, há poucos estudos disponíveis na literatura que investiguem a prevalência dos neoplasmas em ovinos e suas características patológicas e imuno-histoquímicas (ANDERSON; SANDISON, 1968; CARVALHO et al., 2014; CORDES; SHORTRIDGE, 1971; FELDMAN, 1931; HEAD, 1990; RAMOS et al., 2008; WEBSTER, 1966). Sabe-se que a obtenção de informações acuradas referentes à prevalência e distribuição de neoplasmas nesta espécie é limitada. As mesmas podem variar bastante entre as diferentes

raças, localizações geográficas e sistemas de criação (ELSE, 2007). Além disso, acredita-se que diversos outros fatores também possam estar envolvidos nessa grande variação de dados entre as diferentes regiões do mundo (HEAD, 1990).

A idade de abate dos animais provavelmente está entre os fatores que podem influenciar a prevalência de neoplasmas em ovinos (ROSS, 1984). Sabe-se que em geral a incidência de neoplasmas em mamíferos aumenta conforme o avanço da idade (ELSE, 2007). Por este motivo, um dos fatores relacionado a esta baixa frequência, é o fato desta espécie ser predominantemente destinada à produção de carne na maioria dos países, o que faz com que os animais sejam abatidos ainda muito jovens (ELSE, 2007; HENDERSON, 2007).

Outro fator relacionado a esta variação de dados é a exposição dos animais de algumas regiões a determinadas substâncias carcinógenas ou agentes virais (ELSE, 2007). Isto resulta na maior incidência de alguns neoplasmas, como ocorre na Nova Zelândia e África, onde há uma alta prevalência de adenocarcinoma intestinal e adenocarcinoma pulmonar, respectivamente (BASTIANELLO, 1982; CORDES; SHORTRIDGE, 1971; NEWELL; ROSS; RENNER, 1984; ROSS, 1980; WEBSTER, 1966). Por fim, a população de animais selecionada para cada estudo também é um fator que influencia nos tipos de neoplasmas mais frequentes (ELSE, 2007). Desta forma, trabalhos que avaliam somente ovinos provenientes de abatedouros possivelmente faz com que os neoplasmas letais sejam subrepresentados, pois este grupo geralmente é constituído por animais saudáveis, ao contrário do que é observado em estudos que envolvem animais de laboratórios de diagnóstico (ROSS, 1984).

2.1.1 Principais neoplasmas descritos em ovinos

Na literatura, há descrição de uma grande variedade de neoplasmas que acometem ovinos em diferentes regiões do mundo, entretanto, alguns tipos histológicos se destacam (ELSE, 2007; HEAD, 1990). Considerando estudos que avaliaram um número expressivo de animais, tanto provenientes de abatedouros como de laboratórios de diagnóstico (BASTIANELLO, 1982; HEAD, 1990; ROSS, 1984), alguns neoplasmas mais frequentes terão suas principais características apresentadas de acordo com o sistema orgânico afetado.

2.1.1.1 Sistema tegumentar

Neoplasmas que se originam da pele e tecido subcutâneo são em geral os mais comuns em animais domésticos (MADEWELL, 1981). Em ovinos, o CCE se destaca como o tumor

mais frequente na pele e também em olhos e tecidos perioculares (BASTIANELLO, 1982; CARVALHO et al., 2014; HEAD, 1990; RAMOS et al., 2008). Este é um neoplasma epitelial maligno, originado dos ceratinócitos, que se caracteriza por apresentar um crescimento lento, ser altamente invasivo, destrutivo e, ocasionalmente, metastático (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; HEAD, 1990). A sua etiologia é considerada multifatorial em ovinos, no entanto, é principalmente associada à exposição crônica à radiação solar de regiões da pele com pouca pigmentação e com pelos esparsos (LLOYD, 1961; MÉNDEZ et al., 1997). Além desta etiologia, sugere-se também que o seu desenvolvimento possa estar associado à infecção por papilomavírus ovino (TILBROOK; STERRETT; KULSKI, 1992; VITIELLO et al., 2017).

A maioria dos animais afetados tem acima de três anos de idade (ELSE, 2007). A raça Merino está entre as mais acometidas e, em alguns casos, o tumor é observado em vários animais do mesmo rebanho (HAWKINS; SWAN; CHAPMAN, 1981; LLOYD, 1961). Na pele, a região dorsal das orelhas, pálpebras, plano nasal e junções mucocutâneas da vulva e ânus são comumente afetadas (LLOYD, 1961). As lesões podem ser solitárias ou múltiplas, se caracterizam inicialmente por eritema, descamação, formação de crostas e evoluem para nódulos, massas ou placas, geralmente ulceradas, que invadem tecidos subjacentes (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; MAULDIN; KENNEDY, 2016; MÉNDEZ et al., 1997). Na histologia, há proliferação de ceratinócitos neoplásicos arranjados em ilhas, fitas, cordões ou ninhos, com formação central de lamelas de ceratina concêntrica (pérolas de ceratina) (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; MAULDIN; KENNEDY, 2016). Estas características histológicas podem variar bastante conforme o grau de diferenciação das células neoplásicas, podendo o tumor ser classificado como bem, moderadamente ou pouco diferenciado (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

Outros neoplasmas cutâneos são menos comuns nesta espécie e, dentre eles, inclui-se o papiloma, o melanoma maligno, o fibroma e o fibrossarcoma (BASTIANELLO, 1982; HEAD, 1990). O papiloma é observado de forma solitária ou multifocal, principalmente nas regiões da face, orelhas, membros e mamilos (HEAD, 1990). Seu desenvolvimento é associado à infecção por papilomavírus ovino (MAULDIN; KENNEDY, 2016). O melanoma maligno é observado em animais jovens e adultos, se caracteriza por ser altamente metastático e ocorre em regiões pigmentadas da pele, sendo principalmente descrito em ovinos da raça Suffolk (ELSE, 2007; HEAD, 1990; ROSS, 1984). Por fim, o fibroma e o fibrossarcoma são observados em ovinos de todas as faixas etárias, apresentam lesões geralmente solitárias, que podem ser extensas, mas que geralmente não metastatizam (HEAD, 1990).

2.1.1.2 Sistema respiratório

O tumor enzoótico intranasal e o adenocarcinoma pulmonar são os principais neoplasmas do sistema respiratório de ovinos (BASTIANELLO, 1982; ELSE, 2007; HEAD, 1990). O tumor enzoótico intranasal, também conhecido como adenocarcinoma nasal enzoótico, é uma doença contagiosa, caracterizada por formação de neoplasmas originados da mucosa etmoidal (SHARP; HERAS, 2007). A doença apresenta ampla distribuição em todo o mundo, exceto na Austrália e Nova Zelândia, sendo que a taxa de incidência em rebanhos afetados varia de 0,1 a 15% (HERAS et al., 2019; WILSON, 2017). O seu desenvolvimento é associado à infecção por um retrovírus denominado vírus do tumor nasal enzoótico 1 (VTNE-1), o qual é intimamente relacionado ao retrovírus ovino jaagsiekte, o agente etiológico do adenocarcinoma pulmonar em ovinos (CASWELL; WILLIAMS, 2016; WILSON, 2017). Acredita-se que ocorra uma relação sinérgica entre estes dois vírus e a coexistência de ambos os neoplasmas em um mesmo animal também é descrita (SHARP; HERAS, 2007).

A doença é observada principalmente em animais adultos entre três a cinco anos de idade (HERAS et al., 2019). Clinicamente, pode haver secreção nasal seromucosa, dispneia, estertor respiratório, tosse, espirro, exoftalmia, deformidade facial e fístula cutânea (HERAS et al., 2019; WILSON, 2017). Na macroscopia, há formação de uma massa uni ou bilateral, multinodular, esbranquiçada a rosa-avermelhada, firme e com aspecto friável (CASWELL; WILLIAMS, 2016; WILSON, 2017). Além disso, pode-se observar também a invasão para tecidos adjacentes como ossos, seios paranasais, órbita e gengiva, no entanto, metástases não são relatadas (WILSON, 2017). Histologicamente, o tumor consiste em um adenocarcinoma de baixo grau, com proliferação de células epiteliais arranjadas em padrão papilar, tubular, acinar ou sólido (HERAS et al., 2019).

O adenocarcinoma pulmonar ovino, também denominado de adenomatose pulmonar ou jaagsiekte, é uma doença contagiosa de etiologia viral que apresenta ampla distribuição em vários países dos continentes da Europa, África, América e Ásia (CASWELL; WILLIAMS, 2016; SHARP; HERAS, 2007). Em rebanhos infectados, o neoplasma pode acometer até 20% dos animais, geralmente com idade entre dois a quatro anos (WILSON, 2017). Dentre os sinais clínicos, descreve-se principalmente dispneia, taquipneia, intolerância ao exercício, secreção nasal, tosse e perda de peso (CASWELL; WILLIAMS, 2016). Macroscopicamente, observam-se grandes massas firmes e acinzentadas, multifocais a coalescentes em meio ao parênquima pulmonar (CASWELL; WILLIAMS, 2016; WILSON, 2017). Metástases são ocasionalmente descritas em linfonodos regionais, mas raramente acometem tecidos extratorácicos (SHARP;

HERAS, 2007). Na microscopia, a lesão é compatível com um carcinoma bronquiolo-alveolar bem diferenciado, com células distribuídas em padrão lepídico, papilar ou acinar (CASWELL; WILLIAMS, 2016; WILSON, 2017).

Em ambos os neoplasmas, as lesões histológicas são características, por isso, a IHQ geralmente não é necessária para a confirmação do diagnóstico (DAGLEISH; BENAVIDES; CHIANINI, 2010; HERAS et al., 2019). Apesar disso, nos casos em que é preciso diferenciar neoplasmas induzidos por estes agentes virais de casos espontâneos, o uso da IHQ pode ser útil (DAGLEISH; BENAVIDES; CHIANINI, 2010). Anticorpos desenvolvidos com proteínas virais do retrovírus ovino jaagsiekte podem ser utilizados para a confirmação de adenocarcinoma pulmonar de etiologia viral (DAGLEISH; BENAVIDES; CHIANINI, 2010; HERAS et al., 2019). Em casos de tumor enzoótico intranasal, o uso destes mesmos anticorpos também é possível devido à reação cruzada descrita entre estes dois agentes virais, no entanto, a especificidade e sensibilidade nesses casos são consideradas baixas (HERAS et al., 2019).

2.1.1.3 Sistema digestório

Dentre os tumores que afetam o sistema digestório de ovinos, destaca-se o adenocarcinoma intestinal (BASTIANELLO, 1982; CORDES; SHORTRIDGE, 1971; HEAD, 1990; ROSS, 1984; WEBSTER, 1966). A sua ocorrência varia bastante entre as diferentes regiões do mundo, sendo altamente descrito na Nova Zelândia e Austrália (CORDES, SHORTRIDGE, 1971; WEBSTER, 1966; ROSS, 1984). A sua etiologia é desconhecida, entretanto, sugere-se que a exposição a algumas substâncias carcinógenas, como samambaia (*Pteridium spp.*), herbicidas e antiparasitários, associada a uma predisposição genética, possam estar envolvidos no seu desenvolvimento (EVANS, 1976; MCCREA; HEAD, 1981; NEWELL; ROSS; RENNER, 1984; ROSS, 1984; WEBSTER, 1966). O neoplasma é observado principalmente em animais acima de cinco anos de idade e na maioria dos casos é considerado apenas como um achado incidental de abate (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). No entanto, alguns sinais clínicos também podem ser observados, como perda de peso e distensão abdominal devido à ascite (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

Na macroscopia, o tumor geralmente se desenvolve no jejuno como uma massa polipoide ou placoide, firme, brancacenta, que se projeta para o lúmen ou com um espessamento fibroso anelar da parede intestinal (MUNDAY; LOHR; KIUPEL, 2017; UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). A invasão de células neoplásicas em vasos linfáticos mesentéricos faz com que o neoplasma se desenvolva em diferentes pontos do intestino, o que mimetiza a

presença de múltiplos tumores primários (HEAD, 1990). Metástases por implantação em superfícies serosas da cavidade abdominal e disseminação vascular para linfonodos mesentéricos são comuns. Raramente, metástases também podem ser observadas no fígado e pulmão (ELSE, 2007; UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016). Na histologia, há proliferação de células epiteliais bem diferenciadas a altamente anaplásicas, arranjadas em ácinos irregulares, ninhos ou isoladamente e entremeadas por acentuada reação desmoplásica (UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

Outros tipos de neoplasmas primários do sistema digestório são em geral incomuns (BASTIANELLO, 1982; ROSS, 1984). Entretanto, no estudo de Head (1990) uma alta frequência de papilomas e fibropapilomas ruminais também foi observada. Estes tumores são considerados apenas achados incidentais (MUNDAY; LOHR; KIUPEL, 2017), sendo geralmente observados em animais acima de três anos de idade (HEAD, 1990). As lesões se caracterizam por múltiplos nódulos exofíticos na mucosa ruminal, pedunculados ou sésseis, medindo até 2 cm (ELSE, 2007; HEAD, 1990). Apesar da apresentação macroscópica ser bastante característica, alguns CCEs podem ficar semelhantes (HEAD, 1990). Na histologia, observa-se espessamento da epiderme que formam projeções digitiformes irregulares e anastomosantes em direção a lâmina própria, a qual é constituída por proliferação de células fusiformes e estreladas (NORVAL et al., 1985). Em um estudo experimental, escassas partículas virais de papilomavírus ovino já foram isoladas de algumas destas lesões, no entanto, acredita-se que o seu desenvolvimento não esteja associado a uma etiologia viral nesta espécie (NORVAL et al., 1985).

2.1.1.4 Sistema hematopoiético

O linfoma é o neoplasma hematopoiético mais frequente em ovinos (BASTIANELLO, 1982; HEAD, 1990; ROSS, 1984). Outros tipos histológicos, como mastocitoma e timoma, são apenas ocasionalmente descritos nesta espécie (BASTIANELLO, 1982; CORDES; SHORTRIDGE, 1971; HEAD, 1990). Em ovinos, o linfoma pode ser observado em animais de todas as faixas etárias, sendo principalmente descrito na sua apresentação multicêntrica, que afeta órgãos linfoides (como linfonodos, baço e timo) e não linfoides (como fígado, rins, coração, entre outros) (ELSE, 2007). Além desta apresentação, outras formas também são descritas nesta espécie, como alimentar, cutânea e tímica (HEAD, 1990; JOHNSTONE; MANKTELOW, 1978). Devido a esta grande variação de apresentações da doença, diversos

sinais clínicos podem ser observados como anorexia, letargia, perda de peso, dispneia, tosse, vômito, diarreia, lesões cutâneas, entre outros (VALLI; KIUPEL; BIENZLE, 2016).

Este neoplasma pode ocorrer de forma esporádica ou, menos comumente, em surtos (GREEN; HERBST; SCHNEIDER, 1988; HEAD, 1990). Nos casos em que vários animais do mesmo rebanho são acometidos, acredita-se que a sua ocorrência esteja associada à infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) ou a um vírus intimamente relacionado a este (BASTIANELLO, 1982; GREEN; HERBST; SCHNEIDER, 1988; HEAD, 1990). Entretanto, apesar de em condições experimentais a doença ser facilmente reproduzida quando ovinos são infectados com o VLB, acredita-se que a infecção natural por este retrovírus em ovinos seja incomum (ELSE, 2007; GATEI et al., 1989; MURAKAMI et al., 1994).

Na macroscopia, os linfonodos estão aumentados e, ao corte, há perda da arquitetura nodal com substituição por uma massa homogeneamente brancacenta e macia (padrão difuso) ou, raramente, há nódulos brancacentos multifocais a coalescente (padrão folicular) (FIGHERA; GRAÇA, 2016). Em outros órgãos as lesões são semelhantes, sendo que no baço e no fígado pode haver um aumento difuso do órgão ou apresentarem múltiplas pápulas ou nódulos brancacentos, macios, com distribuição multifocal aleatória (FIGHERA; GRAÇA, 2016; JOHNSTONE; MANKTELOW, 1978). De forma geral, na histologia observa-se proliferação de células redondas, monomórficas e dispostas em manto (NEWKIRK; BRANNICK; KUSEWITT, 2017). Adicionalmente, com a técnica de IHQ é possível determinar a origem das células neoplásicas utilizando principalmente os anticorpos CD3 e CD79a, os quais são imunomarcadores de linfócitos T e B, respectivamente (VALLI; KIUPEL; BIENZLE, 2016).

2.1.1.5 Sistema hepatobiliar

Apesar de pouco frequente, os ovinos costumam ser mais acometidos por neoplasmas primários do sistema hepatobiliar quando comparados a outras espécies de ruminantes (ANDERSON; SANDISON, 1968; WEBSTER, 1966). Dentre eles, o carcinoma hepatocelular se destaca como o mais comum nesta espécie (ANDERSON; SANDISON, 1968; HEAD, 1990). Nesses casos, sinais clínicos geralmente não são observados, exceto quando o neoplasma se torna muito extenso, o que pode resultar em emagrecimento (HEAD, 1990). Macroscopicamente o tumor pode se apresentar na forma massiva, nodular ou difusa (CULLEN, 2017; CULLEN; STALKER, 2016). A forma massiva é a mais observada e se caracteriza por uma massa marrom-clara, com a superfície irregular, solitária, extensa, que pode

envolver um ou mais lobos (CULLEN, 2017). Ao corte é macia, multilobulada, marrom-clara, entremeada por áreas avermelhadas e amareladas, que correspondem a áreas de hemorragia e necrose, respectivamente (HEAD, 1990). Na histologia, observa-se perda da arquitetura lobular e proliferação de hepatócitos neoplásicos arranjados em padrão trabecular, pseudoglandular, sólido ou esquiroso, com focos de hematopoiese extramedular (CULLEN, 2017; ELSE, 2007).

Metástases são pouco frequentes e nos casos em que as células neoplásicas são bem diferenciadas, o tumor deve ser distinguido principalmente de um adenoma hepatocelular (CULLEN, 2017; PONOMARKOV; MACKEY, 1976). Desta forma, alguns fatores que devem ser considerados para o diagnóstico de um carcinoma hepatocelular são: presença de trabéculas irregulares; pleomorfismo celular; células atípicas; multinucleadas; figuras de mitoses; necrose; hemorragia; invasão vascular; e metástases (CULLEN, 2017). Em ovinos jovens, este neoplasma também deve ser diferenciado do hepatoblastoma, o qual se origina de células precursoras hepáticas primitivas e também é descrito em ovinos nesta faixa etária (ELSE, 2007; HEAD, 1990). Ambos os neoplasmas podem compartilhar algumas características macroscópicas e histológicas semelhantes e o uso da IHQ pode auxiliar na confirmação do diagnóstico (CULLEN, 2017; CULLEN; STALKER, 2016). Desta forma, o carcinoma hepatocelular apresenta uma imunomarcação moderada a intensa para o anticorpo Hep Par1; o contrário do que é observado no hepatoblastoma, onde as células geralmente são negativas ou fracamente positivas para Hep Par1, devido ao seu estágio imaturo de desenvolvimento (CULLEN, 2017).

O colangiocarcinoma ocorre menos frequentemente em ovinos e é altamente agressivo e metastático (ANDERSON; SANDISON, 1968; CULLEN, 2017; HEAD, 1990). Os animais acometidos geralmente apresentam caquexia e ascite (ELSE, 2007). Na macroscopia, pode-se observar a apresentação multinodular, caracterizada por numerosos nódulos brancos ou marrom-amarelados, geralmente umbilicados, firmes, variando entre 0,5 a 4,0 cm e, menos frequentemente, há a forma massiva que afeta um ou mais lobos (CULLEN, 2017). Na histologia, quando bem diferenciado, há proliferação de células cúbicas a colunares arranjadas em ácinos que, por vezes, formam projeções papilíferas (CULLEN; STALKER, 2016). Em casos pouco diferenciados, as células são altamente pleomórficas e se arranjam em grupos, ilhas ou cordões, podendo haver diferenciação escamosa, e apenas ocasionalmente são observados ácinos (CULLEN, 2017; PONOMARKOV; MACKEY, 1976). As células são entremeadas por tecido conjuntivo fibroso geralmente denso (reação esquirosa), resultando na textura firme do neoplasma (CULLEN; STALKER, 2016). Mucina pode ser observada no interior de ácinos e se caracteriza por deposição de material amorfo eosinofílico ou fracamente basofílico, o qual é

positivo para Azul Alciano e Ácido Periódico de Schiff (CULLEN, 2017). Na IHQ as células neoplásicas são positivas para citoqueratinas de alto e baixo peso molecular, no entanto, a citoqueratina 7 (CK7) é considerado um imunomarcador mais específico para o epitélio biliar e pode auxiliar na confirmação do diagnóstico de colangiocarcinomas pouco diferenciados (CULLEN, 2017).

2.1.1.6 Outros sistemas

Outros tipos histológicos de neoplasmas ocorrem ocasionalmente em ovinos e acometem diferentes sistemas orgânicos. Alguns destes serão citados no Quadro 1, baseando-se em dados publicados em estudos anteriores (BASTIANELLO, 1982; HEAD, 1990; ROSS, 1984).

Quadro 1 – Neoplasmas relatados em ovinos de forma incomum a rara

Sistema	Neoplasmas benignos	Neoplasmas malignos
Locomotor	Condroma Osteoma Fibroma Rabdomioma	Condrossarcoma Ostessarcoma Fibrossarcoma Rabdomiossarcoma Hemangiossarcoma
Nervoso	Neurofibroma	Meningioma Astrocitoma Meduloblastoma
Cardiovascular	Rabdomioma Fibroma Hemangioma Lipoma	Rabdomiossarcoma Fibrossarcoma Hemangiossarcoma Lipossarcoma
Urinário	Adenoma renal Fibroma Leiomioma	Adenocarcinoma renal Carcinoma de células renais Nefroblastoma Carcinoma urotelial Leiomiossarcoma
Reprodutor	Leiomioma Fibroleiomioma Teratoma Leydigoma Seminoma	Tumor de células granulosas Adenocarcinoma uterino Hemangiossarcoma testicular
Endócrino	Adenoma adrenocortical Adenoma de tireoide Adenoma de pituitária Neurofibroma de adrenal Feocromocitoma	Carcinoma cortical de adrenal
Mesotélio		Mesotelioma

2.1.2 Imuno-histoquímica

A IHQ consiste em uma técnica auxiliar de diagnóstico, que combina reações imunológicas e químicas, e permite o reconhecimento de抗ígenos por meio de anticorpos específicos (RAMOS-VARA; BORST, 2017). Esta técnica tem sido amplamente utilizada em laboratórios veterinários para o diagnóstico de doenças neoplásicas e infecciosas, apresentando várias vantagens em relação a utilização de outras técnicas auxiliares (RAMOS-VARA; KIUPEL; MILLER, 2005). Dentre elas, está a possibilidade de correlacionar a detecção de抗ígenos com as lesões histológicas, além de permitir o uso de materiais arquivados, fixados em formol e parafinizados para a realização de estudos retrospectivos (RAMOS-VARA; KIUPEL; MILLER, 2005).

O uso da IHQ na área da oncologia veterinária, além de auxiliar na confirmação do diagnóstico de neoplasias, também pode contribuir em alguns casos para a obtenção de informações referentes ao prognóstico e escolha do melhor tratamento (KIUPEL et al., 2004; TERUYA-FELDSTEIN, 2010). Apesar da grande variedade de anticorpos primários disponíveis, sabe-se que variações na imunomarcação entre as diferentes espécies de animais podem ocorrer e, por isso, a interpretação dos resultados deve ser realizada com cautela (RAMOS-VARA; BORST, 2017). Um exemplo disso é o que ocorre com o imunomarcador Melan-A, o qual é comumente utilizado para a confirmação de melanomas em várias espécies, exceto em equinos em que a imunomarcação de tumores melanocíticos não é observada com este anticorpo (RAMOS-VARA et al., 2014).

Em ovinos, a IHQ é especialmente utilizada em doenças infecciosas para a detecção de variados agentes (DAGLEISH; BENAVIDES; CHIANINI, 2010). Nos casos de doenças neoplásicas, a técnica é pouco explorada nesta espécie, sendo mais utilizada em relatos de caso esporádicos (ANJOS et al., 2010; POLINAS et al., 2020; PREZIUSO et al., 2002; REZAIE; GOLSHAH; NADDAF, 2012; VEMIREDDI; LANGOHR; THACKER, 2007). Sendo assim, a ampliação do uso da técnica em estudos de caracterização que envolvam variados tipos histológicos de neoplasmas pode contribuir para que se conheça o comportamento de diferentes imunomarcadores nesta espécie.

**3 ARTIGO - PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ASPECTS OF 35
NEOPLASMS IN SHEEP**

Artigo submetido ao Journal of Comparative Pathology.

1 **Pathological and immunohistochemical aspects of 35 neoplasms in sheep**

2

3 **Stella Maris P de Melo*, Alex dos Santos*, Éryca C Lamego*, Camila Tochetto*,**
4 **Mariana M Flores*, Rafael A Fighera*, Luiz Francisco Irigoyen*, Glaucia D Kimmers***

5

6 **Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal
7 de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria-RS, Brasil.*

8

9

10 **Corresponding author:**

11 G. D. Kimmers,

12 Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de
13 Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria-RS, Brasil.

14 E-mail: glaukommers@yahoo.com

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

Summary

27 Neoplasms in sheep are infrequent, and their prevalence and histological types can vary widely
28 in different geographic regions. The objective of this study was to determine the prevalence of
29 neoplasms in sheep in the Veterinary Pathology Laboratory (LPV) of the Federal University of
30 Santa Maria (UFSM) for 40 years (1980–2019) and characterise its macroscopic,
31 histopathological, and immunohistochemical aspects. Information regarding the profile of the
32 animals (age, breed, and sex) and the clinical, macroscopic, and histological changes were
33 collected from necropsy reports and histopathological examinations of cases diagnosed with
34 neoplasms. During this period, 35 (1.8%) of 1,945 cases examined had a diagnosis of neoplasia;
35 most being classified as malignant (30/35). In general, the most prevalent neoplasm was
36 squamous cell carcinoma (17/35), and it mainly affected the integumentary system (10/17).
37 Other types of neoplasms occurred less frequently, consisting of: lymphomas (7/35), intestinal
38 adenocarcinomas (3/35), fibromas (3/35), hepatocellular carcinoma (1/35),
39 cholangiocarcinoma (1/35), fibrosarcoma (1/35), papilloma (1/35), and ruminal fibropapilloma
40 (1/35). Histologically, the neoplasms of epithelial origin were characterised by cubic or
41 polyhedral cells arranged in islands, ribbons, cords, nests, acini, or ducts. The tumours of
42 mesenchymal origin or those with round cells presented with spindles or round cells arranged
43 in bundles or mantle. Some histological types, such as cholangiocarcinoma and fibrosarcoma,
44 showed particularly unusual macroscopic and histological changes in this case series.
45 Immunohistochemistry was mainly performed for malignant tumours, in some cases, to
46 determine the origin of the neoplastic cells, which helped confirming the diagnosis. Through
47 this study, it was possible to establish the frequency and explore the pathologic and
48 immunohistochemical aspects of neoplasms in sheep over 40 years in a veterinary pathology
49 diagnostic service.

50

51 *Keywords:* ovine, pathology, tumours, immunohistochemistry.

52

53 **Introduction**

54 Neoplastic diseases are generally considered uncommon in sheep (Else, 2007). In the literature,
55 most studies involving slaughterhouses and diagnostic laboratories demonstrate a low
56 prevalence of neoplasms in this species, especially when compared to other farm animals
57 (Plummer, 1956; Misdorp, 1967; Hamir, 1985; Ramos et al, 2008; Carvalho et al, 2014). In
58 contrast, some regions of the world have a high incidence of neoplasms in sheep; for example,
59 intestinal adenocarcinoma is considered atypically frequent in New Zealand (Webster, 1966).

60 Due to their generally low prevalence, accurate information regarding prevalence and
61 distribution of neoplasms in sheep is limited. Additionally, data can vary greatly across different
62 breeds, geographic locations, and rearing systems (Else, 2007). In the literature, only a few
63 systematic studies investigate the frequency of neoplasms in sheep and detail their macroscopic
64 and histological characteristics (Feldman, 1931; Webster, 1966; Anderson and Sandison, 1967;
65 Cordes and Shortridge, 1971; Head, 1990). In addition, immunohistochemistry (IHC) is mostly
66 used in case reports, being minimally explored in larger studies of tumour characterisation in
67 sheep (Preziuso et al, 2002; Vemireddi et al, 2007; Anjos et al, 2010; Rezaie et al, 2012; Polinas
68 et al, 2020).

69 Thus, the aim of this study was to evaluate the prevalence and macroscopic,
70 histopathological, and immunohistochemical characteristics of sheep neoplasms submitted to
71 the diagnostic routine of the Veterinary Pathology Laboratory (LPV) of the Federal University
72 of Santa Maria (UFSM) within 40 years.

73

74 Material and Methods

75 Ovine necropsy and histopathologic reports of cases submitted to LPV-UFSM between January
76 1980 and December 2019 were reviewed, and all cases with a diagnosis of neoplasm were
77 separated. The total number of sheep exams during this period was also computed. The
78 histopathological examinations included biopsies and necropsy materials performed in the field
79 and submitted to the laboratory for histopathological analysis. Ten cases of squamous cell
80 carcinomas (SCCs) and two cases of lymphoma have been included in previous studies (Anjos
81 et al., 2010; Rissi et al., 2010).

82 Information regarding the animals (age, breed, and sex) and clinical, macroscopic, and
83 histological data were collected from the reports. The sheep were classified as pure or mixed
84 breed, and their ages were computed in years. Sheep declared as crossbred were considered as
85 mixed breed. The animals were classified as male or female, regardless of being castrated or
86 not.

87 Macroscopic information was obtained from the descriptions presented in the reports and
88 complemented with the observations of the photographs from the case files, when available. A
89 histological reassessment was carried out for cases with available paraffinized tissues. For this,
90 new histological sections (3 µm thick) were prepared and stained with hematoxylin-eosin (HE).
91 The SCCs were graded according to the histological criteria established in the literature
92 (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017). Other histochemical techniques have also been used,
93 such as Alcian Blue (pH 2.5) (Gaffney, 1992) and Schiff's Periodic Acid (PAS), as
94 recommended by the commercial kit (EasyPath).

95 IHC was performed in all cases with enough paraffinized tissues to prepare new histological
96 slides. The protocols used are described in Table 1. IHC with antibodies to pan-cytokeratin,
97 bovine papillomavirus 1 (BPV1), vimentin, von Willebrand factor (factor VIII), smooth muscle
98 alpha-actin (α -SMA), CD79-acy, CD3, Hepatocyte Paraffin 1 (Hep Par1), and cytokeratin 7
99 (CK7) was performed at LPV-UFSM. The IHC with cytokeratin antibody AE1/AE3 and CDX2

100 was performed and evaluated in a private laboratory. Three μm -thick sections of the primary
101 neoplasms were used. Endogenous peroxidase was blocked with Envision Flex peroxidase
102 block for 5 min or hydrogen peroxide (3% hydrogen peroxide) twice for 10 min. The
103 nonspecific reactions were blocked with a protein blocker (EP-12-20532, EasyPath) at room
104 temperature (25°C) for 10 min or casein (skimmed milk powder) for 30 min. The chromogen
105 used was 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstaining was performed with Harris'
106 hematoxylin. As positive controls, previously tested cases were used for each antibody. As
107 negative controls for each case, a section of the analysed tissue incubated with the antibody
108 diluent (phosphate buffer with Tween® 20-Sigma, PBST) was used.

109

110 Results

111 During the study period, 868 necropsies and 1,077 histopathological examinations of 1,945
112 sheep were performed. Of these, 35 (1.8%) were diagnosed with neoplasms; six underwent
113 necropsies (6/868; 0.7%) and 29 underwent histopathological examinations (29/1,077; 2.7%).

114 Information regarding the histological type, the primary organ affected, and the number of
115 cases is detailed in Table 2. The majority of diagnosed neoplasms were malignant (30/35). The
116 most affected system was the integumentary (14/35), followed by eyes and periocular tissues
117 (7/35), hematopoietic (7/35), digestive (4/35), hepatobiliary (2/35), and reproductive (1/35). In
118 general, the main clinical changes in neoplasms observed in the integumentary system, eyes,
119 and periocular tissues were the presence of focal (17/21) or multifocal (4/21) lesions, which
120 were usually ulcerations (12/21) with myiasis and intense itching (3/21), occasionally relapsing
121 after surgical removal (2/21). An increase in abdominal volume (ascites) was the main clinical
122 sign observed in cases of intestinal adenocarcinoma (2/3) and cholangiocarcinoma (1/1).
123 Depression and apathy were associated with hepatocellular carcinoma (1/1). In sheep diagnosed

124 with lymphomas, lymphadenomegaly (2/7), progressive weight loss (2/7), and hyperthermia
125 (1/7) were observed.

126 The data on the age, breed, and sex of the animals for each type of neoplasm are detailed in
127 Table 3. The age of the affected animals varied from one to 13 years; the age was not known in
128 four cases. The mean age was 3.9 years, and the median was 4 years. Of the 35 cases, 22 were
129 distributed in four breeds, and eight were mixed-breed; in five cases, the breed was not
130 informed. The most affected breeds were Ile de France (7/22), Corriedale (7/22), Texel (4/22),
131 and Ideal (4/22). Regarding sex, 23 were female and eight were male; in four cases, sex was
132 not reported.

133

134 *Macroscopic, histopathological, and immunohistochemical aspects*

135 *Squamous cell carcinoma (n = 17)*

136 There were nodules and firm masses ranging from 2 to 11 cm; they were focal (14/17) or
137 multifocal (3/17) and mainly affected the ear (7/17), vulva (4/17), eyelid (4/17), and the eye
138 (2/17). In general, the surface was irregular, ulcerated, and covered with blackened crusts. On
139 the cut surface, the lesions were not circumscribed, and they were white with yellow multifocal
140 points (interpreted as keratinisation) and reddish areas (interpreted as haemorrhages). In one
141 case, the neoplasm possibly originated from the cornea; in another case, this information was
142 not available. These two sheep had ruptured eyeballs, and the invasion of the adjacent soft and
143 bone tissues by the neoplasm was also observed.

144 Histologically, the cells were polyhedral; they were also arranged in islands, ribbons, cords,
145 nests, and individualised cells (in varying proportions, depending on the degree of
146 differentiation) and interspersed by a moderate to severe desmoplastic reaction. The cytoplasm
147 was abundant, with round to oval nuclei, loose chromatin, and evident nucleoli. The cellular
148 and nuclear pleomorphisms ranged from moderate to severe, and mitotic figures were frequent.

149 In 12 cases, it was possible to assess the degree of cell differentiation. Of these, eight were
150 classified as well-differentiated SCCs, and there was a predominance of islands and central
151 areas with concentric formations of keratin (keratin pearls; Fig. 1A). Three were classified as
152 moderately differentiated with less intense keratinisation of the neoplastic cells (Fig. 1C), and
153 one case was poorly differentiated with individual or absent keratinisation (Fig. 1E). The
154 immunostaining of the neoplastic cells was strong for pan-cytokeratin in the well-differentiated
155 SCCs (Fig. 1B). However, it was moderate for the moderately (Fig. 1D) and poorly (Fig. 1F)
156 differentiated SCCs. Immunostaining for papillomavirus was negative.

157

158 *Lymphoma (n = 7)*

159 In two cases, only one lymph node was sent for analysis. In the other cases, the liver, kidneys,
160 and heart were also sent for analysis. Grossly, the lymph nodes were diffusely enlarged. On the
161 cut surface, they were soft, and the parenchyma was completely replaced by a homogeneously
162 white mass. In the liver, kidneys, and heart, the multifocal white to coalescent nodules were
163 observed in the middle of the parenchyma, which varied between 0.5 and 2.0 cm.

164 Histologically, there was a round cell proliferation arranged in the mantle and supported by
165 a scarce fibrovascular stroma. The cytoplasm was sparse. There were round nuclei that were
166 condensed to slightly granular chromatin and few evident nucleoli. The cellular and nuclear
167 pleomorphisms varied from mild to moderate, and mitotic figures were uncommon. IHC was
168 performed for six cases; five were positive for CD3 (T lymphocytes) and negative for CD79acy
169 (B lymphocytes), and one case was negative for both immunomarkers.

170

171 *Intestinal adenocarcinoma (n = 3)*

172 In the small intestine, there were multifocal to coalescent areas with firm white thickening
173 surrounding the serosa. Close to this region, white, firm, and exophytic nodules measuring 2-3

174 cm were also observed in the serosa or mucosa; they partially occluded the intestinal lumen in
175 one case.

176 Histologically, the cells were columnar, round, and polyhedral. They were arranged in
177 irregular or individualised acini and interspersed by a moderate to severe desmoplastic reaction.
178 The cytoplasm was moderate, with round to oval nuclei, loose chromatin, and evident nucleoli.
179 Sometimes, the cells had a large intracytoplasmic vacuole, which displaced the nucleus to the
180 periphery, giving an appearance similar to the "signet ring." The cellular and nuclear
181 pleomorphisms ranged from moderate to severe, and mitotic figures were uncommon. On IHC,
182 moderate immunostaining of neoplastic cells for pan-cytokeratin was observed.

183

184 *Hepatocellular carcinoma (n = 1)*

185 There was a pale pink, multinodular, and extensive mass in the middle of the hepatic
186 parenchyma mainly in the right lobe that affected approximately 60% of the organ (Fig. 2A).
187 On the cut surface, this mass was smooth, well-circumscribed, and pink, with yellowish areas
188 in the central region (Fig. 2B).

189 Histologically, there was a proliferation of cubic to polyhedral cells arranged predominantly
190 in a trabecular pattern. The cytoplasm was abundant with round to oval nuclei, granular
191 chromatin, and evident nucleoli (Fig. 2C). The cellular and nuclear pleomorphisms varied from
192 mild to moderate, and the mitotic figures were uncommon. On IHC, moderate to marked
193 immunostaining for Hep Par1 was observed in the neoplastic cells (Fig. 2D) and they were
194 negative for CK7.

195

196 *Cholangiocarcinoma (n = 1)*

197 The serous surface of the liver was diffusely irregular, with whitish, slightly circumscribed,
198 multifocal to coalescent areas that were sometimes nodular and covered by dense aggregates of

199 fibrin (Fig. 3A). The liver parenchyma was firm on cut surface, and there were whitish,
200 irregular, and slightly circumscribed areas. The mediastinal and mesenteric lymph nodes were
201 markedly enlarged and firm, and the parenchyma was almost completely replaced by white
202 masses. Well-circumscribed nodules, ranging from 0.3 to 1.0 cm, were also observed in the
203 middle of the pulmonary parenchyma, mesentery, the serous surface of the spleen, rumen, and
204 abomasum (Fig. 3B), and on the abdominal diaphragmatic surface. Inside the abdominal cavity,
205 approximately 30 litres of yellowish translucent liquid (ascites) were observed.

206 Histologically, round polyhedral cells were predominantly arranged in groups and
207 individualised; less often, they formed small irregular ducts interspersed by a moderate to
208 severe desmoplastic reaction. The cytoplasm was moderate, with round to oval nuclei, slightly
209 aggregated chromatin, and evident nucleoli. Most cells had a morphology similar to the “signet
210 ring,” and there was minimal to moderate intracytoplasmic Alcian Blue and PAS-positive
211 eosinophilic amorphous material (Fig. 3C), interpreted as mucin. The cellular and nuclear
212 pleomorphisms were accentuated, and mitotic figures were uncommon. On IHC, the neoplastic
213 cells immunostained strongly for CK7 (Fig. 3D) and cytokeratin AE1/AE3, but they were
214 negative for Hep Par1 and CDX2.

215

216 *Fibrosarcoma (n = 1)*

217 In the skin of the right cervical region, there was a 17 cm round and firm mass. On the cut
218 surface, there was a poorly circumscribed whitish mass interspersed with yellowish areas and
219 a round central region that contained blackish pasty material (interpreted as necrosis; Fig. 4A).
220 There were also other skin tumours (papules and nodules) mainly affecting the cervical,
221 thoracic, and lumbar regions, as well as the left humerus and femur. The lesions were 0.1-1.5
222 cm and sometimes pedunculated, ulcerated, and covered with blackened crusts. When cut, they

223 were firm, well-circumscribed, and homogeneously white. In the lung, liver, kidneys (Fig. 4B),
224 and adrenal glands, multiple whitish nodules of 0.1-1.5 cm were also observed.

225 Histologically, the cells were fusiform to oval and arranged in interlaced bundles or mantle
226 (Fig. 4C). The cytoplasm was scarce to moderate, with round, oval, or elongated nuclei, slightly
227 granular chromatin, and evident nucleoli. There were extensive areas of necrosis that were
228 sometimes mineralised. The cellular and nuclear pleomorphisms ranged from moderate to
229 severe, and the mitotic figures were frequent. Immunohistochemical staining was positive for
230 Vimentin (Fig. 4D) and negative for pan-cytokeratin, the von Willebrand factor, and α -SMA.

231

232 *Fibroma* ($n = 3$)

233 The tumours were observed in the uterus (1/3) and skin (2/3) of the pre-scapular and foreskin.
234 They were characterised by white nodules that were firm and well-circumscribed when cut. The
235 lump in the foreskin region was ulcerated and covered with blackened crusts. Histologically,
236 the spindle cells were arranged in well-collagenised bundles, with moderate cytoplasm,
237 elongated nuclei, granular chromatin, and little evident nucleoli. The cellular and nuclear
238 pleomorphisms were mild, and mitotic figures were not observed.

239

240 *Papilloma* ($n = 1$)

241 In the perineal region, there were yellowish nodules with irregular surfaces of up to 1 cm.
242 Histologically, the epidermis was moderately hyperplastic, and it formed digitiform, exophytic,
243 and irregular projections. Moderate to severe orthokeratotic hyperkeratosis was observed.

244

245 *Fibropapilloma* ($n = 1$)

246 The rumen mucosa had multiple exophytic nodules with smooth surfaces that were sometimes
247 pedunculated; they measured 1-2 cm. Histologically, there were multiple pedunculated

248 projections of the mucosa covered by hyperplastic epithelium with grossly digitised projections
249 that were irregular and anastomosing towards the lamina propria, which consisted of fibroblasts
250 with moderate to marked collagenisation. IHC revealed no immunostaining for papillomavirus
251 (with anti-BPV1 antibody).

252

253 Discussion

254 We believe that the prevalence of neoplasms in sheep obtained in this study (1.8%), covers the
255 casuistry in the central region of the state of Rio Grande do Sul (RS) in Brazil; this was similar
256 to those reported by other Brazilian studies, which ranged from 1.1-2.1% (Ramos et al, 2008;
257 Almeida et al, 2013; Carvalho et al., 2014). In foreign studies reviewed by the authors, this
258 information was not available. This prevalence was considerably lower than that of neoplasms
259 in cattle (8.73%) in a similar study carried out in the same laboratory (Lucena et al., 2011).

260 In general, most neoplasms in mammals are associated with ageing (Ross, 1984; Else, 2007).
261 However, the average age of the affected animals in this study was 3.9 years, which is not
262 considered as advanced age. One of the factors possibly related to the low average age and
263 prevalence of neoplasms in farm animals, compared with those of dogs and cats, is that they
264 are predominantly intended for meat production, being slaughtered while still young (Else,
265 2007; Henderson, 2007). In addition, it is believed that different external factors, such as
266 exposure to carcinogenic substances, viral infections, and genetic predisposition, may underlie
267 the high incidence of certain neoplasms in sheep in some countries. This has not been observed
268 here or in other Brazilian studies (Webster, 1966; Ross, 1980; Bastianello, 1982; Else, 2007).

269 Cutaneous, ocular, and periocular SCCs stood out as the most frequent neoplasms, and this
270 was consistent with reports by other Brazilian studies (Ramos et al., 2008; Almeida et al., 2013;
271 Carvalho et al., 2014). In other countries with tropical and subtropical climates, such as Africa
272 and Australia, SCC is also one of the commonly diagnosed cutaneous tumours in sheep

273 (Bastianello, 1982; Ross, 1984). In the skin, these tumours developed in woolless areas, such
274 as the ear and vulva region, and it affected breeds with fair skin. These findings corroborate
275 what is described in the literature: SCC usually occurs in areas with little pigmentation and
276 sparse coat, and its development is mainly associated with chronic exposure to solar radiation
277 (Lloyd, 1961). This neoplasm is very infiltrative and destructive; however, metastases are
278 uncommon (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017), and they were not observed in any of the
279 cases in this study. Some SCCs affected the vulvar region. In this location it can affect
280 reproductive life and generate economic losses that can be significant, as described in Australia
281 (Hawkins, 1981). Some authors have also suggested that ovine papillomavirus infection in
282 sheep may be related to its development (Tilbrook et al, 1992; Vitiello et al, 2017), as well as
283 that reported in dogs and cats (Goldschmidt and Goldschmidt, 2017). However, in this study,
284 all cases of SCCs submitted to IHC were negative for papillomavirus antigen. The ocular and
285 periocular regions were the second most frequent sites affected by SCCs. When observed in
286 this region, it is believed that the main aetiology is solar, and it is associated with phenotypic
287 characteristics of some breeds (Méndez et al, 1997).

288 Lymphoma was the second most prevalent neoplasm in this study, which was similarly
289 observed in cattle in the same laboratory where lymphoma was among the most diagnosed
290 (Lucena et al, 2011; Panziera et al, 2014). The multicentric presentation is most common in
291 sheep (Johnstone and Manktelow, 1978; Head, 1990), and this was confirmed in most cases
292 studied. However, other forms, such as alimentary, cutaneous, and thymic forms, have also
293 been described occasionally (Johnstone and Manktelow, 1978; Head, 1990). This neoplasm can
294 occur sporadically or, less frequently, in outbreaks (Green et al, 1988; Head, 1990). Under
295 experimental conditions, the disease is easily reproduced when sheep are infected with the
296 bovine leukosis virus (BLV); however, natural infection with this retrovirus in sheep is
297 considered uncommon (Gatei et al, 1989; Murakami et al, 1994; Else, 2007). With IHC, it was

possible to determine that most cases of lymphoma in this study originated from T cells, the opposite of what is observed in cases of enzootic bovine leukosis in which neoplasms are usually of B cell origin (Valli et al., 2016). In one case, immunostaining was negative for CD3 and CD79acy antibodies; this has been previously reported for cases of lymphomas in cattle (Panziera, 2015). In these cases, it is believed that several factors, which include the prolonged fixation in formaldehyde, may interfere with the immunostaining of neoplastic cells (Panziera, 2015).

Intestinal adenocarcinoma, compared with other histological types, is considered relatively common in sheep (Cordes and Shortridge, 1971; Bastianello, 1982; Ross, 1984; Head, 1990; Else, 2007). Its prevalence can vary widely across different regions of the world, and it is commonly observed in New Zealand and Australia (Dodd, 1960; Webster, 1966; Ross, 1980; Munday et al., 2017). In this study, the low number of animals did not allow to bring statistically significant results. However, three diagnoses of intestinal adenocarcinoma in a group of 35 sheep with neoplasms suggest that the tumour is relatively common among the species. The aetiology of intestinal adenocarcinoma is unknown, but it is believed that its development may be associated with several factors, such as the consumption of bracken fern (*Pteridium* spp.), herbicides, and antiparasites and genetic predisposition (Webster, 1966; Evans, 1968; McCrea and Head, 1981; Newell et al, 1984; Ross, 1984; Else, 2007; Munday et al, 2017). Despite the high casuistry of *Pteridium arachnoideum* poisoning in cattle in the area covered by this laboratory (Lucena et al., 2011; Faccin et al., 2018), it was not possible to establish a correlation between the incidence of these neoplasms in the cases analysed in this study and the consumption of this plant by sheep. Ascites was frequently observed in these animals, and this change resulted from the obliteration of the serous lymphatic vessels by neoplastic emboli (Uzal et al., 2016). Although intestinal adenocarcinomas are highly aggressive and metastatic (Munday et al., 2017), changes in the other organs were not observed in all the cases studied.

323 Other types of neoplasms occur sporadically and affect different organ systems.
324 Hepatobiliary neoplasms are uncommon in most species, and they comprise less than 1% of all
325 neoplasms in dogs and cats (Cullen and Stalker, 2016). Despite this, retrospective studies have
326 shown that the prevalence of hepatobiliary neoplasms is high in dogs and cats in the area
327 covered by this laboratory, corresponding to 7.8-8.39% of neoplasms, respectively (Flores et
328 al, 2013; Togni et al, 2018). Among ruminants, sheep are usually the most affected by
329 hepatocellular carcinomas (Anderson and Sandison, 1967). This neoplasm has been described
330 for all age groups, including animals under one year of age (Anderson and Sandison, 1967;
331 Head, 1990), as observed in the case described previously. The main differential diagnosis of
332 hepatocellular carcinoma in young sheep is hepatoblastoma (Head, 1990), which originates
333 from primitive liver precursor cells (Head, 1990; Else, 2007; Cullen, 2017). Both neoplasms
334 have similar macroscopic and histological characteristics and can be differentiated with IHC
335 (Cullen and Stalker, 2016; Cullen, 2017). In this study, moderate to intense immunostaining
336 was observed for the Hep Par1 antibody; this was consistent with what has been described for
337 hepatocellular carcinoma and contrasting with what has been described for hepatoblastoma,
338 where cells are generally negative or weakly positive for Hep Par1 due to its immature stage of
339 development (Cullen, 2017).

340 Cholangiocarcinoma occurs less frequently in sheep and is invasive and metastatic
341 (Anderson and Sandison, 1967; Head, 1990; Cullen, 2017), as observed in the case described
342 in this study. One of the diagnostic challenges with this neoplasm is to differentiate it from
343 metastases from adenocarcinomas of other origins such as the stomach, intestine, pancreas, and
344 mammary gland (Cullen and Stalker, 2016; Cullen, 2017). For this reason, it is important to
345 note that during the necropsy, the possibility of the neoplasm originating from other possible
346 primary sites, such as those mentioned above, was excluded. Histologically, there was marked
347 cellular pleomorphism. A predominance of cells with a “signet ring” morphology was observed;

348 they were individualised and in groups, and, less frequently, they formed ducts. In animals,
349 gastric and intestinal adenocarcinomas can be subclassified as carcinoma with signet ring cells;
350 but the same has not been described for primary hepatobiliary neoplasms (Cullen, 2017;
351 Munday et al., 2017). However, in the subclassification of cholangiocarcinomas in humans,
352 there is a variant with signet ring cells, which is rarely described and associated with a worse
353 prognosis when compared with other histological subtypes (Nakanuma and Kakuda, 2015;
354 Yonat et al, 2017). Due to the marked cellular pleomorphism observed, IHC helped establishing
355 this diagnosis. Thus, the neoplastic cells were CK7-positive, an immunomarker expressed in
356 the biliary epithelium. In addition, negative immunostaining was observed for Hep par1 and
357 CDX2, and it was possible to rule out hepatocellular carcinoma or metastatic adenocarcinoma
358 originating from the gastrointestinal tract (not detected at necropsy), respectively.

359 Fibrosarcomas are considered infrequent in sheep and more commonly seen in the
360 mandibular and maxillary regions (Ross, 1984; Head, 1990). In the skin and subcutaneous
361 tissues, the tumour is most often characterised based on the presenting solitary lesions, which
362 can be extensive, but generally do not result in metastases (Cordes and Shortridge, 1971; Head,
363 1990). In the case of the fibrosarcoma reported in this study, there were also multiple smaller
364 nodules on the skin, as well as metastases to internal organs. This multifocal distribution is
365 uncommon in domestic animals, and it is rarely observed in cats infected by the feline sarcoma
366 virus (FSV), which develops multicentric fibrosarcomas (Cullen, 2017). This virus has
367 oncogenic activity in different animal species, and, experimentally, the neoplasm was
368 reproduced in sheep when inoculated with infected cells *in vitro* (Theilen et al, 1974; Hall et al,
369 1975). IHC was important in this case, as the tumour cells were poorly differentiated in some
370 areas. They were positive for vimentin and negative for pan-cytokeratin, the von Willebrand
371 factor, and α -SMA, which were confirmed by their mesenchymal origin, ruling out a spindle
372 cell carcinoma, poorly differentiated hemangiosarcoma, and leiomyosarcoma, respectively.

373 Benign neoplasms were uncommon in this study, and the histological types diagnosed are
374 occasionally described in this species (Ross, 1984; Head, 1990). Ruminal fibropapillomas are
375 considered only as incidental findings, and they are usually observed in old animals (Head,
376 1990; Munday et al, 2017). Although their macroscopic presentation is quite characteristic,
377 lesions grossly suspected of being fibropapillomas may histologically be confirmed as SCC
378 (Head, 1990). In an experimental study, few papillomavirus particles had already been isolated
379 from some of these lesions (Norval et al, 1985). Despite this, it is believed that their
380 development is not associated with a viral aetiology (Norval et al, 1985), and, in the case
381 described in this study, the immunostaining for papillomavirus was negative.

382 We conclude that, despite the low frequency of neoplasms in sheep in the central region of
383 RS, Brazil, the expressive majority presented a malignant biological behavior. This article
384 highlights the importance of studies on the characterisation of neoplasms in farm animals, not
385 only in terms of clinical and pathological diagnosis but also in terms of the use of ancillary
386 techniques such as IHC.

387

388 **Acknowledgements**

389 The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
390 Superior (CAPES) for the financial support granted for this study. The student S.M.P. de Melo
391 has a Master's scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
392 Tecnológico (CNPq).

393

394 **Conflict of Interest Statement:** The authors declare no conflicts of interest with respect to
395 the research, authorship or publication of this article.

396

397 **References**

- 398 Almeida TL, Brum KB, Lemos RAA, Leal CRB, Borges FA (2013) Doenças de ovinos
399 diagnosticadas no Laboratório de Anatomia Patológica Animal da Universidade Federal de
400 Mato Grosso do Sul (1996-2010). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **33**, 21-29.
- 401 Anderson LJ, Sandison AT (1967) Tumors of the liver in cattle, sheep and pigs. *Cancer*
402 *Research*, **21**, 289-301.
- 403 Anjos BL, Trost ME, Diefenbach A, Gressler LT, Irigoyen LF (2010) Linfossarcoma de
404 células B multicêntrico em uma ovelha. *Acta Scientiae Veterinariae*, **38**, 315-318.
- 405 Bastianello SS (1982) A survey on neoplasia in domestic species over a 40-year period from
406 1935 to 1974 in the Republic of South Africa. II. Tumours occurring in sheep. *Onderstepoort*
407 *Journal of Veterinary Research*, **49**, 205-209.
- 408 Carvalho FKL, Dantas AFM, Riet-Correa F, Andrade RLFS, Nóbrega Neto PI et al. (2014)
409 Estudo retrospectivo das neoplasias em ruminantes e equídeos no semiárido do Nordeste
410 Brasileiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **34**, 211-216.
- 411 Cordes DO, Shortridge EH (1971) Neoplasms of sheep: a survey of 256 cases recorded at
412 Ruakura Animal Health Laboratory. *New Zealand Veterinary Journal*, **19**, 55-64.
- 413 Cullen JM, Stalker MJ (2016) Liver and biliary system. In: *Jubb, Kennedy, and Palmer's*
414 *Pathology of Domestic Animals*, 6th Edit., MG Maxie, Elsevier, Saint Louis, pp. 345-349.
- 415 Cullen JM (2017) Tumors of the liver and gallbladder. In: *Tumors in Domestic Animals*, 5th
416 Edit., DJ Meuten, John Wiley & Sons Inc., Ames, pp.602-631.
- 417 Dodd DC (1960) Adenocarcinoma of the small intestine of sheep. *New Zealand Veterinary*
418 *Journal*, **8**, 109-112.
- 419 Else RW (2007) Tumours. In: *Diseases of sheep*, 4th Edit., ID Aitken, Blackwell Publishing,
420 Ames, pp. 443-448.
- 421 Evans IA (1968) The radiomimetic nature of bracken toxin. *Cancer Research*, **28**, 2252-2261.

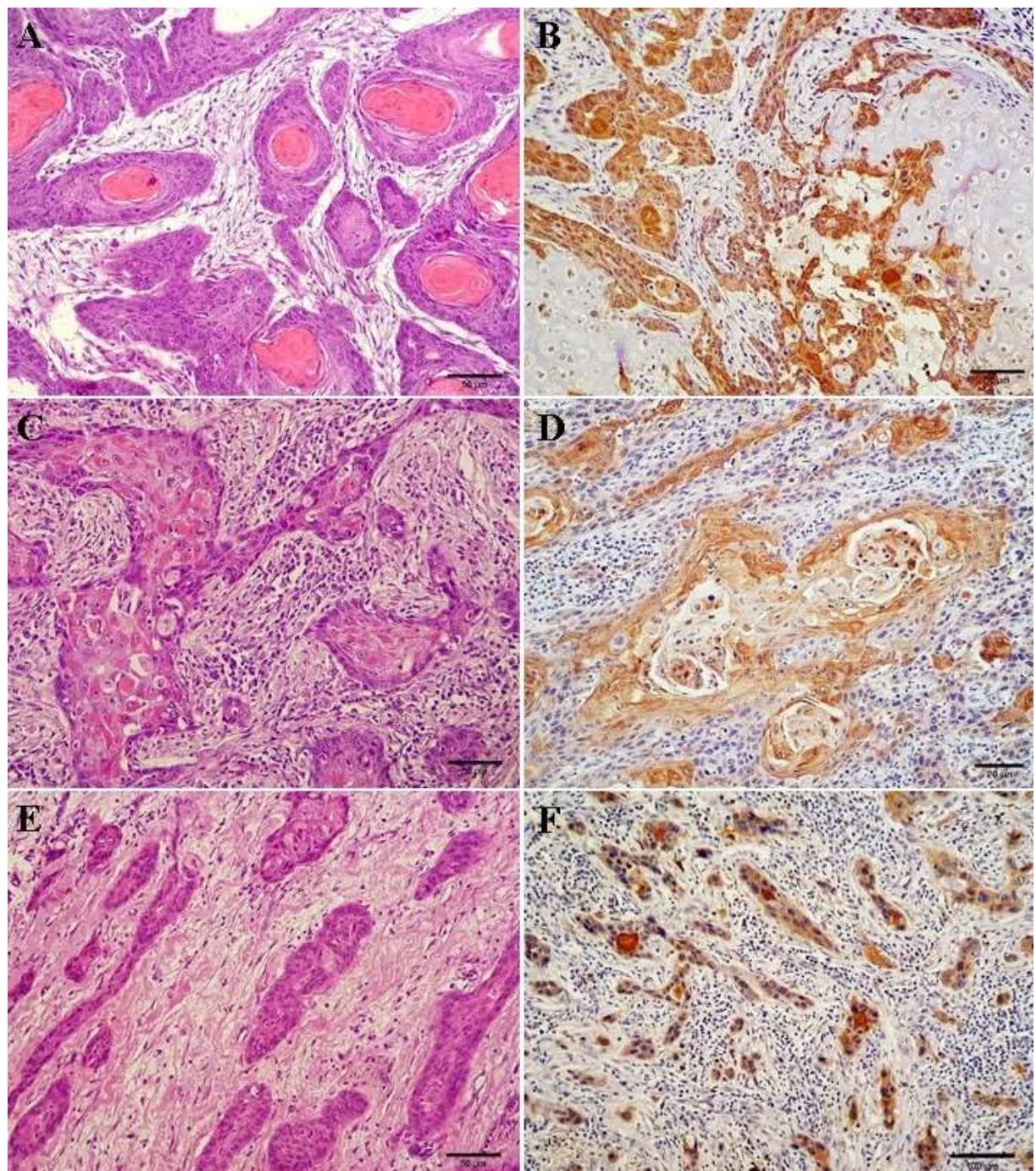
- 422 Faccin TC, Cargnelutti JF, Rodrigues FS, Menezes FR, Piazer JVM., et al. (2018) Bovine
423 upper alimentary squamous cell carcinoma associated with bracken fern poisoning:
424 clinical-pathological aspects and etiopathogenesis of 100 cases. *Plos One*, **13**, 1-13.
- 425 Feldman WH (1931) A report of forty tumors of sheep (*Ovis aries*, Jordan). *Cancer Research*,
426 **15**, 2044-2062.
- 427 Flores MM, Bianchi RM, Kimmers GD, Irigoyen LF, Barros CSL et al. (2013) Prevalência e
428 achados epidemiológicos, anatomo-patológicos e imuno-histoquímicos dos tumores
429 hepáticos malignos primários de cães da Região Central do Rio Grande do Sul (1965-
430 2012). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **33**, 497-511.
- 431 Gaffney E (1992) Carbohydrates. In: *Laboratory methods in histotechnology*, EB Prophet,
432 American Registry of Pathology, Washington, pp. 156.
- 433 Gatei MH, Brandon R, Naif HM, Lavin MF, Daniel RC (1989) Lymphosarcoma development
434 in sheep experimentally infected with bovine leukaemia virus. *Journal of Veterinary
435 Medicine Series B*, **36**, 424-432.
- 436 Goldschmidt MH, Goldschmidt KH (2017) Epithelial and melanocytic tumors of the skin. In:
437 *Tumors in Domestic Animals*, 5th Edit., DJ Meuten, John Wiley & Sons, Ames, pp. 88–
438 141.
- 439 Green JR, Herbst IA, Schneider DJ (1988) An outbreak of lymphosarcoma in merino sheep in
440 the southwestern Cape. *Journal of the South African Veterinary Association*, **59**, 27-29.
- 441 Hall JG, Scollay RG, Birbeck MSC, Theilen GH (1975) Studies on FeSV induced sarcomata
442 in sheep with particular reference to the regional lymphatic system. *British Journal of
443 Cancer*, **32**, 639-659.
- 444 Hamir AN (1985) An abattoir survey of neoplasms. *Australian Veterinary Journal*, **62**, 423.
- 445 Hawkins CD, Swan RA, Chapman HM (1981) The epidemiology of squamous cell carcinoma
446 of the perineal region of sheep. *Australian Veterinary Journal*, **57**, 455-457.

- 447 Head K (1990) Tumours in sheep. *In Practice*, **12**, 68-80.
- 448 Henderson DC (2007) Slaughter of sheep. In: *Diseases of sheep*, 4th Edit., ID Aitken, Blackwell
449 Publishing, Ames, pp. 37-39.
- 450 Johnstone AC, Manktelow BW (1978) The pathology of spontaneously occurring malignant
451 lymphoma in sheep. *Veterinary Pathology*, **15**, 301-312.
- 452 Lloyd LC (1961) Epithelial tumours of the skin of sheep: tumours of areas exposed to solar
453 radiation. *British Journal of Cancer*, **15**, 780-789.
- 454 Lucena RB, Rissi DR, Kommers GD, Pierezan F, Oliveira-Filho JC et al. (2011) A retrospective
455 study of 586 tumours in Brazilian cattle. *Journal of Comparative Pathology*, **145**, 20-24.
- 456 McCrea CT, Head KW (1981) Sheep tumours in north east Yorkshire. II. Experimental
457 production of tumours. *British Veterinary Journal*, **137**, 21-30.
- 458 Méndez A, Pérez J, Ruiz-Villamor E, García R, Martín MP, et al. (1997) Clinicopathological
459 study of an outbreak of squamous cell carcinoma in sheep. *Veterinary Record*, **141**, 597-
460 600.
- 461 Misdorp W (1967) Tumours in large domestic animals in the Netherlands. *Journal
462 Comparative Pathology*, **77**, 211-216.
- 463 Munday JS, Lohr CV, Kiupel M (2017) Tumors of the alimentary tract. In: *Tumors in
464 domestic animals*, 5th Edit., DJ Meuten, John Wiley & Sons Inc., Ames, pp.499-601.
- 465 Murakami K, Okada K, Ikawa Y, Aida Y (1994) Bovine Leukemia Virus induces CD5⁻B cell
466 lymphoma in sheep despite temporarily increasing CD5⁺B cells in asymptomatic stage.
467 *Virology*, **202**, 458-465.
- 468 Nakanuma Y, Kakuda Y (2015) Pathologic classification of cholangiocarcinoma: new
469 concepts. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **29**, 277-293.
- 470 Newell KW, Ross AD, Renner RM (1984) Phenoxy and picolinic acid herbicides and small-
471 intestinal adenocarcinoma in sheep. *The Lancet*, **324**, 1301-1304.

- 472 Norval M, Michie JR, Apps MV, Head KW, Else RE (1985) Rumen papillomas in sheep.
- 473 *Veterinary Microbiology*, **10**, 219-229.
- 474 Panziera W (2015) *Aspectos epidemiológicos, clínicos, anatomo-patológicos e imuno-*
- 475 *histoquímicos do linfoma em bovinos (1965-2014)*. Dissertation, Federal University of
- 476 Santa Maria.
- 477 Panziera W, Bianchi RM, Galiza GJN, Pereira PR, Mazaro RD et al. (2014) Aspectos
- 478 epidemiológicos, clínicos e anatomo-patológicos do linfoma em bovinos: 128 casos (1965-
- 479 2013). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **34**, 856-864.
- 480 Plummer PJG (1956) A survey of six hundred and thirty six tumours from domesticated
- 481 animals. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **20**, 239-251.
- 482 Polinas M, Burrai GP, Vitiello V, Falchi L, Zedda MT et al. (2020) Histological and
- 483 immunohistochemical features of trichoblastoma in a Sarda breed sheep. *Animals*, **10**, 1-8.
- 484 Preziuso S, Taccini E, Rossi G, Braca G, Renzoni G (2002) Cutaneous hemangiosarcoma in a
- 485 sheep: morphological, histopathological and immunohistochemical observations. *Journal*
- 486 *Comparative Pathology*, **127**, 72-75.
- 487 Ramos AT, Souza AB, Norte DM, Ferreira JLM, Fernandes CG (2008) Tumores em animais
- 488 de produção: aspectos comparativos. *Ciência Rural*, **38**, 148-154.
- 489 Rezaie A, Golshahi H, Naddaf H (2012) Coincidence of meibomian adenoma and squamous
- 490 cell carcinoma in the upper eyelid of a sheep: histopathological and immunohistochemical
- 491 studies. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **13**, 343-346.
- 492 Rissi DR, Pierezan F, Oliveira Filho JC, Fighera RA, Irigoyen LF et al. (2010) Doenças de
- 493 ovinos da região central do Rio Grande do Sul: 361 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*,
- 494 **30**, 21-28.
- 495 Ross AD (1980) Small intestine carcinoma in sheep. *Australian Veterinary Journal*, **56**, 25-
- 496 28.

- 497 Ross AD (1984) *Studies on neoplasms of sheep with emphasis on adenocarcinoma of the*
498 *small intestine.* PhD Thesis, University of Canterbury.
- 499 Theilen G, Hall JG, Pendry A, Glover DJ, Reeves BR (1974) Tumours induced in sheep by
500 injecting cells transformed in vitro with feline sarcoma virus. *Transplantation*, **17**, 152-
501 155.
- 502 Tilbrook PA, Sterrett G, Kulski JK (1992) Detection of papillomaviral-like DNA sequences in
503 premalignant and malignant perineal lesions of sheep. *Veterinary Microbiology*, **31**, 327-
504 341.
- 505 Togni M, Curtis A, Vargas DP, Kommers GD, Irigoyen LF et al. (2018) Causas de morte e
506 razões para eutanásia em gatos na Região Central do Rio Grande do Sul (1964-2013).
507 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **38**, 741-750.
- 508 Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM (2016) Alimentary system. In: *Jubb, Kennedy, and*
509 *Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6th Edit., MG Maxie, Elsevier, Saint Louis, pp.
510 1-257.
- 511 Valli VEO, Kiupel M, Bienzle D (2016) Hematopoietic system. In: *Jubb, Kennedy, and*
512 *Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6th Edit., MG Maxie, Elsevier, Saint Louis, pp.
513 102-268.
- 514 Vemireddi V, Langohr IM, Thacker HL (2007) Polypoid uterine leiomyosarcomas in a sheep.
515 *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **19**, 309-312.
- 516 Vitiello V, Burrai GP, Agus M, Anfossi AG, Alberti A et al. (2017) *Ovis aries* papillomavirus
517 3 in ovine cutaneous squamous cell carcinoma. *Veterinary Pathology*, **54**, 775-782.
- 518 Webster WM (1966) Neoplasia in food animals with special reference to the high incidence in
519 sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, **14**, 203-214.

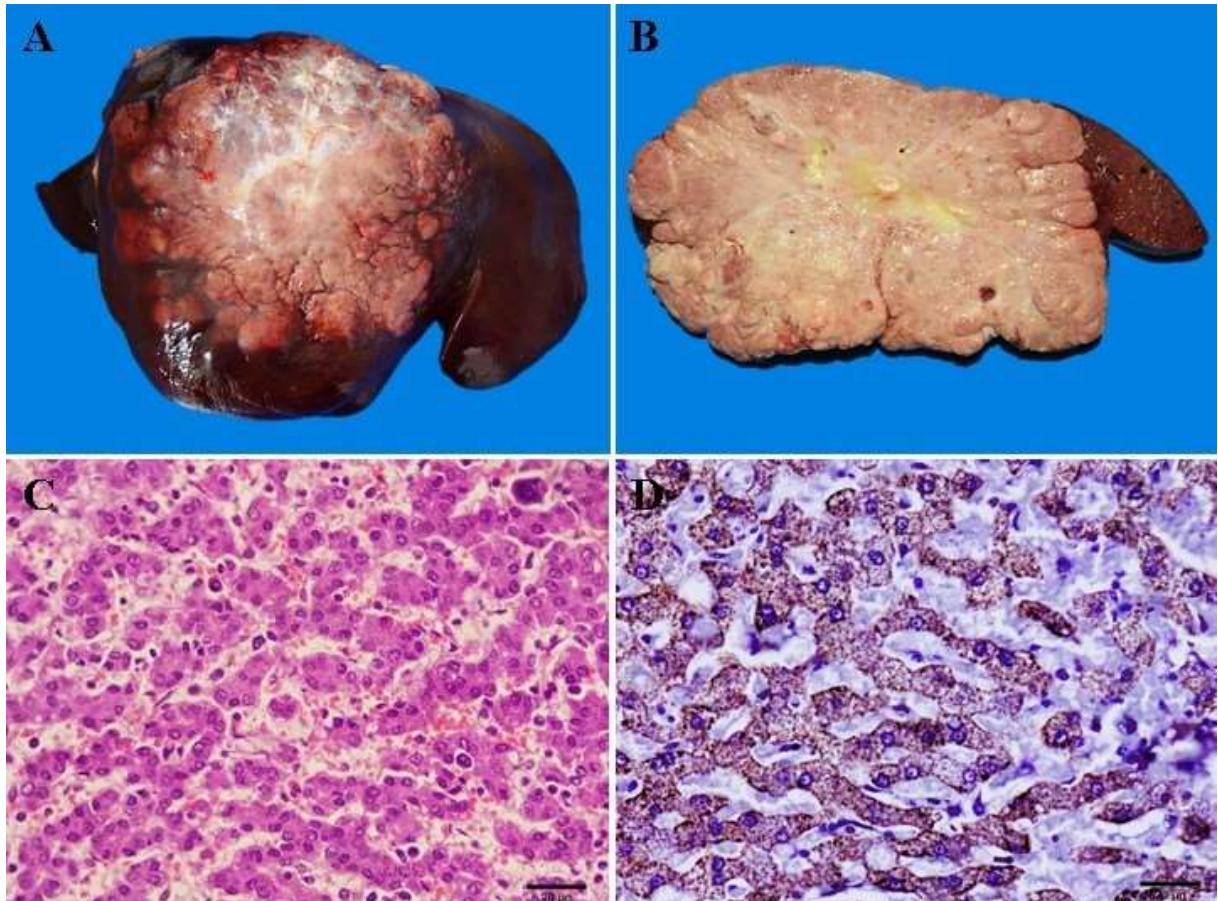
520 Yonat S, Amir D, Menahem B, Yaakov BZ, Eli B et al. (2017) An unusual case of signet ring
521 cell cholangiocarcinoma: case report and a review of literature. *Advanced Research in*
522 *Gastroenterology & Hepatology*, **6**, 1-6.



523

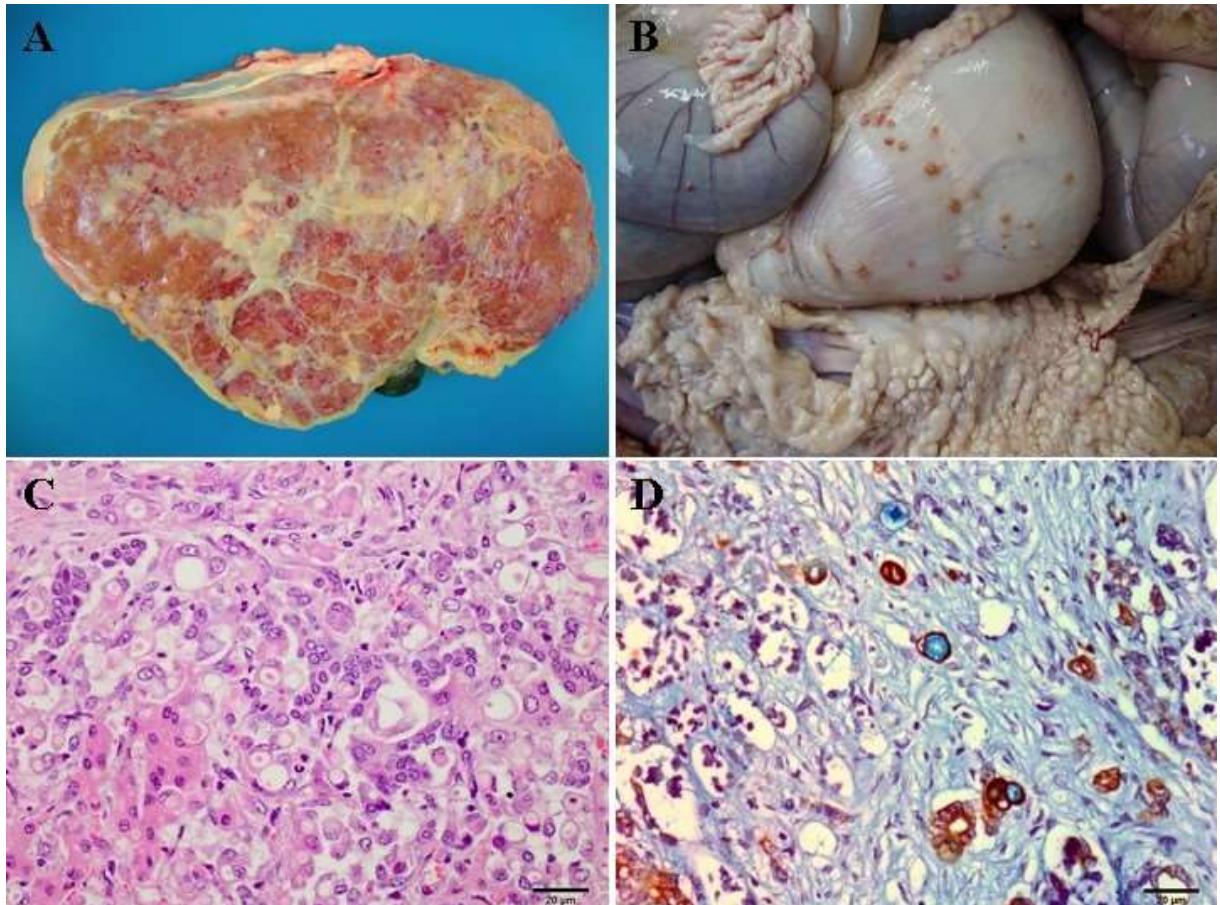
524 **Fig. 1.** Squamous cell carcinoma. (A) There is proliferation of neoplastic keratinocytes arranged
525 on islands with the formation of keratin pearls (well-differentiated SCC). HE, bar = 50 μ m. (B)
526 Islands and cords of keratinocytes strongly immunostained for pan-cytokeratin and invading
527 cartilaginous tissues of the ear. IHC Polymer-HRP, bar = 50 μ m. (C) The cells are arranged in
528 ribbons, cords, and nests with less intense keratinization (moderately differentiated SCC). HE,
529 bar = 50 μ m. (D) Neoplastic cells moderately immunostained for pan-cytokeratin arranged in

530 islands, cords, and nests. IHC Polymer-HRP, bar = 50 µm. (E) Neoplastic keratinocytes are
531 arranged in ribbons, cords, and nests and interspersed by a marked desmoplastic reaction.
532 Individual keratinization and/or keratin pearls are absent (poorly differentiated SCC). HE, bar
533 = 50 µm. (F) Neoplastic cells moderately immunostained for pan-cytokeratin arranged in nests
534 and cords. IHC Polymer-HRP, bar = 100 µm.



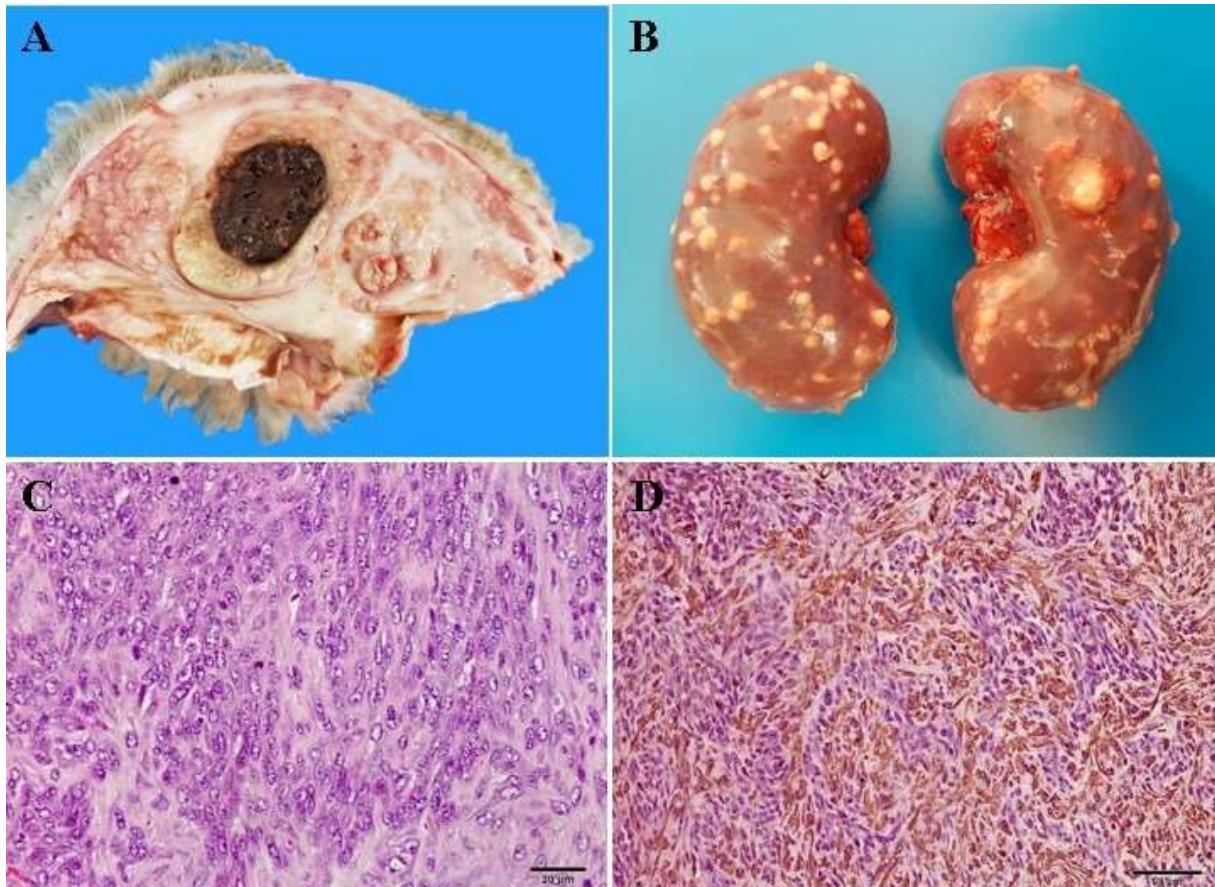
535

536 **Fig. 2.** Hepatocellular carcinoma. (A) Amid the hepatic parenchyma of the right lobe, there is
537 an extensive, pale pink, and multinodular mass. (B) On the cut surface, the mass is well-
538 circumscribed and pinkish with yellowish areas (interpreted as necrosis) in the central region.
539 (C) Neoplastic hepatocytes are seen arranged in a trabecular pattern. HE, bar = 20 μ m. (D)
540 Neoplastic hepatocytes with moderate to intense cytoplasmic immunostaining for Hep Par1,
541 with a granular and diffuse pattern. IHC Polymer-HRP, bar = 20 μ m.



542

543 **Fig. 3.** Cholangiocarcinoma. (A) The capsular surface of the liver is irregular, with white
544 multifocal areas that are sometimes nodular and covered by dense aggregates of fibrin. (B)
545 Metastases by implantation are observed in the serosa of the abomasum and intestine, and
546 multiple white nodules in the mesentery. (C) Amid the hepatocytes, there are markedly
547 anaplastic neoplastic cells, with morphology similar to the “signet ring”. HE, bar = 20 μ m. (D)
548 Neoplastic cells strongly immunostained for CK7 are observed. Note an immunomarked
549 “signet ring” cell with Alcian Blue-positive intracytoplasmic content. IHC counter-staining
550 with Alcian Blue, Polymer-HRP, bar = 20 μ m.



551

552 **Fig. 4.** Fibrosarcoma. (A) The cut surface of the skin with a white slightly circumscribed mass
553 containing blackish pasty material in the central region (necrosis) and interspersed with
554 yellowish areas. (B) Metastasis to the kidneys, with multiple, well-circumscribed, yellowish-
555 white nodules on the capsular surface. (C) There are fusiform to polyhedral neoplastic cells
556 with oval to elongated nuclei and slightly granular chromatin. HE, bar = 20 μ m. (D) Neoplastic
557 cells immunostained for vimentin are observed. IHC, Polymer-HRP, bar = 50 μ m.

Table 1**Description of the immunohistochemistry protocol performed for each antibody**

<i>Antibody</i>	<i>Antigen retrieval</i>	<i>Dilution^c</i>	<i>Incubation (time/temperature)</i>	<i>Secondary antibody - amplifier</i>
Anti-Pancytokeratin [#]	Tris-EDTA ^e	1:2.000	1h / 37°C	Polymer-HRP ^y
Anti-BPV1 [#]	Tris-EDTA	1:50	1h / 37°C	Polymer-HRP ^y
Anti-Vimentin*	Tris-EDTA	1:100	1h / 37°C	Polymer-HRP ^y
Anti-von Willebrand factor [§]	Tris-EDTA	1:400	1h / 37°C	Polymer-HRP ^y
Anti-α-SMA*	Citrate ^{&}	1:100	1h / 37°C	Polymer-HRP ^y
Anti-CD79αcy*	Tris-EDTA	1:150	1h / 37°C	Polymer-HRP ^y
Anti-CD3 [§]	Tris-EDTA	1:400	1h / 37°C	Polymer-HRP ^y
Anti-Hep Par1*	Proteinase K [∞]	1:80	Overnight ^f / 4°C	Polymer-HRP ^y
Anti-CK7*	Proteinase K ⁺	1:40	Overnight / 4°C	Polymer-HRP ^y
Anti-Cytokeratin AE1/AE3*	Citrate	1:50	20 min/ 97°C	Polymer-HRP [¤]
Anti-CDX2*	Tris-EDTA	1:50	20 min/ 97°C	Polymer-HRP [¤]

[#] Polyclonal (produced in rabbit; anti-bovine)^{*}Monoclonal (produced in mice; anti-human)[§] Polyclonal (produced in rabbit; anti-human)^e pH 9.0 / carried out in a microwave oven at maximum power for 10 min.[&]pH 6.0 / carried out in a microwave oven at maximum power for 10 min.[¤]5 minutes.⁺30 minutes.[¤] Antibodies diluted in PBST.^f Incubation for 15h.^yEasyLink-One (EasyPath).[¤]Envision Flex/HRP (DakoCytomation).

Table 2**Histological type, affected primary organ, and number of neoplasm cases (n = 35)**

<i>Biological behavior</i>	<i>Neoplasm</i>	<i>Primary organ</i>	<i>Nº of cases (%)</i>
Malignant	Squamous cell carcinoma	Skin, eyes, and periocular tissues	17 (48.60%)
	Lymphoma	Lymph node, liver, kidneys, and heart	7 (20.00%)
	Intestinal adenocarcinoma	Small intestine	3 (8.60%)
	Hepatocellular carcinoma	Liver	1 (2.85%)
	Cholangiocarcinoma	Liver	1 (2.85%)
	Fibrosarcoma	Skin	1 (2.85%)
	Fibroma	Skin and uterus	3 (8.60%)
Benign	Papilloma	Skin	1 (2.85%)
	Fibropapilloma	Rumen	1 (2.85%)
Total			35 (100%)

Table 3**Sheep age, breed, and sex characteristics for each type of neoplasm (n = 35)**

<i>Neoplasm</i>	<i>Age (years)</i>	<i>Breed</i>	<i>Sex</i>
Squamous cell carcinoma	3-13	Ile de France ⁽⁶⁾ ; Ideal ⁽³⁾ ; Corriedale ⁽²⁾ ; Texel ⁽¹⁾ ; mixed breed ⁽³⁾ ; uninformed ⁽²⁾	F ⁽¹¹⁾ ; M ⁽⁴⁾ ; uninformed ⁽²⁾
Lymphoma	1-4	Corriedale ⁽³⁾ ; mixed breed ⁽²⁾ ; uninformed ⁽²⁾	F ⁽²⁾ ; M ⁽³⁾ ; uninformed ⁽²⁾
Intestinal adenocarcinoma	2-5	Texel ⁽¹⁾ ; Ideal ⁽¹⁾ ; Ile de France ⁽¹⁾	F ⁽³⁾
Hepatocellular carcinoma	1	mixed breed ⁽¹⁾	F ⁽¹⁾
Cholangiocarcinoma	5	Texel ⁽¹⁾	F ⁽¹⁾
Fibrosarcoma	3	Texel ⁽¹⁾	F ⁽¹⁾
Fibroma	1-4	Corriedale ⁽²⁾ ; mixed breed ⁽¹⁾	F ⁽²⁾ ; M ⁽¹⁾
Papilloma	9	uninformed ⁽¹⁾	M ⁽¹⁾
Fibropapilloma	uninformed	mixed breed ⁽¹⁾	F ⁽¹⁾

(1), (2), (3), (4), (6), and (11) Number of animals.

F = female.

M = male.

4 CONCLUSÃO

Este estudo retrospectivo permitiu concluir que apesar da baixa frequência de neoplasmas em ovinos na região central do Rio Grande do Sul, a expressiva maioria apresentou um comportamento biológico maligno.

Dentre eles, o carcinoma de células escamosas, o linfoma e o adenocarcinoma intestinal se destacaram como os mais frequentes nesta espécie na área de abrangência do LPV-UFSM.

A realização da técnica de IHQ permitiu confirmar a origem das células neoplásicas em alguns casos, auxiliando assim na determinação do diagnóstico.

Este trabalho ressalta a importância de estudos de caracterização de neoplasmas em animais de produção não apenas no diagnóstico clínico e patológico, mas também na disseminação do uso de técnicas auxiliares, como a IHQ.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. Respiratory system. In: MAXIE, M. G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6th. ed. St. Louis: Elsevier, 2016. v. 2, cap. 5, p. 547-551.
- CULLEN, J. M.; BREEN, M. Pathogenesis, prognosis, and diagnosis. In: MEUTEN, D. **J. Tumors in domestic animals**. 5th. ed. Ames: John Wiley & Sons, 2017. cap. 1, p. 1-26.
- CULLEN, J. M.; PAGE, R.; MISDORP, W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. In: MEUTEN, D. **J. Tumors in domestic animals**. 4th. ed. Ames: Blackwell Publishing Company, 2002. cap. 1, p. 3-44.
- DAGLEISH, M. P.; BENAVIDES, J.; CHIANINI, F. Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. **Small Ruminant Research**, v. 92, n. 1-3, p. 19-35, ago. 2010.
- FIGHERA, R. A.; GRAÇA, D. L. Sistema hematopoiético. In: SANTOS, R. de L.; ALESSI, A. C. (Org.). **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap. 6, p. 311-405.
- HERAS, M. et al. Enzootic nasal adenocarcinoma in sheep: an update. **Small Ruminant Research**, v. 180, p. 131-134, nov. 2019.
- KIUPEL, M. et al. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 371–377, jul. 2004.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Neoplasia. In: _____. **Robins patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap. 5, p. 161-214.
- MADEWELL, B. R. Neoplasms in domestic animals: a review of experimental and spontaneous carcinogenesis. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.54., n. 2, p. 111-125, mar. 1981.
- MAULDIN, E. A.; KENNEDY, J. P. Integumentary system. In: MAXIE, M. G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals**. 6th. ed. Saint Louis: Elsevier, 2016. v. 1, cap. 6, p. 509-736.
- NEWKIRK, K. M.; BRANNICK, E. M.; KUSEWITT, D. F. Neoplasia and tumor biology. In: ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 6th. ed. Saint Louis: Elsevier, 2017. cap. 6, p. 286-321.
- PONOMARKOV, V.; MACKEY, L. J. Tumours of the liver and biliary system. **Bulletin of the World Health Organization**, v.53, n. 2-3, p. 187-194, 1976.
- RAMOS-VARA, J. A. et al. Immunohistochemical expression of melanocytic antigen PNL2, Melan A, S100, and PGP 9.5 in equine melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 161-166, jan. 2014.

RAMOS-VARA, J. A.; BORST, L. B. Immunohistochemistry: fundamentals and applications in oncology. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 5th. ed. Ames: John Wiley & Sons, 2017. cap. 3, p. 44-87.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; MILLER, M. A. Veterinary diagnostic immunohistochemistry: a survey of 47 laboratories. **The Journal of Histotechnology**, v. 28, n. 1, p. 19-23, mar. 2005.

SHARP, J. M.; HERAS, M. Contagious respiratory tumours. In: AITKEN, I. D. **Diseases of sheep**. 4th. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007. cap. 30, p. 211-217.

TERUYA-FELDSTEIN, J. The immunohistochemistry laboratory. Looking at Molecules and preparing for tomorrow. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, p. 1659–1665, nov. 2010.

WILSON, D. W. Tumors of the respiratory tract. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 5th. ed. Iowa State: Blackwell Publishing, 2017. cap. 12, p. 467-498.