

# UN CASO DI LEUCEMIA ACUTA IN UN CAVALLO

Roccabianca P., Castagnaro M., Giuliani A.

Istituto di Patologia e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova

## INTRODUZIONE

Le patologie linfoproliferative e mieloproliferative sono relativamente poco frequenti nella specie equina.<sup>11,13</sup> Le segnalazioni di leucemie primarie nel cavallo sono assai rare,<sup>3,5,7,13,15,16</sup> e solo due casi di linfoma secondariamente leucemico sono stati descritti in letteratura.<sup>1,12</sup> Nel cavallo, le leucemie croniche sono più frequentemente di tipo linfocitico<sup>1,7,12</sup> mentre le forme acute sembrano originare dalla linea mieloide.<sup>3,13,15,16</sup> Solo due leucemie linfocitiche, una di origine B ed una T, sono state fino ad oggi caratterizzate dal punto di vista fenotipico.<sup>7</sup> Al contrario, la dimostrazione di un'origine mieloide si è sempre basata solo su dati citomorfologici ed esami citochimici<sup>5,13</sup> senza l'associazione di studi fenotipici.

## MATERIALI E METODI

Una cavalla di razza olandese di 22 anni è stata sottoposta ad esame necroscopico. Campioni di milza, fegato, intestino tenue, colon e cieco, linfonodi meseraici e toracici, reni, vescica, ovaie, diaframma, polmone, cuore, sistema nervoso centrale, midollo spinale e cute sono stati fissati in formalina tamponata, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni dello spessore di cinque micron e colorati con Ematossilina ed Eosina. Sezioni di fegato e polmone, preparate su vetrini polilisinati, sono state utilizzate per le colorazioni immunoistochimiche. Gli anticorpi utilizzati riconoscevano il fattore VIII (Dako, Glostrup, Danimarca), la porzione intracitoplasmatica della catena  $\epsilon$  del CD3 (Clone A452, Dako, Glostrup, Danimarca), e la catena intracitoplasmatica del recettore dei linfociti B (CD79a) (Clone Hm57, Dako). Le sezioni di tessuto utilizzate per il riconoscimento delle molecole CD3 e CD79a, una volta sparaffinate e reidratate, sono state incubate nel forno a microonde con una soluzione di tampone citrato (0,01 M, pH 6.0) ai fini di un adeguato smascheramento antigenico. Nessuna procedura addizionale era necessaria per l'identificazione del fattore VIII. All'incubazione con gli anticorpi primari seguivano lavaggi e l'applicazione di anticorpi secondari biotinilati anti-topo (CD79a) e anti-coniglio (fattore VIII e CD3) seguendo il metodo ABC descritto precedentemente.<sup>6</sup>

## RISULTATI

La cavalla presentava sintomi clinici di abbattimento, anoressia, dimagrimento, edemi sottocutanei della regione ventrale dell'addome e degli arti, pallore delle mucose, ittero, tachipnea, tachicardia e

tachisfigmia. Il profilo ematologico rivelava una lieve anemia ipocromica (eritrociti:  $4,1 \cdot 10^6 \times \text{mm}^3$ , emoglobina: 8.1 g/dl) ed una grave piastrinopenia ( $<1000/\text{mm}^3$ ). La conta differenziale dei leucociti era nella norma. Il profilo biochimico era caratterizzato da grave alterazione della funzionalità epatica (bilirubina totale 4.96 mg/dl, creatinichinasi  $>1500 \text{ U/l}$ ,  $\gamma$ -GT 64.4 U/l, trigliceridi 509 mg/dl, Colesterolo 177 mg/dl). La somministrazione di antiinfiammatori steroidei era seguita da un improvviso miglioramento dell'animale con successiva assunzione di cibo. Poche ore dopo la cavalla mostrava grave difficoltà respiratoria, movimenti incontrollati associati ad autotraumatismi e morte spontanea il terzo giorno dalla visita clinica.

L'esame autoptico rivelava mucose pallide ed itteriche. All'apertura della cavità addominale, si osservava la presenza di un ematoma di forma bilobata e dimensioni di 130 cm per 85 cm che dissecava la porzione tendinea del diaframma e si estendeva in posizione retroperitoneale, lungo il legamento longitudinale ventrale, fino alla regione ombelicale. L'ematoma era composto da abbondante quantità di sangue scuro, scarsamente coagulabile e da numerosi coaguli a diversi stadi di organizzazione. Intestino tenue, colon e cieco presentavano grave edema della parete. Erano inoltre presenti spleno- ed epatomegalia di notevole entità. Nessun linfonodo superficiale o delle cavità addominale e toracica si presentava aumentato di volume. All'apertura del torace, i polmoni mostravano congestione diffusa ed ipostasi a carico del polmone destro.

All'esame istologico cellule rotonde atipiche infiltravano il parenchima splenico ed erano contenute nei sinusoidi epatici fortemente dilatati. Le stesse cellule atipiche obliteravano il lume vascolare della maggior parte degli organi esaminati ed erano particolarmente evidenti nei vasi dei setti polmonari e nei glomeruli renali. La porzione muscolare del diaframma presentava emorragie interstiziali associate alla presenza di numerosissimi macrofagi in attiva eritrofagocitosi o contenenti pigmento di origine emoglobinica a diversi stadi di degradazione. Erano evidenti segni di degenerazione e atrofia delle fibre muscolari e sostituzione della muscolatura da parte di materiale ematico coagulato in diversi stadi di organizzazione. Ad eccezione di un imponente edema di parete intestinale e sottocute, nessun ulteriore reperto di rilievo era evidenziabile a carico degli organi parenchimatosi presi in esame. Le cellule neoplastiche mostravano marcata anisocariosi ed anisocitosi e spiccato pleomorfismo. Queste cellule erano assai voluminose (30-50 micron), occasionalmente binucleate, con grossi nuclei ovali, indentati o pleomorfi. I nuclei avevano un disegno cromatinico finemente addensato o erano vescicolosi e contenevano da uno a quattro evidenti nucleoli. Le cellule neoplastiche possedevano citoplasma debolmente eosinofilo in quantità variabile e, occasionalmente, mostravano attività eritrofagocitaria. Sulla base della presentazione clinica, citologica e dei dati anatomopatologici era posto il sospetto di una leucemia di origine mieloide o megacarioblastica. Le cellule neoplastiche non esprimevano il fattore VIII, escludendo

un'origine megacarioblastica, erano CD3 negative, escludendo l'origine da linfociti T. Tuttavia, le cellule neoplastiche esprimevano il CD79a. Sulla base dei dati immunocistochemici era posta la diagnosi di una leucemia acuta a grosse cellule di origine B.

## DISCUSSIONE

In questo caso, la sintomatologia clinica, la rapida progressione, la presenza di cellule atipiche negli spazi vascolari e l'espressione della molecola CD79a permettevano la diagnosi di una leucemia acuta di origine B.

Le leucemie croniche segnalate nella specie equina erano caratterizzate da una morfologia linfocitica e da un fenotipo B o T.<sup>7</sup> Nell'uomo, le leucemie croniche derivano, nella maggior parte dei casi, da linfociti B<sup>2</sup> mentre nel cane e nel gatto l'origine è primariamente T (Moore et al., in via di pubblicazione). Indipendentemente dal fenotipo, le leucemie croniche sono, in genere, caratterizzate da una lenta progressione e da una buona risposta alla chemioterapia.<sup>4,14</sup> Le leucemie acute descritte nel cavallo hanno prevalentemente una derivazione mieloide o mielomonocitica.<sup>3,5,13,15,16</sup> Queste segnalazioni suggeriscono una differenza tra specie equina ed umana dove sono frequenti leucemie con un'origine B.<sup>8</sup> Sfortunatamente, soprattutto in medicina veterinaria, la diagnosi delle leucemie mieloidi si è sempre basata sull'identificazione delle caratteristiche morfologiche cellulari e sull'applicazione di tecniche citochimiche.<sup>5,10,13</sup> Con l'avvento della citofotometria a flusso, l'utilizzo delle indagini citochimiche è stato sempre più relegato ad un piano secondario dovuto alla scarsa specificità di queste tecniche.<sup>9</sup>

La presentazione clinica ed i reperti citomorfologici di questo caso erano simili ad alcuni casi di leucemia mieloide descritti precedentemente in letteratura.<sup>3,5,15</sup> Queste similitudini ed i reperti di eritrofangocitosi suggerivano anche in questo caso un'origine mieloide. Tuttavia, l'esame immunocistochemico rivelava un'intensa espressione della molecola CD79a che rappresenta una delle porzioni del recettore di membrana presente specificamente nei linfociti B.

Recentemente, 31 casi di linfoma sono stati tipizzati nella specie equina.<sup>11</sup> La maggior parte dei linfomi B avevano localizzazione splenica o sottocutanea, erano di tipo diffuso ed erano prevalentemente composti da cellule con una morfologia sovrapponibile a quella evidenziata in questo caso. Tuttavia, nessun caso di linfoma B era associato ad una presentazione leucemica.<sup>11</sup> Solo un caso di linfoma con evoluzione leucemica è stato caratterizzato nel cavallo.<sup>12</sup> Tuttavia, in questo caso, le cellule atipiche nel sangue avevano una morfologia riferibile a linfociti maturi che non esprimevano immunoglobuline di superficie e perciò erano interpretate come cellule di origine T<sup>12</sup>

Queste osservazioni mettono in evidenza nette differenze citomorfologiche tra linfomi e leucemie di tipo B del cavallo e di altre specie. Le peculiarità morfologiche dei linfomi e delle leucemie equine di tipo B suggeriscono di affrontare con cautela una diagnosi fenotipica sulla sola base dei dati morfologici ed istochimici.

Questo caso rappresenta la prima segnalazione di una leucemia acuta di tipo B nel cavallo. La somiglianza di questo caso con forme di leucemia mieloide acuta descritte nel cavallo suggerisce inoltre la necessità di una precisa classificazione di queste neoplasie, approccio che richiede una sistematica integrazione dei criteri citomorfologici con dati di immunofenotipo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Allen B, Wannop CC, Wright IM: Multicentric lymphosarcoma with lymphoblastic leukemia in a young horse. *Vet Rec* **115**: 130-131, 1984
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid malignancies. *J Clin Pathol* **42**: 567-584, 1989
3. Blue J, Perdrizet J, Brown E: Pulmonary aspergillosis in a horse with myelomonocytic leukemia. *J Am Vet Med Assoc* **190**: 1562-1564, 1987
4. Brouet JC, Seligmann M: Chronic Lymphocytic Leukaemia as an immunoproliferative disorder. *Clin Haematol* **6**: 169-180, 1977
5. Burkhardt E, v. Saldern F, Huskamp B: Monocytic leukemia in a horse. *Vet Pathol* **21**: 394-398, 1984
6. Caniatti M, Roccabianca P, Scanziani E, Paltrinieri S, Moore PF: Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol* **33**: 204-212, 1996
7. Dascanio JJ, Zhang CH, Antczak DF, Blue JT, Simmons TR: Differentiation of chronic lymphocytic leukemia in the horse. A report of two cases. *J Vet Intern Med* **6**: 225-229, 1992
8. De Rossi G, Grossi C, Tabilio A, Vegna L, Lo Coco F, Annino L, Camera A, Cascavilla N, Ciolli S, Del Poeta G, Liso V, Mandelli F: Immunophenotype of acute lymphoblastic leukemia cells: the experience of the Italian cooperative group. *Leukemia and Lymphoma* **9**: 221-228, 1992
9. Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE: Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **78**: 1795-1802, 1991
10. Goasguen JE, Bennett JM: Classification of myeloid leukemia. *Clin Lab Med* **10**: 661-631, 1990
11. Kelley LC, Mahaffey EA: Equine malignant lymphomas: morphologic and immunohistochemical classification. *Vet Pathol* **35**: 241-252, 1998
12. Madewell BR, Carlson GP, J MN, Feldman BF: Lymphosarcoma with leukemia in a horse. *Am J Vet Res* **43**: 807-812, 1982
13. Mori T, Ishida T, Washizu T, Yamagami T, Umeda M, Sugiyama M, Motoyoshi S: Acute myelomonocytic leukemia in a horse. *Vet Pathol* **28**: 344-346, 1991
14. Moulton JE, Harvey JW: Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. *In: Tumors in Domestic Animals*, ed. Moulton J, pp. 231-296. University of California Press, Berkeley, CA, 1990
15. Ringger NC, Edens L, Bain P, Raskin RE, Larock R: Acute myelogenous leukemia in a mare. *Aust Vet J* **75**: 329-331, 1997
16. Spier SJ, Madewell BR, Zinkl JG, Ryan AM: Acute myelomonocytic leukemia in a horse. *J Am Vet Med Assoc* **188**: 861-863, 1986
17. Vernau W, Valli V, Dukes TW, Jacobs RM, Shoukri M, Heeney J: Classification of 1,198 cases of bovine lymphoma using the National Cancer Institute working formulation for human non-Hodgkin's lymphomas. *Vet Pathol* **29**: 183-195, 1992